

Study on phosphate solubilizing ability of some bacterial isolates and determination of solubilized phosphorus fractionation in supernatant and microbial biomass

Mitra Ebrahimi

PhD of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-AliSina University of Hamedan, Iran,
mtrr_ebrahimi@yahoo.com

Ali Akbar Safari-sinegani

Professor of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-AliSina University of Hamedan, Iran,
safari_sinegani@yahoo.com

Mohammad-Reza Sarikhani*

Associate Professor of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran rsarikhani@yahoo.com

Nasser Aliasgharzarad

Professor of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran, n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Abstract

Introduction: Phosphate solubilizing bacteria play roles in phosphate solubilizing from mineral sources. These bacteria with different mechanisms make it soluble, some parts of solubilized P were absorbed in their biomass and the other parts, released in the soluble form which can be used by other organisms.

Materials and methods: In this study, 24 bacterial isolates belonged to different genera such as *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Microbacterium* and *Citrobacter* were examined to determine solubilized P from two sources of phosphate (TCP and RP) in Sperber medium. This research was carried out in a complementary random design with three replications. At the end of incubation time, solubilized P in supernatant, amount of P in biomass and total solubilized P were measured.

Results: The results showed that isolates are efficient in solubilizing P from TCP than RP. By decreasing pH, solubilized P was increased ($r=0.775$, $p<0.01$) and it followed by increasing EC ($r=0.789$, $p<0.01$). Highest P in supernatant was measured in media inoculated with *Pseudomonas*, *Azotobacter* and *Agrobacterium*. Maximum absorbed P in biomass was determined in *Agrobacterium* and *Citrobacter* isolates. However, total solubilized P including (phosphorus in supernatant and phosphorus in biomass) were the highest in *Agrobacterium* and *Citrobacter* (527.4 and 460.8 mg/l, respectively). Highest bio-absorption percent (P biomass/ P added) was recorded in *Klebsiella* sp. 4A-1 (44.44%) and *Agrobacterium* sp. 22SP-1 (42.33%), and maximum P solubilization rate (P supernatant/ P solubilized total) was observed in *Pseudomonas* sp. 34SPIII (0.51) and *Azotobacter chroococcum* 44SP-2 (0.5).

Discussion and conclusion: In most researches, solubilized P which is present in supernatant takes more attention but phosphorus in biomass is ignored which can be mineralized and available with a delay. This study showed that most parts of solubilized P were measured in microbial biomass. Hence, attention to this criterion could help us to select efficient PSB.

Key words: Phosphate solubilizing bacteria, Tricalcium phosphate, Rock phosphate, Phosphorus in biomass, Phosphorus in supernatant

* Corresponding author

Received: February 12, 2017 / **Accepted:** April 15, 2017

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۱۰۹-۱۲۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

بررسی توان برخی جدایه‌های باکتری در حل فسفات و تعیین چگونگی پخش فسفر حل شده در دو بخش محلول و زیتوده میکروبی

میترا ابراهیمی: دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، mtrr_obrahimi@yahoo.com
علی اکبر صفری سنجانی: استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، safari_sinegani@yahoo.com
محمدرضا ساریخانی*: دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تبریز، ایران، rsarikhani@yahoo.com
ناصر علی اصغرزاد: استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تبریز، ایران، n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

چکیده

مقدمه: باکتری‌های حل‌کننده فسفر با استفاده از سازوکارهایی به حل فسفات معدنی کمک و بخشی از فسفر محلول را در زیتوده خود جذب و بخش دیگر را در فاز محلول رها می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، توانایی حل فسفات ۲۴ جدایه باکتری از جنس‌های *ازتوباکتر*، *سودوموناس*، *ریزوبیوم*، *بیجرینکیا*، *کلبسیلا*، *اگروباکتریوم*، *اسفینگوموناس*، *میکروباکتریوم*، *اکروموباکتر* و *سیتروباکتر* با بهره‌گیری از دو کانی تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات در کشتگاه اسپربر مایع بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام و سپس فسفر روشن‌آور، فسفر زیتوده میکروبی و همه فسفر رهاشده از کانی‌ها اندازه‌گیری شدند.

نتایج: یافته‌ها نشان دادند که جدایه‌ها توانایی بیشتری برای انحلال فسفر از تری کلسیم فسفات در مقایسه با سنگ فسفات دارند. با کاهش اسیدیته، میزان فسفر حل شده افزایش ($r = -0.775^{**}$) یافت و افزایش انحلال فسفر با افزایش رسانایی الکتریکی ($r = 0.789^{**}$) همراه بود. بیشترین میزان فسفر در بخش روشن‌آور در کشت جنس‌های *سودوموناس*، *ازتوباکتر* و *اگروباکتریوم* دیده شد و بیشترین میزان فسفر زیتوده میکروبی را جدایه‌های *اگروباکتریوم* و *سیتروباکتر* داشتند. به هر حال، همه فسفر رهاشده از کانی‌ها (فسفر روشن‌آور و زیتوده) در کشت *اگروباکتریوم* و *سیتروباکتر* (به ترتیب ۵۲۷/۴ و ۴۶۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) بیشتر بود. بیشترین درصد جذب زیستی (فسفر زیتوده به فسفر افزوده شده در کشتگاه) به ترتیب در کشت جدایه‌های *Klebsiella sp. 4A-1* (۴۴/۴۴ درصد) و *Agrobacterium sp. 22SP-1* (۴۲/۳۳ درصد) و بیشترین نسبت فسفر روشن‌آور به فسفر زیتوده در کشت جدایه *Pseudomonas sp. 35SP-2* و *Klebsiella sp. 47A1-3* (به ترتیب با اندازه‌های ۳/۱۳ و ۲/۹۱ در کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات به دست آمد).

بحث و نتیجه‌گیری: در بیشتر پژوهش‌ها، بخش فسفر رهاشده بررسی و از فسفر زیتوده باکتری چشم‌پوشی می‌شود؛ فسفر زیتوده باکتری دوباره کانی می‌شود و در دسترس قرار می‌گیرد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که بیشتر فسفر در زیتوده میکروبی قرار دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، تری کلسیم فسفات، سنگ فسفات، فسفر زیتوده میکروبی، فسفر روشن‌آور

* نویسنده مسؤل مکاتبات

مقدمه

پس از نیتروژن، فسفر دومین و مهم‌ترین عنصر غذایی لازم برای رشد و نمو گیاهان و ریزجانداران است. فسفر، عنصر غذایی کاهش‌دهنده رشد گیاه به‌ویژه در خاک‌های آهکی است و همانند نیتروژن در اتمسفر یافت نمی‌شود تا با فرایندهای زیستی برای گیاهان فراهم و سبب رشد و گسترش ریشه، ساقه و بذر گیاهان شود. فسفر در فرایندهای ویژه یاخته‌ای مانند فتوسنتز، تنفس، تقسیم یاخته‌ها و چندین فرایند مهم دیگر در گیاه زنده کارایی دارد (۱). به هر حال، بیشترین میزان فسفر خاک (۹۵ تا ۹۹ درصد) به شکل فسفر نافراهم است و گیاهان از آن بهره‌مند نمی‌شوند. ویژگی‌هایی مانند آب و نمناکی خاک، سوخت‌وساز گیاه و اسیدیته محلول خاک بر جذب فسفر ریشه مؤثر هستند (۲). بنابراین، کشاورزان برای برآوردن نیاز فسفر گیاهان از کودهای شیمیایی بهره‌گیری می‌کنند که ته‌نشستی به شکل نافراهم تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات هستند (۳). فسفر به میزان بسنده‌ای در خاک یافت می‌شود ولی دسترسی و زیست‌فراهمی آن به شکل فسفات‌های آهن و آلومینیوم در خاک‌های اسیدی و فسفات کلسیم در خاک‌های آهکی بسیار کم و میزان آنها به دلیل ظرفیت تثبیت زیاد آنها در خاک کم است (۴) بنابراین باکتری‌های حل‌کننده فسفات از راه‌های گوناگون اندوخته‌های فسفوری خاک را برای گیاهان فراهم‌تر می‌کنند. پرداختن به راهکارهای زیستی با نگاه به آلودگی‌های زیست‌محیطی و گران‌بودن کودهای شیمیایی در سال‌های گذشته سبب جلب توجه بیشتر شده است. بنابراین از ریزجانداران خاک که توانایی انجام فرایندهای زیستی گوناگون را دارند و در همه گام‌های دگرگونی چرخه عناصر غذایی در خاک سودمند و کارا هستند، در این

زمینه بهره‌گیری می‌شود. باکتری‌های حل‌کننده فسفات^۱ (PSB) به حل فسفات معدنی نامحلول کمک و آن را به شکل فراهم برای گیاه دگرگون می‌کنند.

