فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۷۵- ۸۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات مولد آنزیم فسفاتاز از چشمه آب گرم لریا: بررسی پتانسیل حل‌کنندگی فسفات در حضور شاخص‌های مختلف

مریم پرهام فر: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، mary_parhamfar@yahoo.com
ارسطو بدویی دلفارد: استادیار بیوشیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، badoei@uk.ac.ir *
موج خالقی: استادیار میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، mjkhaleghi@yahoo.com
مهدی حسن شاهیان: استادیار میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، hasanshahi@gmail.com

چکیده

مقدمه: کودهای زیستی میکروارگانیسم‌هایی هستند که قادرند عناصر غذایی را از شکل بلا استفاده به شکل قابل استفاده تبدیل کنند. برخلاف کودهای شیمیایی، هزینه تولید کودهای زیستی کم و در اکوسیستم آلودگی به وجود نمی‌آورد. کودهای زیستی فسفاته می‌توانند به منظور افزایش محصول، جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی فسفاته شوند. از این رو، غربال‌گری به منظور یافتن باکتری‌های حل‌کننده فسفات سازگار با اقلیم هر منطقه یک ضرورت است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از چشمه آب گرم لریا، واقع در شهرستان جیرفت، نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در PKV به مدت ۳ شبانه روز کشت داده شدند. غربال‌گری باکتری‌های حل‌کننده فسفات مولد فسفاتاز روی محیط جامد اختصاصی PKV بر اساس قطر هاله، انجام شد. بهترین گونه باکتریایی توسط روش مولکولی ۱۶s rDNA شناسایی شد. میزان حل‌کنندگی فسفات این باکتری در حضور شاخص‌های مختلف منبع کربنی، نیتروژن، فسفات و اسیدیته اولیه محیط بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان داد که گونه فوق ۹۷ درصد به گونه *Bacillus licheniformis* شباهت دارد. علاوه بر این، مطالعات نشان داد که حداکثر تولید آنزیم پس از ۲ روز گرمخانه‌گذاری است و هم‌زمان با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری اسیدیته نیز کاهش می‌یابد. بررسی منابع کربنی در میزان حل‌کنندگی فسفات نشان داد که گلوکز مناسب‌ترین منبع کربنی در تولید آنزیم و رهاسازی فسفات است. بررسی حل‌کنندگی فسفات در حضور اسیدیته‌های مختلف نشان داد که اسیدیته ۵ مناسب‌ترین است. اثر منابع مختلف فسفات نشان داد که تری کلسیم فسفات اثر در خور توجهی در افزایش فعالیت آنزیمی در طی ۳ روز گرمخانه‌گذاری دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز و رشد در اسیدیته پایین و پتانسیل بالای حل‌کنندگی فسفات در حضور نمک‌های مختلف و منابع متفاوت فسفات، اهمیت در خور توجه این باکتری را به‌عنوان کود زیستی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: باکتری حل‌کننده فسفات، فسفاتاز، غربال‌گری، چشمه آب گرم

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

فسفر یک ماده غذایی مهم و محدود کننده رشد گیاهان بوده و بر خلاف نیتروژن، منبع اتمسفری بزرگی ندارد (۱). توسعه ساقه، استحکام ریشه و ساقه، رسیدن محصولات، تثبیت نیتروژن در لوگوم، کیفیت محصولات و مقاومت به بیماری‌های گیاهی، مرتبط با تغذیه فسفر هستند (۲-۴). یکی از راه‌های برطرف ساختن نیاز فسفر گیاهان استفاده از کودهای شیمیایی است؛ ولی به‌علت محدود بودن این منابع، افزایش قیمت تمام شده آن، مخاطرات زیست محیطی ناشی از کاربرد آن‌ها و تثبیت شدن قسمت اعظم کود فسفاته مصرفی به شکل غیر قابل استفاده برای گیاه، توجه به کودهای زیستی فسفاته ضرورت یافته است. فسفر در نهشته‌های معدنی یافت می‌شود و به عنوان منابع طبیعی غیرقابل تجدید محسوب می‌شود. این مسئله برای تعداد زیادی از کشورهایی که بدون سنگ فسفات هستند، بسیار مهم و جدی است. استخراج کانی‌های فسفردار و پخش کود فسفر دار در زمین‌ها به علت محدود بودن منابع فسفر، پایدار نیست و آینده تولید این کود با مشکل روبروست. علاوه بر این، در عمل بازدهی کودهای شیمیایی فسفاته بین ۱۰ تا ۲۵ درصد است. یعنی حدود ۷۵ درصد آن در خاک در اثر واکنش با کاتیون‌های فلزی به شکل رسوب و غیرقابل استفاده گیاه تبدیل می‌شود (۵). از این رو ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای کودهای شیمیایی فسفاته احساس می‌شود.

میکروارگانیسم‌های خاک در برخی از فرآیندهای حل‌کنندگی فسفات دخالت دارند که تغییر شکل فسفر و در نهایت زیست فراهمی آن را برای گیاه تحت تاثیر قرار می‌دهند (۶). باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار موثرتر بوده و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (۷). میکروارگانیسم‌ها نقش مرکزی را در چرخه فسفر طبیعی دارا هستند. این چرخه فسفات به وسیله اکسیداسیون و احیا ترکیبات فسفر انجام می‌شود و واکنش انتقال الکترون، بین مرحله اکسیداسیون از فسفین[1] (۳-) به فسفات (۵+)، انجام می‌شود. غلظت فسفر محلول در خاک معمولا بسیار پایین است و به طور معمول حدود ۱ ppm یا کمتر است (۸). سلول ممکن است به چند شکل فسفر را جذب کند اما مناسب‌ترین آن‌ها در شکل $H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-} جذب می‌شود. نمونه‌های متنوعی از میکروارگانیسم‌ها قادر به رهاسازی فسفر از منابع رسوب یافته فسفر گزارش شده اند. استفاده از آن‌ها به عنوان کود زیستی یا عامل کنترل برای بهبود کشاورزی به طور گسترده طی سال‌ها بررسی شده است (۹). در میان آن‌ها سویه‌هایی از جنس *سودوموناس*، *آزوسپریلیوم*، *بورخولدریا*، *باسیلوس*، *انتروباکتر*، *ریزوبیوم*، *اروینیا*، *سراشیا*، *فلاوباکتریوم*، *آلکالیژنز*، *آرتروباکتر* و *اسنیتوباکتر* قرار گرفته‌اند (۱۰ و ۱۱). برای این‌که این فسفر برای گیاهان قابل دسترس شود، باید به فسفات معدنی هیدرولیز شود. معدنی شدن بیشتر ترکیبات فسفر آلی به وسیله آنزیم‌های فسفاتاز انجام می‌شود.