باکتری‌های حل‌کننده فسفات، گروه توانمندی برای هیدرولیز فسفات‌های آلی و حل فسفات‌های معدنی نامحلول هستند (۳). سوخت و ساز ریزجانداران در راستای حل فسفات نامحلول عبارتند از: ساخت اسیدهای آلی، واکنش‌های تبدیلی و کلاته کردن (۱). مجموعه این دگرگونی بیوشیمیایی سبب باروری خاک و بهبود کارکرد ریزجانداران می‌شود (۵). رهاسازی فسفر از شکل‌های نامحلول فسفر با کمک باکتری‌های حل‌کننده فسفات در برآورد فسفر در دسترس گیاهان اهمیت بسیاری دارد. یافته‌های بسیاری توانایی باکتری‌ها برای حل فسفات را نشان می‌دهند (۶). ریزوباکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه توانایی حل فسفات از ترکیبات فسفر نامحلول همانند تری کلسیم فسفات، دی کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات را دارند (۷). گزارش شده است که از میان باکتری‌ها، جنس‌های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *ریزوبیوم*، *بورخولدریا*، *پانتوا*، *اکروموریاکتر*، *اگروباکتریوم*، *میکروکوکوس*، *فلاووباکتریوم* و *ارونینیا* همانند باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه دارای توانایی حل فسفات آلی و کانی در خاک هستند (۸ و ۹). بهره‌گیری از باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب افزایش جذب فسفر در گیاهان می‌شود و عملکرد را افزایش می‌دهد (۱۰ و ۱۱).

دو روش کیفی و کمی برای بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات ریزجانداران بهره‌گیری می‌شوند. در بررسی کیفی، ساخت هاله شفاف و یا نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی در کشتگاه جامد شناسه توانایی حل فسفات باکتری‌هاست (۱۲ و ۱۳). در بررسی کمی که در

زیستی و نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده جدایه‌ها اندازه‌گیری شدند؛ فرض بر این است که جدایه‌ای با اندازه فسفر روشناور بالا و درصد جذب زیاد، کارایی ویژه‌ای در افزایش زیست‌فراهمی فسفر در زیستگاه‌ها دارد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های آزمون شده: در مطالعه حاضر از ۲۴ جدایه باکتریایی (1A-2, 2SP-5, 3A-1S, 4A-1, 3, 4A-4, 14SPI, 14SPIII, 16SP-2, 16SP7-2, 16SP8-2, 22SP-1, 34SPIII, 34SP-2, 35SP-2, 37SP, 36A-2M, 35A, 35SP-3, 44A-AZ, 44SP-2, 47A1-3) متعلق به جنس‌های *سودوموناس*، *ازتوباکتر*، *اگروباکتریوم*، *کلبسیلا*، *اسفینگوموناس*، *ریزوبیوم*، *میکروباکتریوم*، *اکروموباکتر* و *بیجریکیا* استفاده شد. باکتری‌های یادشده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه همدان و تبریز دریافت و یافته‌های شناسایی مولکولی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- جدایه‌های آزمون شده و یافته‌های شناسایی مولکولی آنها

شناسایی مولکولی	جدایه	شناسایی مولکولی	جدایه
شناسایی نشده	34A-3	شناسایی نشده	2A-1
<i>سودوموناس</i>	34SPIII	<i>بیجریکیا</i>	2SP-5
<i>سودوموناس</i>	35SP-2	<i>کلبسیلا</i>	3A-1S
شناسایی نشده	35SP-3	<i>کلبسیلا</i>	4A-1
<i>اکروموباکتر</i>	35A	<i>ریزوبیوم</i>	12A-3
<i>سودوموناس</i>	36A-2M	<i>اگروباکتریوم</i>	14A-4
<i>اسفینگوموناس</i>	37SP	<i>ازتوباکتر</i>	14SPI
<i>بیجریکیا</i>	43SP-2	<i>اکروموباکتر</i>	14SPIII
<i>سیتروباکتر</i>	44A-4S	<i>ازتوباکتر</i>	16SP-2
<i>میکروباکتریوم</i>	44A-AZ	<i>سودوموناس</i>	16SP7-2
<i>ازتوباکتر</i>	44SP-2	شناسایی نشده	16SP8-2
<i>کلبسیلا</i>	47A1-3	<i>اگروباکتریوم</i>	22SP-1

کشتگاه آبکی و درون شیشه انجام می‌شود، اندازه فسفر در بخش روشناور که همانند فسفر محلول است، اندازه‌گیری و میزان آن به عنوان توانایی باکتری در حل فسفات معدنی گزارش می‌شود (۱۴). باکتری‌های حل‌کننده فسفات، میزانی از فسفر آزادشده را در ساختار خود جذب و انباشته می‌کنند که فسفر بی‌جنبش شده در زیتوده است. افزون بر کارکرد ریزجانداران در کانی‌شدن فسفر مواد آلی خاک، فسفر زیتوده میکروبی کارکرد بسیار مهمی در چرخه فسفر دارد و به شکل فراهم و در دسترس برای گیاهان در می‌آید (۱۵). این بخش فسفر به شکل آلی در ساختار یاخته ریزجانداران است و با کمک آنزیم‌های فسفاتاز کانی می‌شود و دوباره به شکل کانی و محلول در می‌آید (۱۶ و ۱۷). کارکرد فسفر زیتوده میکروبی در برآورد نیاز فسفر گیاهان در سال چشمگیر است و تندی دگرگونی فسفر زیتوده میکروبی به فسفر فراهم بسیار بیشتر از دیگر عناصر آلی شده در زیتوده است، در مقایسه با دیگر عناصر، بیشترین میزان فسفر زیتوده میکروبی موجود در بخش‌های گوناگون یاخته، ناپایدار هستند و تنها بخش کوچکی از فسفر در دیواره یاخته‌ای ریزجاندار است (۱۷، ۱۸ و ۱۹). در پژوهش حاضر، افزون بر بررسی فسفر حل شده در آبگونه رویی، به این بخش از فسفر انباشته شده در ساختار یاخته‌ای نیز پرداخته شده است. بررسی و اندازه‌گیری این بخش از فسفر نیز توان ریزجانداران در گشودن فسفات‌های نامحلول و افزایش زیست‌فراهمی فسفر در زیستگاه‌های گوناگون را نشان می‌دهد. از این رو، ۲۴ جدایه باکتری بهره‌گیری و توان حل‌کنندگی فسفات آنها در کشتگاه اسپربر مایع درون شیشه با بهره‌گیری از دو کانی فسفری (تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات) بررسی شد. اندازه فسفر محلول در روشناور و فسفر انباشته شده در ساختار میکروبی و درصد جذب

ساخت کشتگاه و اندازه‌گیری فسفر محلول^۲

(روشناور) و زیتوده: کشت تازه (یک‌شبه) باکتری‌ها در کشتگاه نوترینت برات انجام شد تا در آزمایش‌های پژوهش حاضر بهره‌گیری شود. برای بررسی توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌ها، هر جدایه با سه تکرار در کشتگاه اسپربر مایع (۱۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم کانی فسفر نامحلول، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم و ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم در لیتر) با بهره‌گیری از دو کانی فسفوری نامحلول (تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات) کشت شد (۲۰). اسیدیته کشتگاه پیش از سترون‌شدن و مایه‌زنی باکتری‌ها، ۷ تنظیم شد. ارلن‌های حاوی کشتگاه مایع اسپربر با ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون جوان باکتری‌ها (کشت‌شده در نوترینت برات با چگالی نوری ۰/۸) مایه‌زنی شدند. در پژوهش حاضر، تیمار شاهد تنها با ۰/۵ میلی‌لیتر کشتگاه نوترینت برات سترون مایه‌زنی شد. نمونه‌های دارای باکتری و شاهد (بدون باکتری) برای یک هفته در شیکر انکوباتور، تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری و با دور ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. برای برداشت نمونه از کشتگاه، ابتدا کشتگاه خوب هم زده و سپس ۵ تا ۱۰ دقیقه آرام رها شد تا دانه‌های آب‌آویز فسفات کانی در کشتگاه ته‌نشین شوند. سپس از بخش رویی آن نمونه‌برداری شد. ممکن است برخی از دانه‌های کانی فسفره و یاخته‌های باکتری آب‌آویز در روشناور نمونه باشند و از نمونه شاهد آزمایش (بدون باکتری) برای اندازه‌گیری و برآورد دانه‌های آب‌آویز کانی نمونه بهره‌گیری شد. برای این کار، ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های یادشده برداشته و ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰ rpm سانتی‌فیوژ شد؛ در این گام، یاخته‌های باکتری، دیگر دانه‌های آب‌آویز و

فسفات کانی به کمک سانتی‌فیوژ ته‌نشین و از آبگونه رویی جدا شدند. سپس فسفر محلول یا روشناور در آبگونه روشن رویی به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (۱۴ و ۲۱). از آنچه ته میکروتیوپ است برای اندازه‌گیری فسفر زیتوده بهره‌گیری شد. برای این کار، ۲ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۳ نرمال روی هر نمونه و شاهد آزمایش ریخته و ۵ الی ۱۰ دقیقه گرما داده شد تا ته‌نشست باکتری و کانی مانده در ته لوله سانتی‌فیوژ به‌خوبی گوارش و فسفر زیتوده و فسفر کانی مانده در آنها آزاد شوند. پس از سردشدن، چند قطره معرف فنل‌فتالین و ۲/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۳ نرمال ریخته شد تا اسید بهره‌گیری‌شده خنثی شود و سپس به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد (۲۲ و ۲۳). در این گام، فسفر به روش آبی (روش آسکوربیک‌اسید-مولیبدات) اندازه‌گیری شد که پاسخ‌دهنده‌تر از روش وانادات-مولیبدات است. این روش برای اندازه‌های کم فسفر محلول به کار می‌رود. در پایان، ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره آماده‌شده برداشته و با ۴ میلی‌لیتر محلول کاری آمونیوم‌هیپتامولیبدات، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید آمیخته شد و هم‌زمان، استانداردها نیز آماده شدند. پس از ۱۵ دقیقه از پیدایش رنگ آبی، شدت رنگ در طول موج ۷۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همان‌طور که یاد شد در کنار نمونه‌های فسفر آبگونه رویی و بخش ته‌نشین‌شده، شاهد آزمایش نیز اندازه‌گیری شد (۲۴). پس از اندازه‌گیری فسفر روشناور و بخش ته‌نشین‌شده در نمونه‌های مایه‌زنی‌شده با جدایه‌ها و شاهد، همه فسفر رهاشده از کانی بر پایه میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد. در پژوهش حاضر، همه فسفر رهاشده از کانی‌های به‌کاررفته در کشتگاه‌ها، مجموع فسفر روشناور و فسفر

نتایج

فسفر محلول: تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری فسفر در بخش روشناور و زیتوده و نیز همه فسفر رهاشده از کانی‌ها نشان داد که جدایه باکتری، کانی فسفری به کاررفته و برهم کنش آنها، پیامد چشم‌گیری از دیدگاه آماری بر ویژگی‌های یادشده دارند (جدول ۲).

آزمون میانگین‌های ویژگی‌های یادشده نشان داد که اندازه فسفر روشناور در کشت سودوموناس جدایه 35SP-2 ($263/5 \text{ mg.l}^{-1}$) و از توباکتر جدایه 44SP-2 ($257/2 \text{ mg.l}^{-1}$) در کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات، بیشترین است و از دیدگاه آماری ناهمانندی چشم‌گیری با شاهد آزمایش ($57/66 \text{ mg.l}^{-1}$) دارد. فسفر روشناور در مایه‌زنی کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات با این باکتری‌ها در مقایسه با شاهد آزمایش، افزایشی نزدیک به $3/5$ برابر را در پی داشت. پس از آن، جدایه‌های 34SPIII، 35SP-3، 14A-4 و 35A به ترتیب با میانگین $224/9$ ، $224/8$ و $206/3$ میلی‌گرم بر لیتر، بیشترین میانگین را در کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات داشتند (شکل ۱). کانی‌های گوناگون فسفری مانند هیدروکسی آپاتیت، فسفات آهن، فسفات کلسیم و مانند آنها از دیدگاه انحلال‌پذیری شیمیایی و زیستی، رفتار ناهمانندی دارند؛ خان^۴ و همکاران (۶) نشان دادند سودوموناس فلورسنس از کانی‌های تری کلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم و فسفات آهن به ترتیب 100 ، 92 و 51 میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر آزاد می‌کند. انحلال بیشتر فسفر از کانی تری کلسیم فسفات در برابر سنگ فسفات را رودریگز و فراگا^۵ (۱۰) نیز گزارش کرده‌اند. به هر حال، تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت در

زیتوده در هر کشت باکتری‌هاست. گذشته از این، در پژوهش حاضر نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده در هر کشت جدایه‌ها نیز برآورد و آزمون شد؛ این نسبت نشان می‌دهد که باکتری تا چه اندازه فسفر رهاشده را به شکل محلول و چه اندازه در یاخته خود انباشته می‌کند. درصد جذب زیستی فسفر هم شناسه دیگری است که در پژوهش حاضر برآورد و آزمون شد؛ برای برآورد کردن آن، فسفر زیتوده در کشت هر جدایه به همه فسفر به کاررفته در کشتگاه تقسیم و در 100 ضرب شد که توان انباشتگی زیستی^۳ فسفر هر جدایه را نشان می‌دهد. افزون بر این ویژگی‌ها، اسیدیته و رسانایی الکتریکی کشتگاه‌های مایه‌زنی شده با باکتری‌ها و شاهد آزمایش به کمک دستگاه‌های pH سنج و EC سنج در پایان آزمایش اندازه‌گیری شدند تا پس از بررسی دگرگونی آنها در کشت هر جدایه، هم‌بستگی دگرگونی آنها با میزان فسفر روشناور، فسفر زیتوده، همه فسفر رهاشده از کانی‌ها، نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده و درصد جذب فسفر بررسی شود.

تجزیه و تحلیل آماری: در پژوهش حاضر، آزمایش فاکتوریل بود و با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور نخست، جدایه باکتری (۲۴ جدایه باکتری، ۱ نمونه شاهد و در مجموع، ۲۵ تیمار) و فاکتور دوم کانی فسفری به کاررفته در کشتگاه اسپربر (تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات) بود. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار MSTATC انجام و آزمون میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در پایه آماری ۵ درصد انجام شد. هم‌بستگی میان ویژگی‌های بررسی شده به کمک نرم‌افزار SPSS انجام شد.

روی قارچ دیواره‌تاریک جداسازی شده از گیاه گندم در کشتگاه مایع و جامد و در شرایط درون‌شیشه انجام دادند. یافته‌های آنها نشان دادند که تمام جدایه‌ها در کشتگاه جامد قادر به انحلال فسفات کلسیم بودند اما جدایه‌ها دارای توانمندی‌های متفاوتی نسبت به هم در کشتگاه مایع بودند.

مقایسه با سنگ فسفات ناپایدارتر هستند. آلودیودی^۶ و همکاران (۲۵) میزان حل‌کنندگی فسفات را در باکتری‌های جنس‌های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *ازتوباکتر* ۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند. علاوه بر باکتری‌ها، قارچ‌ها نیز توانایی انحلال فسفات کلسیم را دارند همانند قارچ‌های دیواره‌تاریک. مشابه پژوهش یادشده را اسپانگولتی^۷ و همکاران (۲۶)

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فسفر روشناور، فسفر زیتوده و همه فسفر رهاشده از کانی‌های به کاررفته

میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	فسفر روشناور	فسفر زیتوده	همه فسفر رهاشده از کانی
جدایه باکتری	۲۴	۶۵۸۰/۹۱۷**	۱۴۵۱۳/۷۱۶**	۲۱۴۲۴/۰۰۷**
کانی فسفری	۱	۶۴۵۳۹۶/۵۵۳**	۲۸۳۶۸۹/۶۲۴**	۱۷۸۵۰۵۴/۹۱۳**
جدایه باکتری × کانی فسفری	۲۴	۵۹۸۰/۹۹۰**	۷۹۲۶/۰۵۸**	۱۶۱۵۵/۰۹۸**
خطا	۱۰۰	۱۰۴/۹۳۲	۵۲۴/۱۱۱	۷۸۶/۱۸۷
درصد ضریب دگرگونی		۱۲/۸۶	۲۰/۱۲	۱۴/۴۹

** چشمگیر در پایه آماری ۱ درصد

وابسته به ساخت اسیدهای آلی، کارایی ویژه‌ای در حل کانی‌های فسفری دارد (۱۵) و در بررسی‌های گوناگون، هم‌بستگی منفی این دو ویژگی گزارش شده است (۲۷). بهر^۸ و همکاران (۲۸)، توان حل‌کنندگی فسفات گونه‌ای از جنس *سراسیا* را در کشتگاه جامد NBRIP و کشتگاه مایع NBRIP-BPB بررسی کردند؛ تری کلسیم فسفات تنها منبع فسفر در این کشتگاه بود و یافته‌ها نشان دادند که بیشینه فعالیت حل‌کنندگی جدایه برابر ۴۴/۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. میزان اسیدیتته کشتگاه از ۷ به ۳/۱۵ کاهش یافت که ساخت انواع اسیدهای آلی مانند مالیک اسید، لاکتیک اسید و استیک اسید را نشان می‌دهد. میانگین اسیدیتته اندازه‌گیری شده برای جدایه *سودوموناس* 35SP-2 برابر ۳/۶۸ بود؛ این جدایه، کاراترین باکتری در افزایش فسفر

اندازه‌گیری اسیدیتته و رسانایی الکتریکی کشتگاه پس از مایه‌زنی باکتری‌ها و گذشت یک هفته انکوباسیون، دگرگونی چشمگیر آنها را نشان داد (جدول ۳)؛ اسیدیتته کشتگاه مایه‌زنی شده با باکتری‌ها به شکل چشم‌گیری تا ۳/۵۸ برابر اسیدیتته شاهد آزمایش کاهش و شوری کشتگاه بسته به حل شدن کانی‌ها افزایش یافت. بررسی هم‌بستگی این دو ویژگی، پیوستگی وارونه و چشمگیر آنها را نشان داد ($r = -0.706^{**}$) (شکل‌های ۴ و ۵). کاهش اسیدیتته کشتگاه‌های مایه‌زنی شده به دلیل رهاسازی اسیدهای ساخته شده از باکتری‌های مایه‌زنی شده در کشتگاه است. همان‌طور که در بسیاری از یافته‌های پژوهشگران نیز آمده است، بهره‌گیری از قندها به ویژه گلوکز در کشتگاه و اکسیداسیون آن سبب ساخت اسیدهای آلی می‌شود (۱۰). کاهش اسیدیتته

اسیدیته گزارش کردند. اگرچه یافته‌های پژوهشگران نشان می‌دهند که اسیدهای آلی سبب حل فسفات می‌شوند، چنین رابطه‌ای درباره حل فسفر از سنگ فسفات به روشنی دیده نشده و در یافته‌های برخی پژوهشگران، هم‌بستگی بسیار کمی میان اسیدیته و میزان حل فسفات در کشتگاه ریزجانداران گزارش شده است (۳۷).