اگر چه چندین باکتری حل‌کننده فسفات در خاک وجود دارد ولی معمولا تعداد آن‌ها به اندازه کافی زیاد نیست تا با باکتری‌های متداول دیگر موجود در ریزوسفر رقابت کنند. بنابراین، مقدار فسفر آزاد شده به وسیله آن‌ها برای افزایش رشد اساسی گیاه کافی نیست. از این رو تلقیح گیاه به وسیله این میکروارگانیسم‌ها در غلظت بالاتر از معمول در خاک ضروری است تا خاصیت حل‌کنندگی فسفات برای افزایش محصولات گیاهی انجام شود (۱۲). کودهای زیستی فسفاته به دست آمده

از ریزسازواره‌ها می‌توانند به منظور افزایش محصول، جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی شوند. این کودها از نظر هزینه ارزان‌تر بوده و بسیار سازگار با محیط هستند (۱۳ و ۱۴). با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیط و اقلیمی زیستگاه اصلی آن‌ها، تولید کود زیستی از باکتری‌های غیربومی که از مناطقی با ویژگی‌های اقلیمی متفاوت نسبت به شرایط داخلی کشور به دست آمده‌اند کارایی مطلوبی نخواهد اشت. به عنوان نمونه تلقیح *باسیلوس مگاتریوم واریته فسفوریکم*[۲]، به طور موفق در روسیه و هند استفاده شد اما تاثیر مشابهی در خاک‌های امریکا نشان نداد (۱۵). بنابراین، استفاده از باکتری‌های بومی که با شرایط زیستی کشور سازگار هستند در تولید کودهای زیستی مناسب‌تر خواهد بود. در این تحقیق، از چشمه آب گرم لریا در استان کرمان نمونه‌برداری شد. این چشمه دارای دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵/۵ است. باکتری‌های حل‌کننده فسفات در محیط اختصاصی غربال‌گری شدند. سپس، پتانسیل حل‌کنندگی بهترین گونه باکتریایی حل‌کننده فسفات در حضور ترکیبات مختلف ارزیابی شد. این باکتری با روش مولکولی 16S rRNA شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از چشمه آب گرم لریا در شهرستان جیرفت استان کرمان نمونه‌برداری شد. دمای این چشمه ۶۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته آن ۵/۵ است. این چشمه از دیر باز مورد استفاده مردم منطقه بوده است. آن‌ها معتقد هستند که دردهای مفاصل و غیره را تسکین می‌دهد. این چشمه جزو چشمه‌های آب گرم معدنی و اسیدی است که برای یافتن باکتری‌هایی زیستی سازگار با خاک‌های اسیدی مطالعه شده است.

غربال‌گری باکتری حل‌کننده فسفات

نمونه‌های خاک و آب چشمه یاد شده ابتدا در محیط‌های مایع PKV کشت داده شدند. ترکیبات این محیط شامل: گلوکز (۱۰گرم در لیتر)، تری کلسیم فسفات (۵ گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۰/۲ گرم در لیتر)، سولفات منیزیوم (۰/۱ گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۰/۲ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۰/۵ گرم در لیتر)، سولفات منگنز (۰/۰۰۲ گرم در لیتر)، سولفات آهن (۰/۰۰۲ گرم در لیتر) با اسیدیته ۷ بودند. پس از ۴۸ ساعت محیط‌های کشت با محیط تازه تعویض شد. پس از رشد در این محیط‌های مایع، از هر محیط مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشت و در محیط جامد PKV کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت میزان تولید آنزیم و قدرت حل‌کنندگی فسفات با بررسی قطر هاله‌ها و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی بررسی شد.

سنجش فعالیت آنزیمی و اندازه‌گیری میزان فسفات آزاد شده

سنجش آنزیم به وسیله گرمخانه‌گذاری ۲۵ میکرولیتر آنزیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۳۰ دقیقه با ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۴۰ میلی‌مولار سوبسترا در بافر ۱۰۰ میلی‌مولار استات سدیم اسیدیته (۵/۵) انجام شد. پس از گرمخانه‌گذاری، واکنش با افزودن ۱میلی‌لیتر محلول ۵ درصد TCA متوقف شده و فسفات معدنی آزاد می‌شود. سپس ۲ میلی‌لیتر معرف رنگی(۱/۵ درصد مولیبدات آمونیوم در ۵/۵ درصد سولفوریک اسید و ۲/۷ درصد از محلول سولفات آهن) افزوده شد و مقدار فسفات رها شده در ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. در

این مثال، یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که (۱ میکرومول) فسفات معدنی در هر دقیقه، تحت شرایط سنجش آزاد کند (۱۶).

شناسایی باکتری حل‌کننده فسفات با روش مولکولی ۱٦s rDNA

ابتدا باکتری روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. باکتری‌های رشد یافته به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری و سوسپانسیونی از آن در آب مقطر استریل تهیه شد. با سانتریفیوژ سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۵۰۰۰g رسوب باکتری به دست آمد. جداسازی DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناکلون انجام شد. به منظور تخمین کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده، جذب محلول رقیق شده DNA (با رقت ۱۰۰) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رابطه DNA (میکروگرم/میلی لیتر) A_{260} Conc .d .=50. و نسبت A_{260}/A_{280} به ترتیب غلظت DNA و میزان خلوص آن تخمین زده شد (۱۷). پرایمرها مطابق با پرایمرهای عمومی برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA به شکل زیر طراحی شدند (۱۶): پرایمر Forward: 5' -AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3'. با T_m = 53/7 ºC و Reverse primer: 5' -GGC/T TAC CTT GTT ACG ACT T-3' با T_m = 53/4 ºC. واکنش PCR مطابق با برنامه ذیل انجام شد: ۱. دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۵ دقیقه ۲. ۳۰ سیکل که هر کدام شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه ۳. برای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۸ دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص‌سازی شد. سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA توسط بیونیر[۳] (کره) تعیین شد.

بررسی میزان تولید آنزیم فسفاتاز در طی زمان

باکتری مولد فسفاتاز که دارای بیش‌ترین هاله در محیط جامد حاوی تری‌کلسیم فسفات بود، برای تعیین بهترین زمان تولید آنزیم استفاده شد. برای این منظور، این باکتری در محیط PKV در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده شدند و به مدت ۵ روز با روش مولیبدینیوم- بلو[۴]، تولید آنزیم اندازه‌گیری شد (۱۸). بازه زمانی که در آن بیش‌ترین غلظت فسفات آزاد در محیط حاصل شود، به عنوان زمان بهینه حل‌کنندگی فسفات در نظر گرفته شد. هم‌زمان با تعیین زمان بهینه حل‌کنندگی فسفات، اسیدیته اولیه محیط کشت PKV نیز اندازه‌گیری شد. علاوه بر این منحنی رشد باکتری نیز در شرایط ذکر شده نیز بررسی شد.