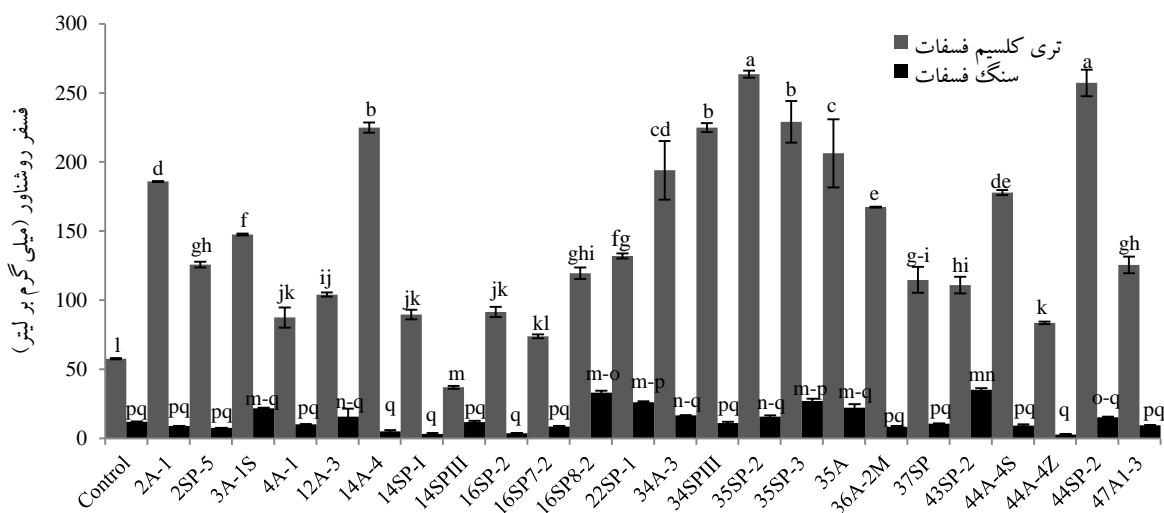
در پژوهش حاضر، میانگین فسفر رها شده در کشتگاه حاوی تری کلسیم فسفات، ۱۴۵/۲۵۷ میلی‌گرم بر لیتر و در کشتگاه حاوی سنگ فسفات، ۱۴/۰۷۸ میلی‌گرم بر لیتر بود. گوانگ-کن^{۱۳} (۳۸)، میزان فسفر محلول آزاد شده در کشتگاه مایع دارای تری کلسیم فسفات مایه‌زنی شده با برخی باکتری‌های گرم منفی را ۷۸/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر کشتگاه گزارش کرد. رفیعی و اسدی رحمانی^{۱۴} (۳۹)، با بررسی توانایی انحلال فسفر جدایه‌های فلاووباکتریوم در کشتگاه اسپریر نشان دادند که از ۴۴ جدایه آزمایش شده، ۳۴ جدایه توانایی حل‌کنندگی فسفر از تری کلسیم فسفات را از صفر تا ۳۷/۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند.

فسفر زیتوده: فسفر اندوخته شده در زیتوده میکروبی از جذب یون فسفات محلول در کشتگاه و به کارگیری آن در زیتوده میکروبی پدید می‌آید. اگرچه این بخش از فسفر در یاخته باکتری‌ها بی‌جنبش شده^{۱۵} و برای گیاهان فراهم نیست، پس از زمان کوتاهی با مرگ باکتری‌ها از شکل بی‌جنبش شده و آلی به شکل کانی دگرگون می‌شود و برای گیاه فراهم و در دسترس خواهد شد. تجزیه واریانس داده‌های فسفر زیتوده باکتری‌ها نشان داد که پیامد دو فاکتور گونه باکتری و کانی فسفری و همچنین برهم‌کنش آنها بر فسفر زیتوده در پایه آماری ۱ درصد چشمگیر است (جدول ۲).

روشناور در کشتگاه‌های به کاررفته بود که شاید به توان اسیدزایی آن وابسته باشد. در پژوهش حاضر، هم‌بستگی منفی چشمگیری^(**) ($r = -0.775$) میان فسفر بخش روشناور با اسیدیته کشتگاه‌ها و هم‌بستگی مثبت و چشمگیری با اندازه رسانایی الکتریکی^(**) ($r = 0.789$) کشتگاه‌ها دیده شد. رشید^۹ و همکاران (۲۵) با بررسی توانایی ساخت اسیدهای آلی در کشتگاه جامد و مایع پیکوفسکایا با دستگاه HPLC، گزارش کردند که در کشت چند باکتری و قارچ جدا شده از ریزوسفر برنج پس از ۷ روز انکوباسیون، اسیدیته محلول با ساخت اسیدهای آلی کاهش چشمگیری یافت. ایشان نشان دادند که جدایه‌های حل‌کننده فسفات با گذشت زمان در کشتگاه جامد، گلوکونیک‌اسید، فوماریک، سوکسینیک و استیک‌اسید و برخی اسیدهای ناشناخته را با غلظت کمتری می‌سازند و در کشتگاه مایع، اگزالیک و سیتریک‌اسید با غلظت بیشتری ساخته می‌شوند. اسیدهای آلی ساخته شده باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب کاهش اسیدیته و کلاته کردن کاتیون‌ها می‌شوند. همچنین یافته‌ها نشان داده‌اند که اسیدهای آلی، کمپلکس‌های محلولی را با یون‌های فلزی همراه فسفر در کانی‌های فسفری (آهن، آلومینیوم و کلسیم) می‌سازند که سبب رهاسازی فسفر به شکل محلول می‌شود (۲۹ و ۳۰). پژوهشگران دیگری نیز کاهش اسیدیته کشتگاه مایع باکتری‌های حل‌کننده فسفات را گزارش کرده‌اند (۳۱، ۳۲ و ۳۳). ایلمر و شینر^{۱۰} (۳۴) بیان کردند که گاهی در زیستگاه دارای اسیدیته زیاد نیز حل‌کانی‌های فسفری رخ می‌دهد و این به کلاته شدن اسیدهای آلی با یون کلسیم در تری کلسیم فسفات وابسته است. آسا^{۱۱} و همکاران (۳۵) و ویتلا^{۱۲} و همکاران (۳۶) هم‌بستگی مثبتی میان حل شدن فسفات و

aurantiogriseum به ترتیب ۰/۴ و ۰/۸ درصد بود. همانند این یافته‌ها را بیور و بورنز^{۱۶} (۴۰) نیز گزارش و بیان کرده‌اند که سیستم جذب و آلی‌شدن^{۱۷} فسفر با گرفتن فسفر محلول از کشتگاه سبب حل بیشتر کانی‌های این عنصر از فاز جامد می‌شود؛ این یافته‌ها را ایلمر و شیر (۴۱) نیز گزارش کرده‌اند؛ آنها هم‌بستگی چشمگیر و بسیاری میان فسفر آلی‌شده و زیتوده میکروبی در پژوهش خود دیدند. همچنین جورینک^{۱۸} و همکاران (۴۲) بیان کردند که سازوکار حلالیت به ساخت زیتوده میکروبی وابسته است؛ در این پژوهش، هم‌بستگی میان اندازه فسفر زیتوده میکروبی و اسیدیته کشتگاه بررسی و آزمون و هم‌بستگی منفی و ناچشمگیری میان این دو دیده شد ($r = -0.012^{ns}$). گفتنی است که فسفر محلول اندازه‌گیری شده در روش‌های کشتگاه‌ها با اسیدیته هم‌بستگی چشمگیر و وارونه‌ای داشت. بنابراین حل، واکنشی زیست‌شیمیایی و وابسته به کارکرد ریزجانداران در کشتگاه است ولی فسفر زیتوده به اسیدیته زیستگاه وابستگی چندانی ندارد و تنها فرایندی زیستی است.

آزمون میانگین فسفر زیتوده نشان داد که جدایه‌های *Klebsiela sp.* 4A-1 ($222/2 \text{ mg l}^{-1}$) و بیشترین *Agrobacterium sp.* 22SP-1 ($211/6 \text{ mg l}^{-1}$) میانگین فسفر زیتوده را داشتند که به میزان چشمگیری بیشتر از شاهد بود. پس از آن، بیشترین میانگین‌ها را جدایه‌های 3A-1S و 14A-4 به ترتیب با میانگین ۱۸۵/۶ و ۱۷۹/۳ میلی‌گرم بر لیتر در دو کشتگاه به کاررفته داشتند. در بررسی فسفر زیتوده در برهم‌کنش تیمارها (شکل ۲) دیده شد که جدایه *Agrobacterium sp.* 22SP-1، بیشترین میانگین (میانگین ۳۷۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر) فسفر زیتوده را در کشتگاه دارای تری‌کلسیم فسفات داشت و پس از آن، جدایه‌های 14A-4 و 44A-4S به ترتیب با ۳۰۲/۶ و ۲۸۳/۰ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشتند. دو جدایه 4A-1 و 3A-1S در کشتگاه‌های دارای دو کانی فسفری، فسفر زیتوده خوبی را انباشته کردند و در کشت این دو جدایه، بیشترین فسفر زیتوده در کشتگاه دارای سنگ فسفات دیده شد. ایلمر و شیر (۳۴) گزارش کردند که میزان فسفر زیتوده برای جنس‌های *Pseudomonas sp.* و *P.*

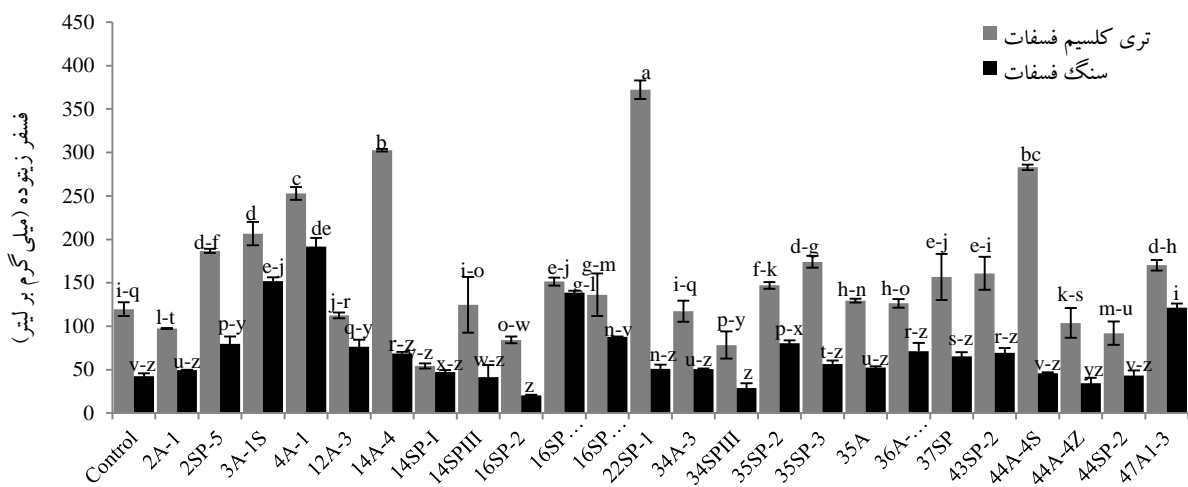


شکل ۱- میانگین فسفر روشناور جدایه‌های باکتری در کشتگاه‌های دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اسیدیته و شوری کشتگاه اسپربر پس از مایه‌زنی جدایه‌ها

میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	pH کشتگاه	EC کشتگاه
گونه باکتری	۲۴	۳/۳۴۱**	۰/۴۹۸**
کانی فسفری	۱	۵/۸۹۲**	۹/۹۳۸**
گونه باکتری × کانی فسفری	۲۴	۱/۳۱۹**	۰/۴۰۱**
خطا	۱۰۰	۰/۰۲۷	۰/۰۰۶
درصد ضربه دگرگونی		۳/۵۲	۸/۰۱

** چشمگیر در پایه آماری ۱ درصد



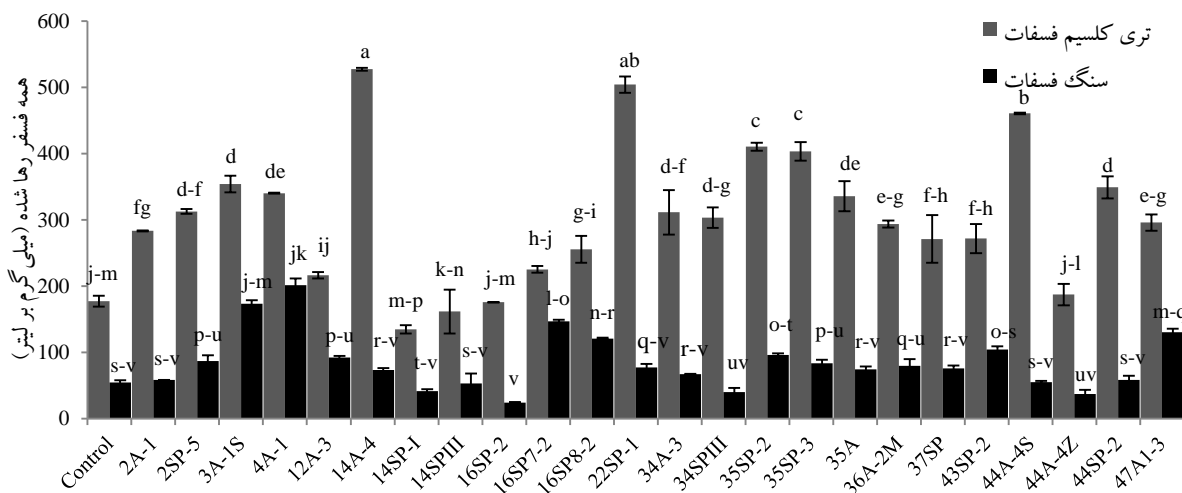
شکل ۲- فسفر زیتوده جدایه‌های باکتری در کشتگاه‌های دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات

کشتگاه‌های دارای کانی‌های تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات در شکل ۳ گزارش شده است. این بخش از پژوهش نشان داد که همه فسفر ره‌اشده از کانی بیشتر به فسفر زیتوده وابسته است تا فسفر روشناور و جدایه‌هایی که میزان فسفر زیتوده آنها بیشتر بود، فسفر ره‌اشده بیشتری از کانی‌ها داشتند و از دیدگاه آماری، میانگین‌های آنها به شکل چشمگیری بیشتر از دیگر گونه‌ها و شاهد آزمایش بود. بنابراین، بیشترین میانگین همه فسفر ره‌اشده در کشت جدایه‌های *Agrobacterium sp.* 14A-4 و *Agrobacterium sp.* 22SP-1 به ترتیب با میانگین ۵۲۷/۴ و ۵۰۴/۲ میلی‌گرم

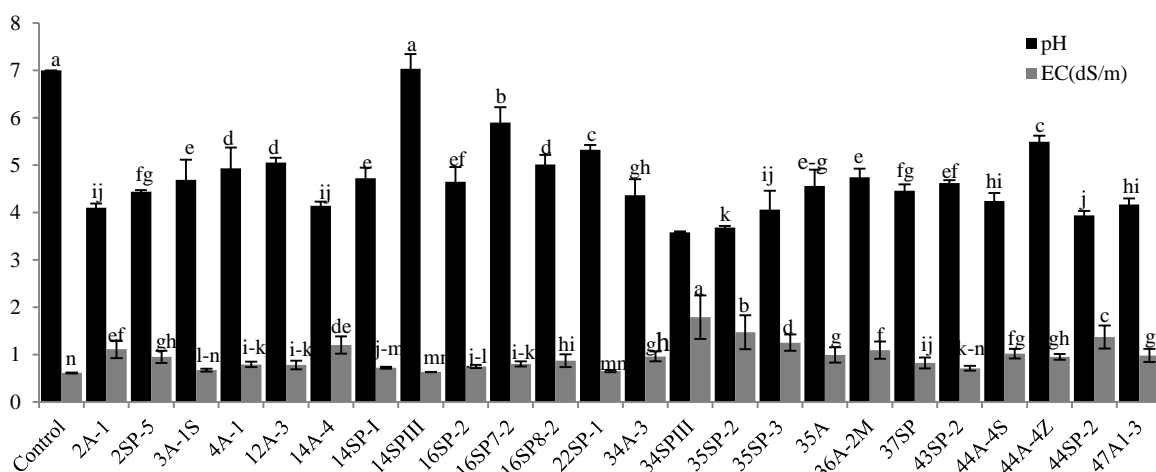
همه فسفر ره‌اشده از کانی: پس از بررسی یافته‌های فسفر محلول و فسفر زیتوده میکروبی، همه فسفر ره‌اشده از کانی محاسبه شد تا میزان فسفر آزاد شده از کانی‌های فسفر به کاررفته بررسی شود. همه فسفر ره‌اشده از کانی، از مجموع فسفر محلول در بخش روشناور و اندازه فسفر آلی شده در زیتوده میکروبی برآورد شد. تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری همه فسفر ره‌اشده از کانی (روشناور و زیتوده) نشان داد که همه فاکتورهای آزمایش شده پیامد چشمگیری در پایه آماری ۱ درصد داشته‌اند (جدول ۲). انجام آزمون میانگین همه فسفر ره‌اشده از کانی‌ها در کشت هر یک از جدایه‌ها در

رهاشده از کانی و اسیدیته، هرچند هم‌بستگی منفی و چشمگیری در پایه آماری ۵ درصد دیده شد ($r^2 = 0/444^*$)، هم‌بستگی چشمگیری با رسانندگی الکتریکی کشتگاه دیده نشد. بنابراین از میان جدایه‌های بررسی‌شده، جدایه‌های 22SP-1، 14A-4 و 44A-4S که به ترتیب به جنس‌های *اگروباکتریوم*، *اگروباکتریوم* و *سیتروباکتر* متعلق بودند، توانایی بیشتری در حل فسفات از کانی تری کلسیم فسفات داشتند.