اثر منابع کربنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

برای تعیین بهینه‌سازی منبع کربن، باکتری مورد نظر در محیط PKV، دمای ۴۰ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده و به مدت ۳ روز با روش مولیبدینیوم- بلو، میزان حل‌کنندگی فسفات آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این محیط از ۳ نوع منبع کربن گلوکز، گالاکتوز و گلوکز + گالاکتوز به عنوان منبع انرژی استفاده شدند. به جز تفاوت در منبع کربن، سایر شرایط کشت و سنجش در همه محیط‌ها یکسان در نظر گرفته شد.

اثر منابع نیتروژنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

در بهینه‌سازی منبع نیتروژن برای افزایش میزان حل‌کنندگی فسفات، ۳ نوع ترکیب متفاوت شامل: آمونیوم سولفات، گلیسین و عصاره مخمر با غلظت

(۰/۵ درصد) استفاده شد. باکتری‌های مورد بررسی در محیط PKV، دمای ۴۰ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده و در مدت ۳ روز با روش مولیبدینیوم بلو، میزان حل‌کنندگی فسفات آن‌ها اندازه‌گیری شد.

اثر اسیدیته محیط بر میزان حل‌کنندگی فسفات

برای بررسی تاثیر اسیدیته محیط، باکتری مورد نظر در محیط PKV با سه نوع اسیدیته متفاوت (۵، ۶ و ۷) و به مدت ۳ روز کشت داده شد. سپس با استفاده از روش مولیبدات بلو، میزان حل‌کنندگی فسفات آن‌ها اندازه‌گیری شد.

اثر منابع فسفات بر میزان حل‌کنندگی فسفات

در بهینه‌سازی منبع فسفات، باکتری‌های مورد نظر در محیط PKV یک بار با سدیم فیتات به عنوان منبع فسفات (محیط پایه PKV) و یک بار با تری کلسیم فسفات و بار دیگر فیتات (۰/۲۵ درصد)+ تری کلسیم فسفات (۰/۲۵ درصد) بررسی شدند. همچنین، محیط نوترینت براث (NB) هم به‌عنوان شاهد (بدون افزودن فسفات) کار رفت. باکتری‌ها در دمای ۴۰ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده شدند و میزان حل‌کنندگی فسفات آن‌ها به مدت ۳ روز اندازه‌گیری شد.

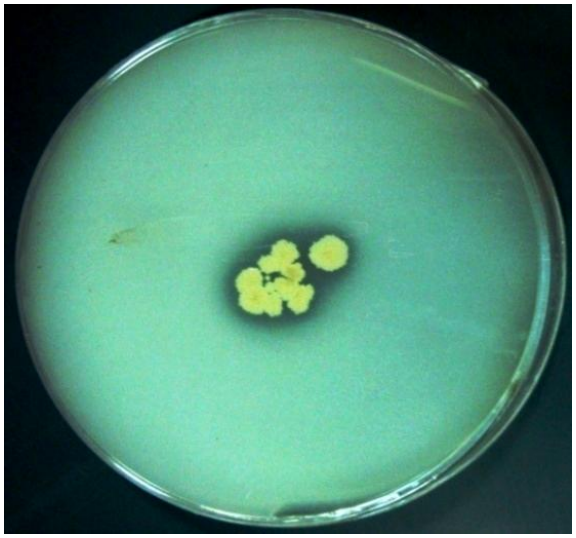
اثر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان حل‌کنندگی فسفات

برای این منظور از غلظت‌های متفاوت نمک‌های موجود در محیط PKV یعنی NaCl، KCl، $MgSO_4$ و $FeSO_4$ استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ از هر یک از نمک‌های ذکر شده در محیط PKV تهیه شد و باکتری مورد نظر در این محیط‌ها کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت میزان فسفات آزاد شده اندازه‌گیری شد.

نتایج

غربال‌گری باکتری حل‌کننده فسفات

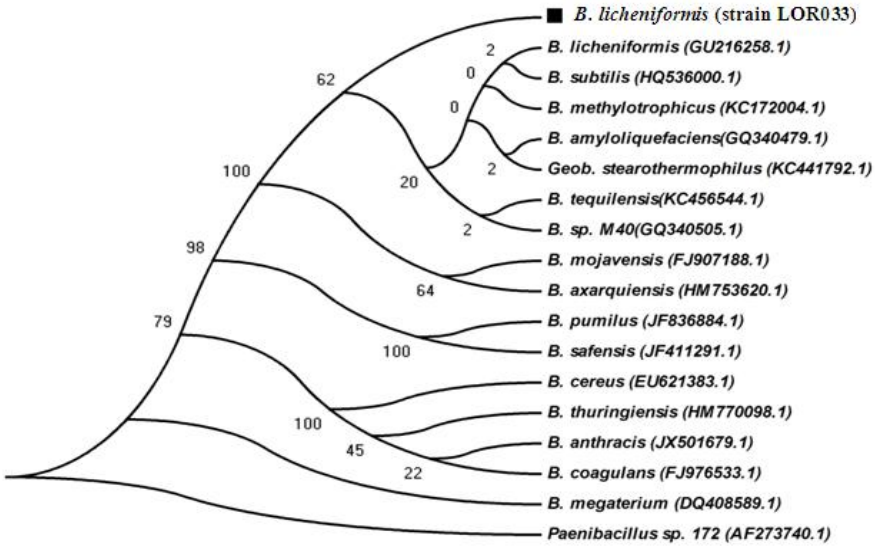
نمونه برداری از چشمه آب گرم لریا با دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها ابتدا به محیط مایع PKV با منبع تری‌کلسیم فسفات (به میزان ۰/۵درصد)، تلقیح و در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت این محیط‌ها تعویض و به مدت ۳ روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط‌ها روی محیط‌های جامد PKV با منبع تری‌کلسیم فسفات کشت داده و در گرمخانه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت میزان هاله اطراف کلونی‌ها بررسی شد (شکل ۱). باکتریی که بیش‌ترین هاله را نشان داد به‌عنوان سوش بهینه برای مطالعات بعدی استفاده شد. با توجه به این‌که در اثر حل‌کنندگی فسفات اسیدیته محیط کاهش می‌یابد، ضروری است که باکتری حل‌کننده فسفات بتواند اسیدیته پایین را تحمل کند. باکتری‌های این چشمه با توجه به اسیدیته محیط زیست خود، توانایی زندگی در اسیدیته پایین را دارا هستند.