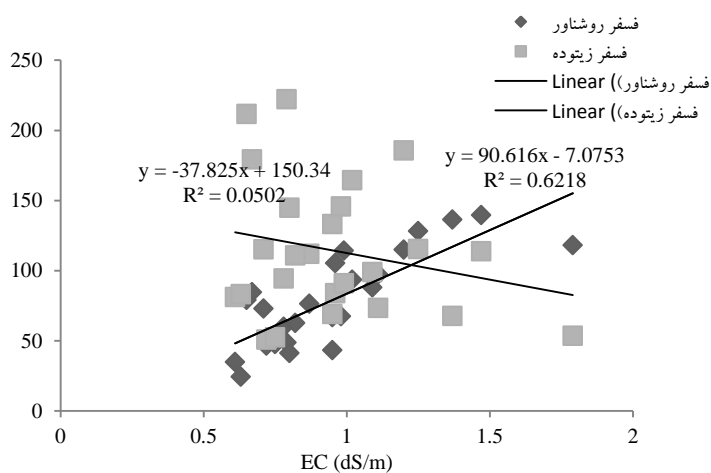
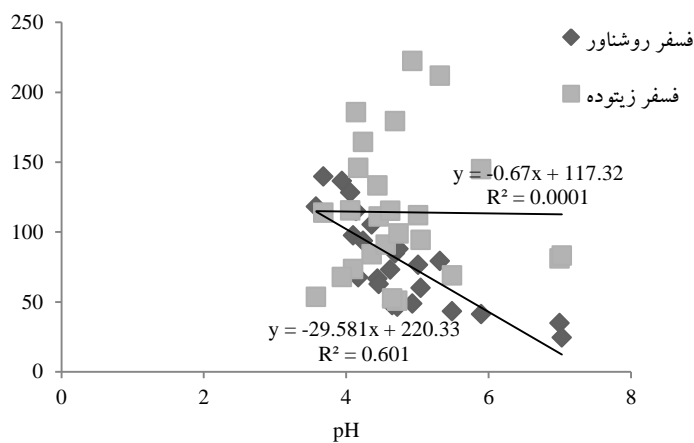
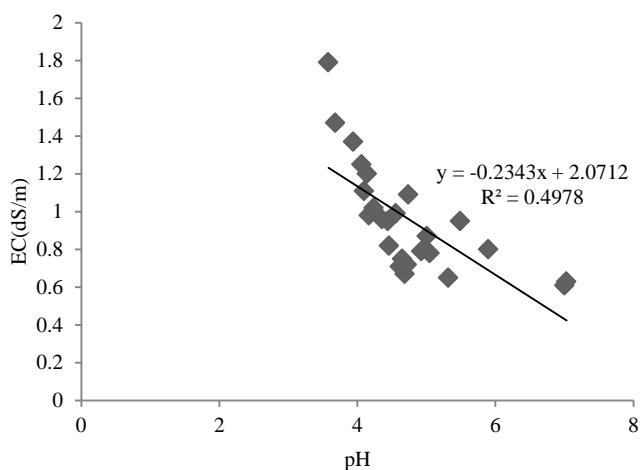
بر لیتر فسفر در کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات حاصل شد و پس از آنها، جدایه 44A-4S با میانگین ۴۶۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشت. از همه فسفر رهاشده از کانی، بیشترین فسفر آلی‌شده در ساختار یاخته‌ای جدایه‌های 44A-4S، 22SP-1 و 14A-4 یافت شد و در مجموع، بیشترین میزان همه فسفر رهاشده از کانی در کشت جدایه‌های 22SP-1، 14A-4 و 44A-4S اندازه‌گیری شد. در بررسی هم‌بستگی میان همه فسفر



شکل ۳- همه فسفر رهاشده از دو کانی فسفری (تری کلسیم فسفات، سنگ فسفات) در کشت جدایه‌های باکتری در کشتگاه اسپرر مایع



شکل ۴- چگونگی دگرگونی اسیدیته (pH) و رسانندگی الکتریکی (EC) کشتگاه اسپرر دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات پس از مایه‌زنی جدایه‌های باکتری



شکل ۵- رگرسیون خطی میان فسفر روشناور و فسفر زیتوده با اسیدیته (pH) و رسانندگی الکتریکی (EC) کشتگاه، همچنین میان اسیدیته (pH) و رسانندگی الکتریکی (EC) کشتگاه

در بررسی این فراسنجه‌ها با توجه به شکل‌ها، جدایه‌هایی دیده شدند که کمترین میانگین را در مقایسه با شاهد آزمایش داشتند اما در یک کلاس آماری قرار گرفتند؛ این موضوع به علت خطای ممکن در نمونه‌برداری از رویه سوسپانسیون میکروبی است و شاید برخی دانه‌های آب‌آویز فسفات معدنی در تیمار شاهد آزمایش موجود باشند که باعث برآورد میزان زیاد فسفر شده‌اند. گذشته از این خطا، باکتریی مانند جدایه 3-34A که بتواند بخش بزرگی از فسفر محلول را جذب کند و در یاخته خود انباشته کند، گزینه شایسته‌ای برای جذب زیستی فسفر از آبهای آلوده می‌تواند باشد و در زیست بهسازی آبهای آلوده به فسفر می‌تواند کارایی داشته باشد.

در بررسی هم‌بستگی میان اسیدیت و رسانندگی الکتریکی کشتگاه، اگرچه هم‌بستگی چشمگیری میان درصد جذب زیستی با اسیدیت و رسانندگی الکتریکی کشتگاه دیده نشد؛ هم‌بستگی چشمگیری در پایه آماری ۱ درصد میان اسیدیت و رسانندگی الکتریکی کشتگاه با نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده دیده شد. همانند آنچه در بررسی فسفر روشناور دیده شد، با کاهش اسیدیت کشتگاه نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده در کشتگاه افزایش ($r = -0.524^{**}$) و با افزایش این نسبت، رسانندگی الکتریکی کشتگاه افزایش یافت ($r = 0.619^{**}$).

یافته‌های همانندی نیز در بررسی جن ۱۹ و همکاران (۳۲) گزارش شده است. ایشان توانایی انحلال ۳۶ جدایه شامل جنس‌های باسیلوس، رودوکوکوس، آرتروباکتر، کریزوباکتریوم و سراسیا را در کشتگاه مایع حاوی تری‌کلسیم‌فسفات بررسی کردند. یافته‌ها پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها را با ساخت اسیدهای آلی و کاهش اسیدیت تأیید کردند. قادری^{۲۰} و همکاران (۴۳)،

درصد جذب زیستی و نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده: یافته‌های تجزیه واریانس در بررسی درصد جذب زیستی (فسفر زیتوده به میزان فسفر افزوده‌شده به کشتگاه) و نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده نشان دادند که گونه باکتری و کانی به‌کاررفته در کشتگاه و همچنین برهم‌کنش آنها پیامد چشمگیری در پایه آماری ۱ درصد بر ویژگی‌های یادشده دارند (جدول ۴). بالاترین درصد جذب زیستی در میان جدایه‌های بررسی شده در کشت جدایه 3-34A با میانگین ۷۴/۴۵ درصد و به دنبال آن جدایه‌های 14SPI و 44A-4Z به ترتیب با میانگین ۶۰/۵۱ و ۵۶/۵۹ درصد در کشتگاه دارای تری‌کلسیم‌فسفات به دست آمد که ۲/۳۶ برابر کنترل آزمایش بود و با آن ناهمانندی چشمگیری داشت (شکل ۶). این جدایه‌ها توانسته بودند از همه فسفر افزوده شده به کشتگاه بیشترین اندازه جذب زیستی را در یاخته‌های خود داشته باشند که پس از مرگ باکتری و کانی شدن فسفر آلی آن فراهم‌کننده فسفر برای گیاه خواهند بود. از سوی دیگر در بررسی نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده نیز بالاترین این نسبت در کشت جدایه 35SP-2 و 47A1-3 به ترتیب با اندازه‌های ۳/۱۳ و ۲/۹۱ در کشتگاه دارای تری‌کلسیم‌فسفات به دست آمد (شکل ۷). روی هم‌رفته کشتگاه این باکتری‌ها اسیدی‌تر بوده (شکل ۴) و بخش بزرگی از فسفر رها شده از کانی‌ها در بخش محلول مانده است. این فراسنجه می‌تواند همانند شناسه‌ای کارا در شناسایی توانایی و سودمندی باکتری در افزایش زیست‌فراهمی فسفر برای گیاهان باشد (۴۳). بنابراین جدایه‌های 34A-3، 14SPI و 44A-4Z پس از مرگ باکتری و جدایه‌های 35SP-2 و 47A1-3 در زمان زندگی باکتری می‌توانند دسترسی به فسفر را برای گیاهان آسان کنند.