شکل ۱- باکتری حل‌کننده فسفات در محیط PKV

تعیین گونه میکروارگانیسم با استفاده ۱٦s rDNA

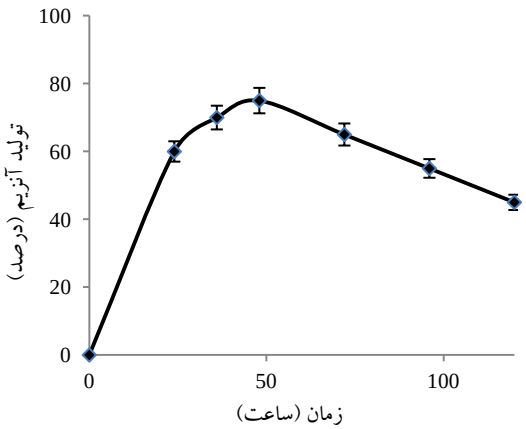
با استفاده از اطلاعات حاصل از توالی ژن ۱۶S rDNA تعیین گونه باکتریایی انجام شد (۱۹). DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA سیناکلون استخراج شد و DNA تکثیر یافته، به طول ۱۴۰۰ نوکلئوتید، توسط کیت تخلیص DNA شرکت سیناژن از روی ژل تخلیص و سپس برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره) ارسال شد. پس از تعیین توالی، برای ژن مورد نظر در مقایسه با سایر ژن‌های ۱۶S rDNA درخت فیلوژنتیکی رسم شد. رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA4 و مقایسه توالی ۱۶S rDNA باکتری LOR033 با ۱۹ گونه‌های باسیلوس موجود در مرکز ملی بیوتکنولوژی NCBI انجام شده است (۲۰ و ۲۱). نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که گونه فوق به *B. licheniformis* شباهت دارد که میزان شباهت نوکلئوتیدی آن‌ها ۹۷ درصد است (شکل ۲).



شکل ۲- درخت فیلوژنی باکتری

بررسی تولید آنزیم در طی زمان‌های گرمخانه‌گذاری

نتایج حاصل از شکل ۳ نشان می‌دهد که میزان تولید آنزیم تا ۴۸ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری افزایش در خور توجهی نشان می‌دهد ولی پس از آن به تدریج کاهش می‌یابد. به طوری که پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری میزان تولید آنزیم نصف مقدار بیشینه گزارش می‌شود. هم‌زمان با تعیین بهینه زمان تولید آنزیم، اسیدیته محیط کشت نیز اندازه‌گیری شد. اسیدیته اولیه محیط کشت ۶/۸۰ بود که پس از ۲۴ ساعت این میزان کاهش یافت و محیط اسیدی‌تر شد.



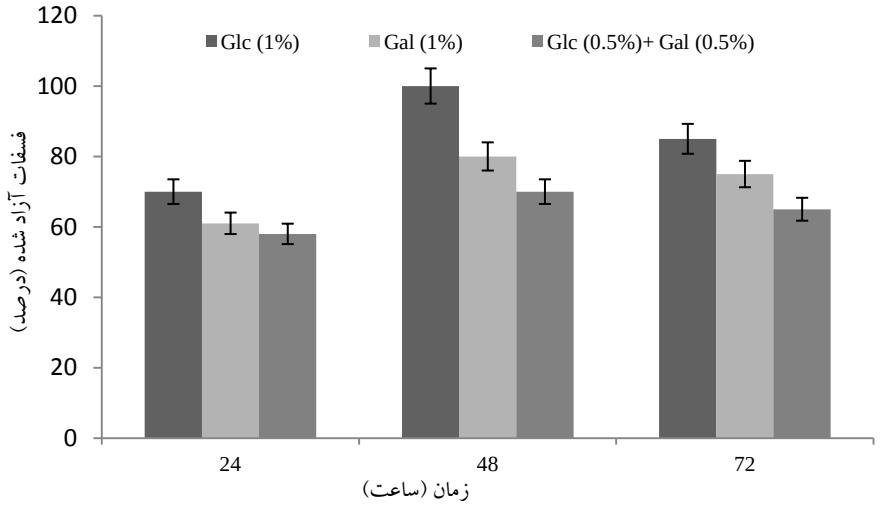
شکل ۳- منحنی تولید آنزیم در طی زمان

بررسی اثر عوامل مختلف بر قدرت حل‌کنندگی فسفات

اثر منابع کربنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

منبع کربن به عنوان عامل مهم و موثر در رشد و متابولیسم میکروبی است. حتی سرعت رشد ویژه به‌وسیله شرایط مختلف محیطی، به ویژه، پیچیدگی محیط کشت و ماهیت منبع کربن و انرژی اصلی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بنابراین، یکی از راه‌های افزایش تولید متابولیت در باکتری‌ها، تعیین بهترین منبع کربن است که بالاترین اثر را در رشد یا بیش‌ترین تولید دارد. برای تعیین بهینه‌سازی منبع کربن، باکتری مورد نظر در محیط PKV در دمای ۴۰ درجه کشت داده شد. در این محیط از ۳ نوع منبع کربن گلوکز، گالاکتوز و گلوکز+گالاکتوز به عنوان منبع انرژی استفاده شدند و میزان حل‌کنندگی فسفات آن‌ها بررسی شد.

نتایج حاصل در شکل۴ نشان می‌دهد که میزان فسفات آزاد شده در محیط واجد گلوکز به میزان در خور توجهی از سایر محیط‌ها بیشتر است. البته بیش‌ترین میزان تولید در تمام محیط‌ها در زمان ۴۸ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری گزارش می‌شود و پس از آن کاهش می‌یابد. نتایج خاطر نشان می‌سازد که میزان رهاسازی فسفات در محیط واجد گلوکز در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری به ترتیب ۷۰ و ۸۵ درصد میزان بهینه (۴۸ ساعت) است. از این رو محیط واجد گلوکز، محیط مناسب‌تری برای تولید آنزیم و افزایش قدرت حل‌کنندگی فسفات در شرایط آزمایشگاه گزارش می‌شود.

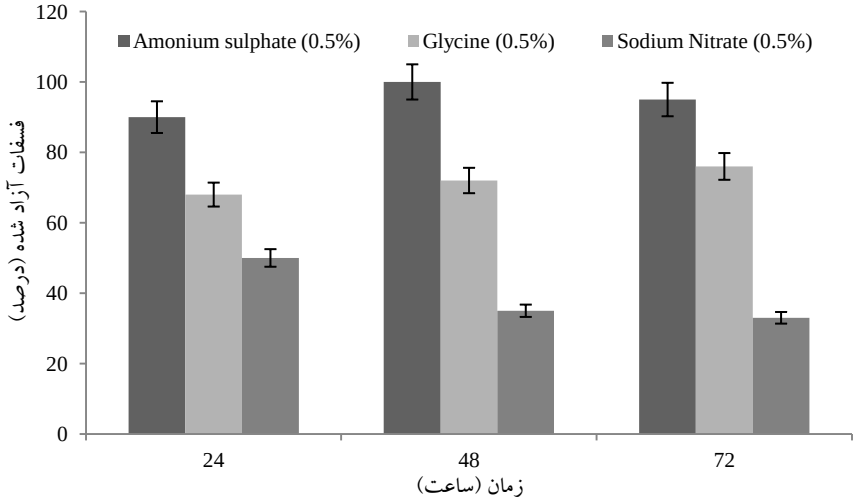


شکل ۴- اثر منابع کربنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

اثر منابع نیتروژنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

منبع نیتروژن از عوامل مهم در رشد و تولید محصولات میکروبی است. همچنین، باید توجه داشت که باکتری در مصرف منبع نیتروژن، به انرژی نیاز دارد. به عنوان نمونه مصرف موادی مانند نیترات نسبت به آمونیاک به انرژی بیشتری در باکتری نیاز دارد. بنابراین، بر روی سرعت رشد و در نهایت محصولات میکروبی موثر است. برای بهینه‌سازی منبع نیتروژن برای رهاسازی فسفات، با توجه به مقاله‌های مشابه، ۳ نوع ترکیب متفاوت شامل: آمونیوم سولفات، گلیسین و نیترات سدیم با غلظت (۰/۵ درصد) استفاده و میزان فسفات رها شده در طی زمان اندازه‌گیری شد (۲۲ و ۲۳).

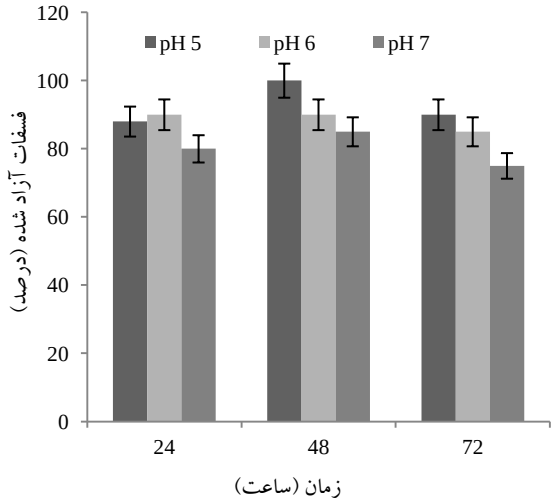
نتایج بهینه‌سازی منبع نیتروژن برای باکتری مورد نظر نشان داد که در محیط واجد آمونیوم سولفات، در هر ۳ روز، بیش‌ترین میزان تولید آنزیم به دست آمد (شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تاثیر قابل ملاحظه‌ایی در تولید آنزیم در محیط واجد گلیسین ندارد. بالاترین و کم‌ترین تولید آنزیم به ترتیب در محیط‌های واجد آمونیوم سولفات و سدیم نیترات گزارش می‌شود. زمان ۴۸ ساعت بهترین زمان تولید آنزیم برای محیط واجد آمونیوم سولفات گزارش می‌شود. در این زمان میزان تولید آنزیم در محیط‌های واجد گلیسین و سدیم نیترات به ترتیب ۷۰ و ۳۰ درصد محیط واجد آمونیوم سولفات است.



شکل ۵- اثر منابع نیتروژنی بر میزان حل‌کنندگی فسفات

اثر اسیدیته محیط بر میزان حل‌کنندگی فسفات

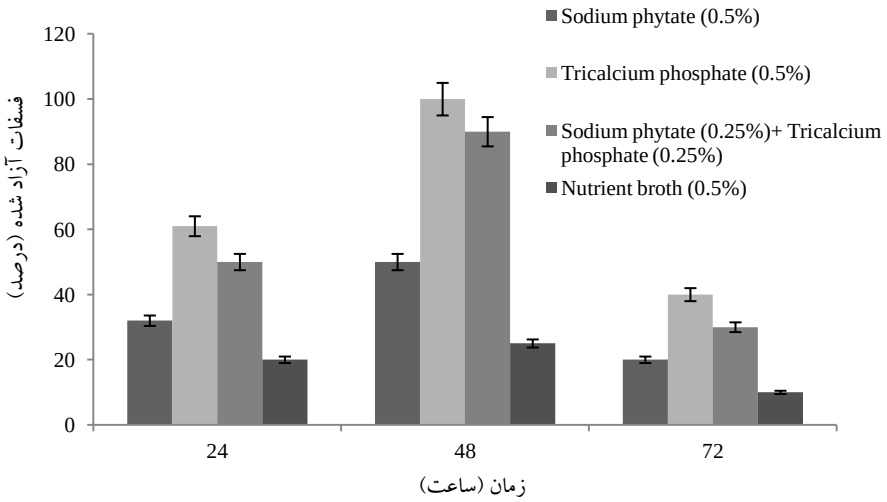
برای بررسی تاثیراسیدیته محیط، باکتری مورد نظر در محیط PKV با سه نوع اسیدیته متفاوت (۵، ۶ و ۷) کشت داده شد و به مدت ۳ روز تولید آنزیم و میزان فسفات آزاد شده بررسی شد. بیش‌ترین میزان تولید آنزیم در اسیدیته ۵ پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. به نظر می‌رسد که اسیدیته ۶ تأثیر قابل ملاحظه‌ایی در تولید آنزیم و حل‌کنندگی فسفات نشان نمی‌دهد. قدرت حل‌کنندگی فسفات در اسیدیته ۷ در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری تاثیر قابل ملاحظه ایی را نشان نمی‌دهد؛ ولی پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد. میزان تولید آنزیم در اسیدیته‌های ۶ و ۷ به ترتیب ۹۰ و ۸۵ درصد میزان بهینه (اسیدیته ۵) است (شکل ۶). این نتایج قابلیت استفاده از این باکتری را در خاک‌های اسیدی نشان می‌دهد.



شکل ۶- اثر اسیدیته بر میزان حل‌کنندگی فسفات

اثر منابع فسفات بر میزان حل‌کنندگی فسفات

برای بهینه‌سازی منبع فسفات، باکتری مورد نظر در محیط PKV یک بار با فیتات به عنوان منبع فسفات (محیط پایه PKV) و یک بار با تری کلسیم فسفات (فسفر رایج خاک) و بار دیگر فیتات (۰/۲۵ درصد) + تری کلسیم فسفات (۰/۲۵ درصد) بررسی شدند. همچنین، محیط نوترینت براث (فاقد فسفات افزودنی) هم به کار رفت. باکتری‌ها در دمای ۴۰ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده شدند و در نهایت تولید آنزیم آن‌ها به مدت ۳ روز اندازه‌گیری شد.