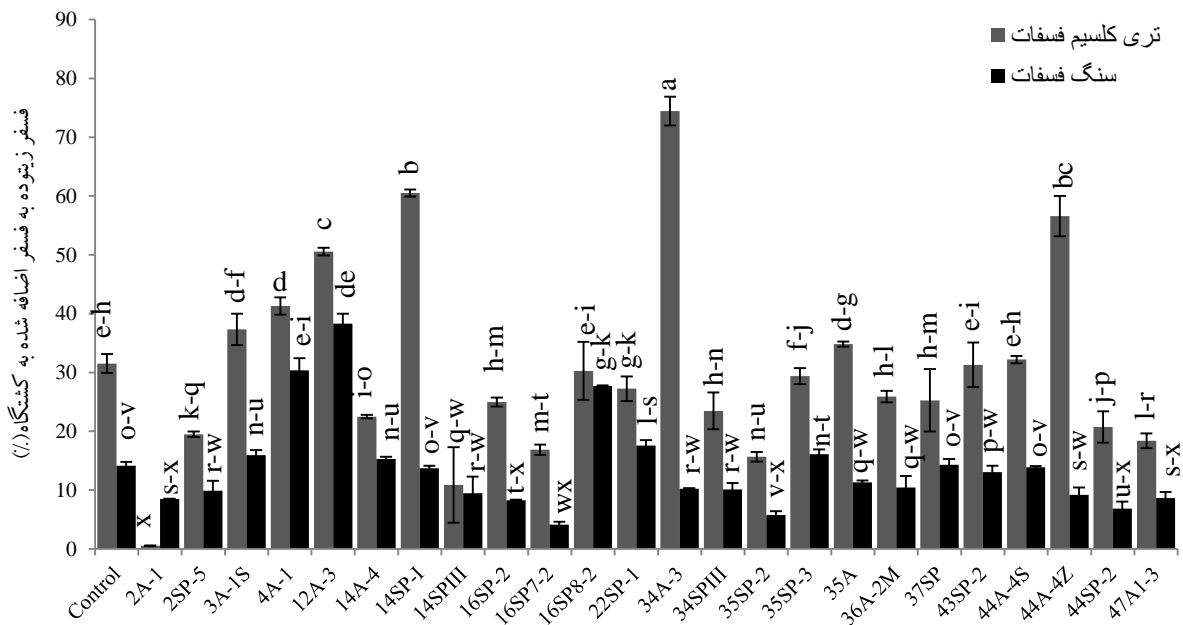
کردند که بیشترین آزادسازی فسفر (۶۱/۶ درصد) در سویه سودوموناس فلورسنس در برابر سودوموناس پوتیدا (۵۰/۵ درصد) است. یافته‌های آنها نشان دادند که فسفر زیتوده کارایی ویژه‌ای در انحلال فسفر دارد و اگرچه فسفر روشناور در گونه پوتیدا بیشتر بود، بیشتر بودن فسفر زیتوده در گونه فلورسنس نشان داد که این باکتری سهم بیشتری در رهاسازی فسفر داشته است.

به بررسی توان رهاسازی فسفات چند سویه سودوموناس (*P. putida*, *P. fluorescens* Chao, *P. fluorescens* Tabriz) از رویه کانی هیدروکسید آهن III پرداختند. اندازه فسفر رهاسازده در بخش محلول و زیتوده میکروبی اندازه گیری و دیده شد که سودوموناس پوتیدا، بیشترین میزان فسفر رهاسازده در بخش محلول (۵۰ mgP/ 50ml) و سویه *P. fluorescens* Tabriz بیشترین اندازه فسفر زیتوده (۳/۷ mgP/ 50ml) را داشتند. آنها گزارش

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده و درصد جذب زیستی آن در کشت جدایه‌های گوناگون باکتری‌ها در کشتگاه‌های دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات

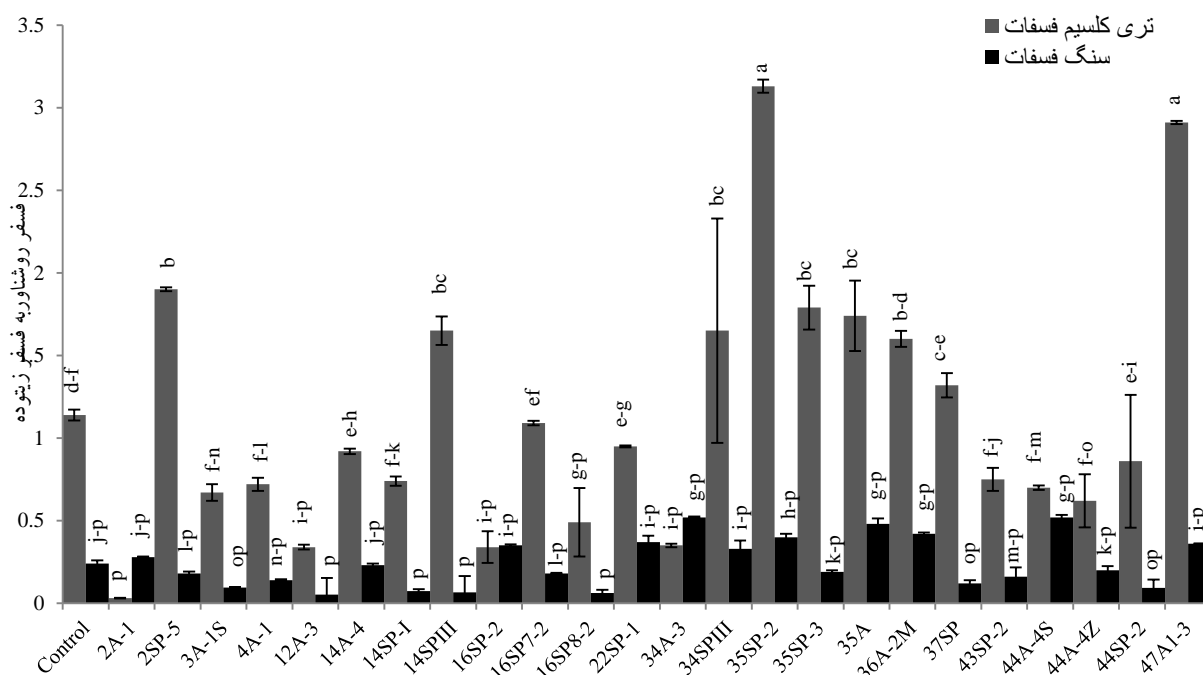
میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده	درصد جذب زیستی
گونه باکتری	۲۴	۰/۰۳۵۶۴**	۵۶۸/۴۴۷**
کانی فسفری	۱	۳/۳۹۳۵**	۱۱۳۴۷/۰۶۳**
گونه باکتری × کانی فسفری	۲۴	۰/۰۲۷۴۲۱**	۳۱۷/۰۲۴**
خطا	۱۰۰	۰/۰۰۱۵	۲۰/۹۶۵
درصد ضریب دگرگونی		۱۱/۸۱	۲۰/۰۶

** چشمگیر در پایه آماری ۱ درصد



شکل ۶- درصد جذب زیستی (فسفر زیتوده به فسفر افزوده شده به کشتگاه) در کشت جدایه‌های باکتری در کشتگاه دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات

سنگ فسفات



شکل ۷- نسبت فسفر روشناور به فسفر زیتوده در کشت جدایه‌های باکتری در کشتگاه اسپربر دارای تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی توان حل فسفر برخی از جدایه‌های باکتریایی در کشتگاه‌های دارای دو کانی تری کلسیم فسفات و سنگ فسفات با ارزیابی چگونگی پخش فسفر رهاشده در دو بخش محلول در کشتگاه (روشناور) و بخش آلی اندوخته‌شده در زیتوده میکروبی آزمون شد. یافته‌ها نشان دادند که با کاهش اسیدیته کشتگاه، فسفر محلول افزایش می‌یابد و سبب زیاد شدن رسانندگی الکتریکی کشتگاه می‌شود. همچنین جدایه‌ها توانایی بیشتری در حل فسفات از کانی تری کلسیم فسفات در برابر سنگ فسفات داشتند. بررسی سنجش فسفر زیتوده در برابر فسفر روشناور نشان داد که بخش زیادی از فسفر رهاشده از کانی‌های به‌کاررفته به شکل فسفر زیتوده در می‌آید و از فسفر روشناور نیز فزونی می‌گیرد. بنابراین