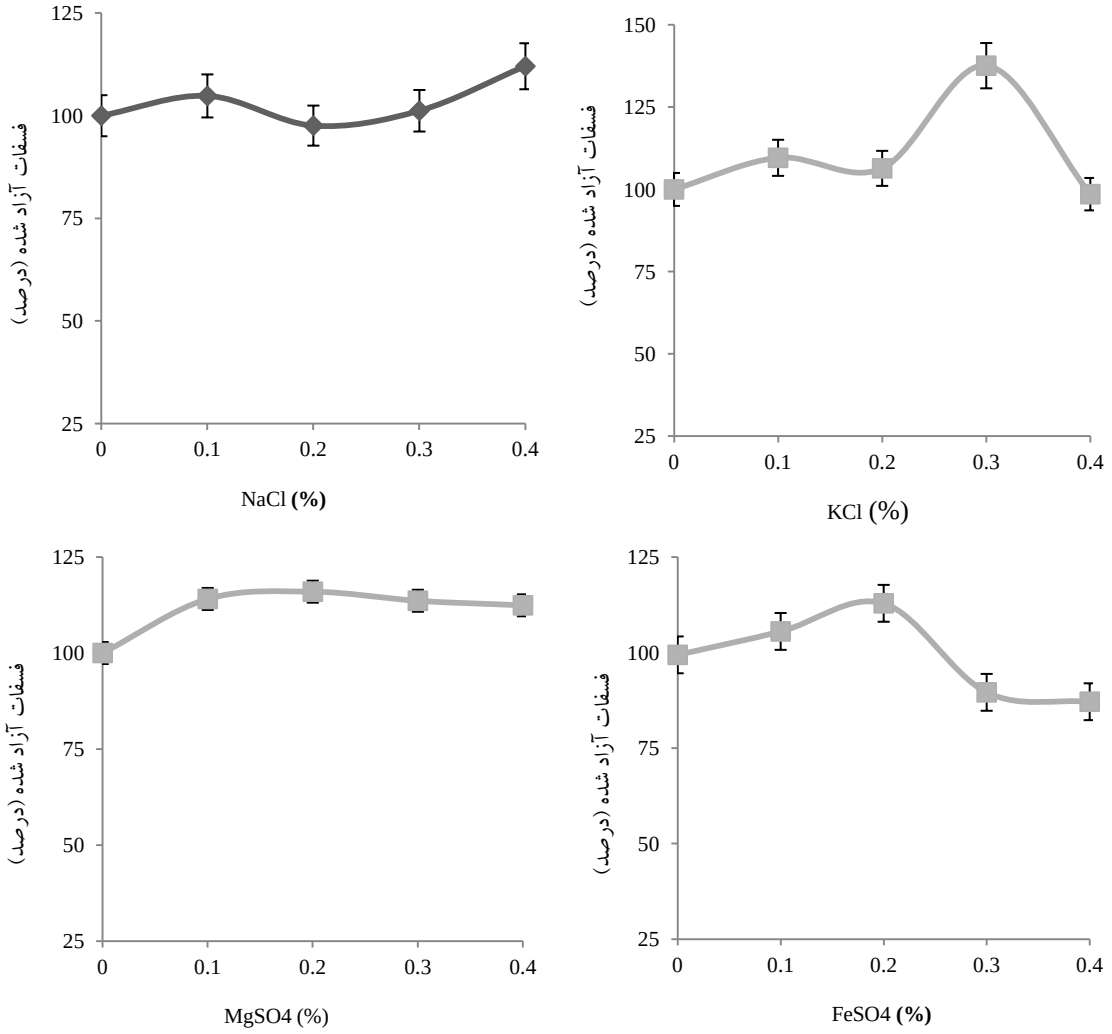
شکل ۷- اثر منابع فسفات بر میزان حل‌کنندگی فسفات

نتایج نشان دادند که در هر ۳ روز بیش‌ترین تولید آنزیم در محیط واجد تری‌کلسیم فسفات حاصل شد که بیشینه آن پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری بدست آمد. پس از آن محیط دارای سدیم فیتات+ تری کلسیم فسفات بالاترین فعالیت را پس از ۴۸ ساعت داشت که میزان آن ۹۰ درصد مقدار بیشینه تولید آنزیم بود. تولید آنزیم محیط واجد سدیم فیتات پس از ۴۸ ساعت در جایگاه سوم قرار داشت. همه محیط‌ها پس از ۷۲ ساعت تا حدود قابل ملاحظه‌ایی تولید آنزیم خود را از دست داده اند. علاوه بر این نسبت تفاوت میزان تولید آنزیم محیط‌ها در هر روز، در طی هر سه روز تقریبا ثابت باقی ماند (شکل ۷).

اثر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان حل‌کنندگی فسفات

برای این منظور از نمک‌های NaCl، KCl، MgSO4 و FeSO4 با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ در محیط PKV تهیه شد و باکتری مورد نظر در این محیط‌ها کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت میزان فسفات آزاد شده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تولید آنزیم در حضور غلظت ۰/۴ درصد NaCl به میزان ۱۰ درصد افزایش داشت. بیش‌ترین میزان تولید آنزیم در حضور ۰/۳ درصد KCl به میزان ۴۰ درصد افزایش بود. در حضور غلظت‌های مختلف MgSO4 تولید آنزیم به میزان یکسان حدود ۱۵ درصد افزایش داشت. در حضور FeSO4 تا ۰/۲ درصد تولید آنزیم به میزان ۲۰ درصد

افزایش پیدا کرد ولی پس از آن با افزایش غلظت، کاهش پیدا کرد و در غلظت ۰/۴ درصد به حدود ۸۰ درصد مقدار اولیه کاهش پیدا نمود (شکل ۸). این نتایج خاطر نشان می‌سازد که این باکتری قابلیت تولید آنزیم و قدرت حل‌کنندگی فسفات در حضور غلظت‌های مختلف نمک‌ها را داراست که قابلیت استفاده آن را در خاک‌های شور نشان می‌دهد.



شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان حل‌کنندگی فسفات

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات تولید آنزیمی نشان داد که حداکثر تولید آنزیم پس از ۲ روز گرمخانه‌گذاری است و هم‌زمان با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری اسیدیته نیز کاهش می‌یابد. در مطالعاتی که توسط حسین خانی و همکارانش[5] در خصوص زمان بهینه تولید فسفاتاز توسط یکی از گونه‌های باکتری *سودوموناس* (جداسازی شده از فضولات ماکیان) انجام شد، مشخص شد که این باکتری پس از ۷۲ ساعت بهترین تولید آنزیم را داشته است (۲۲). این در حالی است که ساسیرخا و همکارانش[6] گزارش کردند که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا P6* (جداسازی شده از خاک) پس از ۲۴ ساعت، بیش‌ترین

تولید آنزیم را داشت (۲۳). شایان ذکر است که در برخی مطالعات، زمان بهینه فعالیت با تغییر نوع محیط کشت باکتری تغییر یافت. کاهش اسیدیته مشاهده شده در اثر تولید آنزیم و رها شدن فسفات معدنی به محیط به تدریج روی تولید آنزیم نیز اثر منفی می‌گذارد.

بررسی منابع کربنی در میزان حل‌کنندگی فسفات نشان داد که گلوکز مناسب‌ترین منبع کربنی در تولید آنزیم و رهاسازی فسفات است. در تحقیقات حسین‌خانی و همکارانش باکتری *سودوموناس* بیش‌ترین تولید آنزیم را در محیط دارای گلوکز+ساکارز به عنوان منبع کربن داشت (۲۲). همچنین، در آزمایش‌های ساسیرخا و همکارانش، باکتری *سودموناس آئروژینوزا P6*، در محیط واجد گلوکز به میزان زیادی آنزیم سنتز کرد (در مقایسه با محیط‌های دیگر دارای منبع کربن مختلف) (۲۳).

در تحقیقاتی که چاندرا شخارنایوتیال و همکارانش[۷] بر روی بهینه‌سازی منبع کربن برای ۴ باکتری حل‌کننده فسفات جدا شده از خاک‌های قلیایی انجام دادند، مشاهده شد که برای دو سویه، گزیلوز و یکی از باکتری‌ها، لاکتوز و دیگری گلوکز از بهترین منابع کربن هستند و در واقع سویه‌ها از نظر منبع کربن مناسب با هم اختلاف داشتند (۱۴). همچنین، در مطالعه دیگری توسط ترافدار[۸] روی باکتری‌های حل‌کننده فسفات جهش یافته، گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن مشاهده شد (۱۰). به طور کلی با استنباط از این آزمایش و مطالعات دیگران می‌توان نتیجه گرفت که تاثیر تغییر منبع کربن با سویه حل‌کننده و سایر شرایط مرتبط است. نتایج بهینه‌سازی منبع نیتروژن و اندازه‌گیری میزان رشد نشان داد که آمونیوم سولفات مناسب‌ترین منبع نیتروژنی برای رشد باکتری و تولید آنزیم مورد نظر است که زمان بهینه در حل‌کنندگی فسفات نیز ۴۸ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری گزارش می‌شود. ساسیرخا و همکارانش در بررسی منبع نیتروژن بهینه برای باکتری *سودوموناس آئروژینوز P6* نتیجه گرفتند که این باکتری در محیط حاوی عصاره مخمر، بیش‌ترین تولید آنزیم را دارد (۲۳). در حالی که حسین خانی و همکارانش نتیجه گرفتند که باکتری *سودوموناس* جداسازی شده از خاک، در محیط واجد عصاره جو، بیش‌ترین تولید را دارد (۲۲). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که منبع نیتروژن بهینه برای باکتری‌های مختلف، متفاوت است.

چاندرا شخارنایوتیال و همکارانش گزارش کردند که در ۴ سویه مورد مطالعه، ۲ مورد حل‌کنندگی بیش‌تری در نیترات پتاسیم و یکی از آن‌ها در نیترات سدیم و دیگری در نیترات کلسیم داشتند. همچنین، آن‌ها اعلام کردند که به نظر می‌رسد باکتری‌های حل‌کننده فسفات دارای مکانیسم‌های متفاوت و تطبیق‌پذیری برای حل‌کنندگی فسفات باشند و به همین دلیل این باکتری‌ها در منابع متفاوت از هم، بالاترین حل‌کنندگی را نشان می‌دهند که این موضوع بر خلاف قارچ‌های حل‌کننده فسفات است که فقط از طریق دو مکانیسم (تولید اسید) عمل می‌کنند (۱۴). همچنین، سانگتا متا و شخار نایوتیال نشان دادند در سویه‌های موتانت مورد بررسی، آمونیوم سولفات بیش‌ترین تاثیر را دارد (۱۰).

بررسی حل‌کنندگی فسفات در حضور اسیدیته‌های مختلف نشان داد که اسیدیته ۵ مناسب‌ترین است. البته باید توجه داشت که رشد باکتری و متابولیت‌های میکروبی در مدت ۳ روز نیز باعث تغییر اسیدیته اولیه محیط کشت می‌شود. بنابراین، بر خلاف دیگر عامل‌های

موثر برای بهینه‌سازی تولید آنزیم (مانند منبع کربن، فسفات و نیتروژن) ، میزان اسیدیته محیط متغیر است.

ساسیرخا و همکارانش گزارش کردند که ماکزیمم تولید فیتاز توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* P6 در اسیدیته ۶ به دست آمد و در حدود ۸۰ اسیدیته فعالیت در محدوده اسیدیته ۴ تا ۷/۵ مشاهده شد. همچنین، با افزایش اسیدیته، تولید آنزیم کاهش یافت، به طوری که فقط ۳۰ اسیدیته فعالیت در ۱۰ اسیدیته به دست آمد (۲۳). باکتری در محیط دارای اسیدیته ۵، مشابه محیط دارای اسیدیته ۶ و حتی بیشتر از این محیط عمل می‌کند. بنابراین، با تغییر شرایط محیط که به علت رشد و فعالیت باکتری است، فعالیت حل‌کنندگی در محیط‌ها در زمان‌های مختلف، با هم تفاوت پیدا می‌کند. اما در این باکتری هم به نظر می‌رسد که محدوده اسیدیته بهینه ۵ تا ۶ است. در باکتری حل‌کننده فسفات *Pantoea stewartii subsp. stewartii g6* بیش‌ترین تولید در اسیدیته ۵ مشاهده شد (۲۴). البته شخارنایوتیال و همکارانش مشخص کردند که در سویه‌های PSB جدا شده از خاک‌های قلیایی در اسیدیته ۸ و بالاتر (یکی از سویه‌ها در اسیدیته ۱۲) بالاترین حل‌کنندگی را نشان می‌دهند. این موضوع به علت تطابق سویه‌های جدا شده از محیط بومی قابل توجیه بود (۱۴).