هنگام گزینش جدایه‌های برتر باکتری‌های حل‌کننده فسفات، شاید اندازه‌گیری و آزمون فسفر زیتوده بهتر از فسفر حل‌شده در روشناور باشد، هرچند در گزینش باکتری‌ها برای کاربردهایی مانند ساخت کود زیستی بیشتر بر فسفر روشناور یا محلول آنها کار شده است. برخی از جدایه‌ها با اندوختن فسفر بیشتر در زیتوده، نامزدهای شایسته‌ای برای زیست‌بهسازی زیستگاه‌های آلوده به فسفر هستند. بهره‌گیری از آنها همراه با روش‌هایی مانند پالایش یاخته‌ها و یا بی‌جنش‌سازی یاخته‌ها بر نگهدارنده‌های جامد است تا جداسازی و گردآوری آنها را از زیستگاه‌های آلوده آسان‌تر کند. بر پایه یافته‌های پژوهش حاضر، باکتری‌هایی که کارایی بیشتری در رهاسازی فسفر کانی‌های فسفاتی داشتند و میزان بیشتری از آن را در زیتوده خود انباشته می‌کردند

- (7) Goldstein AH. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1986; 1(02): 51-57.
- (8) Malboobi MA., Zamani K., Lohrasebi T., Sarikhani MR., Samaian A., Sabet MS. Phosphate: the silent challenge *Progress in Biological Sciences*. 2014; 4(1): 1-32.
- (9) Kucey RM., Janzen HH., Leggett ME. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy* 1989; 42: 199-228.
- (10) Rodríguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 1999; 17(4): 319-339.
- (11) Gulati A., Rahi P., Vyas P.. Characterization of phosphate-solubilizing *fluorescent pseudomonads* from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Current microbiology* 2008; 56(1): 73-79.
- (12) Liu Z., Li YC., Zhang S., Fu Y., Fan X., Patel JS., Zhang M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology* 2015; 96: 217-224.
- (13) Sarikhani MR., Malboobi MA., Ebrahimi M. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2014; 6(1): 77-110.
- (14) Paul D., Sinha SN. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Advances in Applied Science Research* 2013; 4(4): 409-412.
- (15) Safari Sinangani AA. *Soil Biology and Biochemistry*. Hamadan: Bu- Ali Sina University press; 2014.
- (16) Kucey RM., Janzen HH., Leggett ME. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy* 1989; 42: 199-228.

از جنس‌های *اگروباکتریوم* 4-14A، *اگروباکتریوم* 22SP-1 و *سیتروباکتر* 44A-4S بودند و این با نتایج بررسی فسفر محلول در روشناور بسیار ناهم‌اند است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در بررسی توان باکتری‌ها در افزایش زیست‌فراهمی فسفر برای گیاه، فسفر زیتوده آنها نیز اندازه‌گیری و آزمون شود.

References

- (1) Gulati A., Sharma N., Vyas P., Sood S., Rahi P., Pathania V., et al. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of microbiology* 2010; 192(11): 975-983.
- (2) Malakouti MJ., Gheibi MN. *Determination of critical levels of nutrients in soil, plant and fruit for the quality and yield improvements of Iran's strategic crops*. Tehran: Agricultural education publication; 2000.
- (3) Browne P., Rice O., Miller SH., Burke J., Dowling DN., Morrissey JP., et al. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology* 2009; 43(1): 131-138.
- (4) Jain R., Saxena J., Sharma V. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Applied Soil Ecology* 2010; 46(1): 90-94.
- (5) Gupta G., Srivastava S., kumar Khare S., prakash V. Role of phosphate solubilizing bacteria in crop growth and disease management. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2014; 8(1): 461-474.
- (6) Khan AA., Jilani G., Akhtar MS., SaqlanNaqvi SM., Rasheed M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2009; 1(1): 48-58.

- (17) Rodríguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 1999; 17(4): 319-339.
- (18) Gulati A., Rahi P., Vyas P.. Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Current microbiology* 2008; 56(1): 73-79.
- (19) Liu Z., Li YC., Zhang S., Fu Y., Fan X., Patel JS., Zhang M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology* 2015; 96: 217-224.
- (20) Sarikhani MR., Malboobi MA., Ebrahimi M. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2014; 6(1): 77-110.
- (21) Paul D., Sinha SN. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Advances in Applied Science Research* 2013; 4(4): 409-412.
- (22) Safari Sinangani AA. *Soil Biology and Biochemistry*. Hamadan: Bu- Ali Sina University press; 2014.
- (23) Achat DL., Morel C., Bakker MR., Augusto L., Pellerin S., Gallet-Budynek A., et al. Assessing turnover of microbial biomass phosphorus: combination of an isotopic dilution method with a mass balance model. *Soil Biology and Biochemistry* 2010; 42(12): 2231-2240.
- (24) Turner BL., Frossard E., Baldwin DS. *Organic phosphorus in the environment*. Oxford: CABI Publishing CAB International; 2005.
- (25) Kouno K., Wu J., Brookes PC. Turnover of biomass C and P in soil following incorporation of glucose or ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 2002; 34(5): 617-622.
- (26) Oehl F., Oberson A., Probst M., Fliessbach A., Roth HR., Frossard E. Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. *Biology and Fertility of Soils* 2001; 34(1): 31-41.
- (27) Sperber JI. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Crop and Pasture Science* 1958; 9(6): 778-781.
- (28) Cotteni A. *Soil and plant testing as a basis of fertilizer recommendations*. Rome: FAO of the United Nations; 1980.
- (29) Eaton AD., Clesceri LS., Greenberg AE., Franson MAH. *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC: American Public Health Association; 1998.
- (30) Chapman HD., Pratt PF. *Methods of Analysis for Soil and Water*. University of California: Berkeley. Agricultural Publications; 1962.
- (31) Olsen SR., Sommer LE. Phosphorus. In: Klute A. editor. *Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties*, part 2. 2nd ed. Madison, WI: ASA and SSSA; 1982: 403-430.
- (32) Audipudi AV., Kumar NP., Sudhir A. Phosphate solubilizing microorganisms associated with Chollangi mangrove soil in east coast of India. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 2012; 3: 1-9.
- (33) Spagnoletti FN., Tobar NE., Fernandez Di Pardo A., Chiocchio VM., Lavado RS. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium iron and aluminum phosphates. *Applied Soil Ecology* 2017; 111: 25-32.
- (34) Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S., Latif F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan of Jurnal Biological Science* 2004; 7(2): 187-196.
- (35) Behera BC., Yadav H., Singh SK., Mishra RR., Sethi BK., Dutta SK., et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* SP. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017; 15: 169-178.
- (36) Kepert DG., Robson AD., Posner AM.

- The effect of organic root products on the availability of phosphorus to plants. In: Harley J., editor. *The Soil Root Interface*. London: Academic Press; 1979.
- (37) Omar SA. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1998; 14(2): 211-218.
- (38) Bar-Yosef B., Rogers RD., Wolfram JH., Richman E. Mediated Rock Phosphate Solubilization in Kaolinite and Montmorillonite Suspensions. *Soil Science Society of America Journal* 1999; 63(6): 1703-1708.
- (39) Chen YP., Rekha PD., Arun AB., Shen FT., Lai WA., Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 2006; 34(1): 33-41.
- (40) Hwangbo H., Park RD., Kim YW., Rim YS., Park KH., Kim TH., et al. 2-Ketogluconic production and phosphate solubilization by *Enterobacter* intermedium. *Current Microbiology* 2003; 47(2): 87-92.
- (41) Illmer P., Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 1992; 24(4): 389-395.
- (42) Asea PE., Kucey RM., Stewart JW. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 1988; 20(4): 459-464.
- (43) Whitelaw MA., Harden TJ., Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil biology and biochemistry* 1999; 31(5): 655-665.
- (44) Salih HM., Yahya AI., Abdul-Rahem AM., Munam BH. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant and soil* 1989; 120(2): 181-185.
- (45) Guang-Can T., Shu-Jun T., Miao-Ying C., Guang-Hui X. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* 2008; 18(4): 515-523.
- (46) Rafiei S., Asadi Rahmani H. Survey the ability of *Flavobacterium* sp. bacteria in solubilization of insoluble phosphate. *Journal of Molecular and Cellulal Researches (Iranian Journal of Biology)* 2014; 26(4): 472-479.
- (47) Beaver RE., Burns DJ. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Advances in botanical research* 1981; 8: 127-219.
- (48) Illmer P., Schinner F. Solubilization of inorganic calcium Phosphate Solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 1995; 27(3): 257-263.
- (49) Jurinak JJ., Dudley LM., Allen MF., Knight WG. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: a thermodynamic study. *Soil Science* 1986; 142(5): 255-261.
- (50) Ghaderi A., Aliasgharzad N., Oustan S., Olsson PA. Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). *Soil and Environment* 2008; 27(1): 71-76.

¹- Phosphate Solubilizing Bacteria

²- Supernatant

³- Bioaccumulation

⁴- Khan

⁵- Rodriguez and Fraga

⁶- Audipudi

⁷- Spagnoletti

⁸- Behera

⁹- Rashid

¹⁰- Illmer and Schinner

¹¹- Asea

¹²- Whitelaw

¹³- Guang- Can

¹⁴- Rafiei and Asadi Rahmani

¹⁵- Immobilized

¹⁶- Beaver and Burns

¹⁷- Immobilization

¹⁸- Jurinak

¹⁹- Chen

²⁰- Ghaderi