اثر منابع مختلف فسفات نشان داد که تری‌کلسیم‌فسفات اثر در خور توجهی در افزایش تولید آنزیم در طی ۳ روز گرمخانه‌گذاری دارد. شایان ذکر است که علاوه بر نوع منبع فسفات، غلظت بالای فسفات نیز به عنوان مهار کننده سنتز فسفاتازها شناخته شده است، در حالی که میزان محدود فسفات باعث بیان بالای این آنزیم‌ها می‌شود. باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* P6 در محیط دارای غلظت فیتات سدیم (۱/۵ درصد)، بالاترین تولید آنزیم را نشان می‌دهد. در حالی که در غلظت بالاتر، میزان تولید آنزیم کاهش می‌یابد (۲۳). در مطالعات حسین خانی و همکارانش، باکتری *سودوموناس* در ۳ محیط نوترینت براث، محیط PKV واجدتری کلسیم فسفات و محیط PKV دارای فیتین به عنوان منبع فسفات کشت داده که بهترین تولید آنزیم را در فیتین داشت. در این مورد ممکن است فیتات سدیم، تولید فیتاز را القا کند (۲۲). اثر غلظت‌های مخلف نمک بر قدرت حل‌کنندگی نشان داد که در غلظت ۰/۱ درصد، تمامی نمک‌ها افزایش در خور توجهی در تولید آنزیم دارند. بیش‌ترین افزایش در میزان حل‌کنندگی فسفات به میزان ۴۰ درصد در حضور ۰/۳ درصد KCl مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و صندوق حمایت از پژوهشگران و فن آوران کشور (INSF) انجام شده است که بدین‌وسیله از ایشان قدردانی و سپاسگزاری می‌شود.

References

(1) Katznelson H, Peterson EA, Rovatt JW. Phosphate dissolving microoganisms on seed and in the root zoneof plants. *Can J Bot* 1962; 40 (9):1181–86.

(2) Abd-Alla MH. Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiol* 1994; 39 (1): 53-6.

(3) Ohtake H, Wu H, Imazu K, Ambe Y, Kato J, Kuroda A. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *A Res Conserv and Recycling* 1996; 18 (4):125–34.

(4) Roychoudhury P, Kaushik BD. Solubilization of mussorie rock phosphate by cyanobacteria. *Curr Sci* 1989; 58 (1): 569–70.

(5) Stevenson FJ. Cycles of Soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. New York: *John Wiley and Sons*; 2005.

(6) Fageria NK. The use of nutrients in crop plants. NewYork :CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC: 2009.

(7) Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize Rhizosphere. *Intl J Agric Biol* 2002; 4 (1): 454-8.

(8) Banik S, Dey BK. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 1982; 69 (1): 353-64.

(9) Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* 1992; 24 (4): 389–95.

(10) Tarafdar JC, Junk A. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organicphosphorus. *Biol Fertil Soil* 1987; 3 (4): 199–204.

(11) Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 1999; 17 (5): 319–39.

(12) Kudashev IS. The effect of phosphobacter in on the yield and protein content in grains of autumm wheat, maize and soybean. *Doki Akad Skh Nauk* 1956; 8 (1): 20-23.

(13) Krasilinikov NA. On the role of soil micro-organism in plant nutrition. *Microbiologiya*. 1957; 26 (1): 659-72.

(14) Shekhar Nautiyal C, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R, Verma D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 182 (2):291-6.

(15) Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils* 2011; 47 (4): 437–46.

(16) Raghu K, MacRae IC. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the

rhizosphere of riceplants and in submerged soils. *J Appl Bacteriol* 1966;29 (3): 582–86.

(17) Badoei Dalfard A, Khajeh Kh, Soudi M R, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Sajedi HR. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium, *Enzyme Microb Technol* 2006; 39 (7): 1409-16.

(18) Mehta S, Shekhar Nautiyal C. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr Microbiol* 2001; 43 (1): 51–6.

(19) Sambrook, J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. NewYork: Cold Spring Harbor; 2001.

(20) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24 (8): 1596-99.

(21) Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS, Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, 2003; 4 (4) : 440–8.

(22) Hosseinkhani B, Emtiazi G, Nahvi I. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production, *Afr J Biotechnol* 2009; 8 (17): 4229-32.

(23) Sasirekha B, Bedashree T, Champa KL, Statistical optimization of medium components for improved phytase production by Pseudomonas aeruginosa, *Inter J ChemTech Res* 2012; 4 (3): 891-95.

(24) Hu XJ, Li ZJ, Cao YC, Zhang J, Gong YX, Yang YF. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium Pantoea stewartii subsp. stewartii g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. *Aquacult Int* 2010; 18 (6): 1079–91.

---

[1]. phosphine
[2]. *Bacillusmegaterium var. phosphoricum*
[3]. Bioneer
[4]. Molybdenum blue
[5]. Hosseinkhani et al
[6]. Sasirekha et al.
[7]. Shekhar Nautiyal et al
[8]. Tarafdar

Isolation of phosphatase-producing phosphate solubilizing bacteria from Loriya hot spring: Investigation of phosphate solubilizing in the presence of different parameters

Maryam Parhamfar
M.Sc. of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, mary_parhamfar@yahoo.com
Arastoo Badoei-Dalfard *
Assistant Professor of Biochemistry, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, badoei@uk.ac.ir
Mouj Khaleghi
Assistant Professor of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, mjkhaleghi@yahoo.com
Mehdi Hassanshahian
Assistant Professor of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, hasanshahi@gmail.com

Abstract

Introduction: Biofertilizers are the microorganisms that can convert useless nutrient to usable compounds. Unlike fertilizer, cost of biofertilizer production is low and doesn't produce ecosystem pollution. Phosphate fertilizers can be replaced by phosphate biofertilizer to produce improvement. So, it is necessary to screen the climate-compatible phosphate solubilizing bacteria.

Materials and methods: In this project samples were picked up from Loriya hot spring, which are located in Jiroft. Samples were incubated in PKV medium for 3 days. Screening of phosphate solubilizing bacteria was performed on the specific media, based on clear area diameter. The best bacterium was identified based on 16s rDNA gene. Phosphate solubilizing activity of this strain was considered in different carbon, nitrogen, phosphate and pH sources.

Results: Sequence alignment and phylogenetic tree results show that *B. sp.* LOR033 is closely related to *Bacillus licheniformis*, with 97% homology. In addition, results show that maximum enzyme production was performed after 2 days that incubation pH was decreased simultaneously when the time was increased. Carbon sources investigation show that glucose is the most appropriate in enzyme production and phosphate releasing. Furthermore, results show that the optimum initial pH for phytase production was pH5.0. Different phosphate sources show that tricalcium phosphate has the suitable effect on enzyme activity in three days of incubation.

Discussion and conclusion: Phosphatase enzyme production capacity, growth in acidic pH and phosphate solubilizing potential in different salt and phosphate sources show that this strain has considerable importance as biofertilizers.

Key words: Screening, Hot spring, Phosphate-Solubilizing Bacteria, Phosphatase

* Corresponding author
Received: August 17, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013