



Quantitative evaluation of dissolved and microbial biomass phosphorus released from insoluble phosphates by some strains in order to select efficient bacteria

Yaghoub Ali Karami¹ | Abbas Samadi^{*2} | Alireza Fallah Nosrat Abad³ |
Ebrahim Sepehr⁴ | Mohsen Barin⁵

1. Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, University of Urmia and Research Coach of Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. E-mail: mfm_karamigsa@yahoo.com
2. Corresponding Author, Professor, Dept. of Soil Science, University of Urmia. E-mail: a.samadi@urmia.ac.ir
3. Associate Prof. of Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: rezafayah@yahoo.com
4. Professor, Dept. of Soil Science, University of Urmia. E-mail: e.sepehr@urmia.ac.ir
5. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Urmia. E-mail: m.barin@urmia.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 10.20.2020

Revised: 04.16.2021

Accepted: 04.24.2021

Keywords:

Calcium phytate,
Microbial biomass
phosphorus,
Phosphate mine soil,
Phosphate solubilizing
bacteria,
Tricalcium phosphate

ABSTRACT

Background and Objectives: The efficiency of phosphorus (P) chemical fertilizers in agriculture is relatively low (5-25%). This has led to more P fertilizers' application which not only increases production costs but also threatens the environment. Therefore, it is necessary to introduce suitable alternatives to replace part of these fertilizers consumption. Phosphate solubilizing bacteria have been identified as a promising option to reduce P chemical fertilizers' application due to their ability to solve insoluble P in soil environment. These bacteria can assimilate part of the solubilized P, known as the microbial biomass P. This mechanism allows natural ecosystems to be self-sustainable, without the application of phosphate fertilizers. Given the role of potent bacterial strains in dissolving insoluble phosphates and the importance of microbial biomass P in providing part of the plant needed P in the long term. This study aimed to select efficient strains by quantitative measurement of dissolved P and microbial biomass P after inoculation of bacteria in sperber medium with different phosphate sources.

Materials and Methods: This study was conducted as factorial experiment in a completely randomized design format using two factors in three replications. The first factor was bacteria inoculation including strains: *Curtobacterium flaccumfaciens* Tkd/4, *Pantoea agglomerans* Ggd/4 and *Sphingobium yanoikuyae* Rpd/4, all isolated from Giroud Shemshak Phosphate mine, *Bacillus pumilus* RPY isolated from Yazd Asfordi Phosphate mine, *Pseudomonas putida* Ps/14 prepared from Soil and Water Research Institute (isolated from maize farm soil) and blank (contains phosphate sources without bacteria inoculation) and the second factor was three phosphate sources: tricalcium phosphate (TCP), calcium phytate (CPhy) and phosphate main soil (PMS). The measured traits were included pH, EC, dissolved P and microbial biomass P. Total solubilized P from the phosphate source (sum of dissolved P and microbial biomass P), the ratio of dissolved P to microbial biomass P and biosorption percentage of P were calculated as well.

Results: The effect of bacteria strain, phosphate source and their interactions was significant on all measured traits ($P \leq 0.01$). The ability of Ps/14 strain to dissolve phosphate was higher than other strains in all three

phosphate sources. All strains absorbed more phosphorus from TCP than the other two phosphate sources. Microbial biomass P was higher in phosphate soil treatments inoculated with all strains except Tkd/4 strain than in CPhy treatments inoculated with those strains. The lowest pH (3) and the highest EC (1.53 dS m^{-1}) were observed in the PMS and TCP treatments inoculated with Ps/14 strain, respectively.

Conclusion: The studied strains had different effects on both dissolved P and microbial biomass P properties from different P sources. The ability of Ps/14 strain to dissolve P from all three phosphate sources was higher than the other strains. The results revealed that the strain that has more potential in dissolving P from one source does not necessarily have the same potential in assimilating P from the same source. This can be attributed to the solubility nature of material and the solubilizing capability of the microorganisms. The results of this study also showed that the total solubilized P could be more strongly attributed to dissolved P rather than microbial biomass P. Overall, the results showed that the potent of some of the studied bacteria in both dissolved P and microbial biomass P properties can be considered as a promising option in reducing the application of P fertilizers and increasing their effectiveness.

Cite this article: Karami, Yaghoub Ali, Samadi, Abbas, Fallah Nosrat Abad, Alireza, Sepehr, Ebrahim, Barin, Mohsen. 2022. Quantitative evaluation of dissolved and microbial biomass phosphorus released from insoluble phosphates by some strains in order to select efficient bacteria. *Journal of Soil Management and Sustainable*, 11 (4), 55-75.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejsms.2022.18475.1981

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



ارزیابی کمی فسفر محلول و زیست توده میکروبی آزاد شده توسط برخی سویه‌ها از فسفات‌های نامحلول به منظور انتخاب باکتری‌های کارآمد

یعقوبعلی کرمی^۱ | عباس صمدی^{۲*} | علیرضا فلاح نصرت آباد^۳ | ابراهیم سپهر^۴ | محسن برین^۵

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه و مربی پژوهشی بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. رایانامه: mfm_karamigsa@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، استاد گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه. رایانامه: a.samadi@urmia.ac.ir
۳. دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: rezafayah@yahoo.com
۴. استاد گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه. رایانامه: e.sepehr@urmia.ac.ir
۵. استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه. رایانامه: m.barin@urmia.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: اثربخشی کودهای شیمیایی فسفوری در کشاورزی بسیار پایین و در حدود ۲۵-۵ درصد است. این امر موجب مصرف بیش‌تر این کودها گشته که افزون بر هزینه‌بر بودن، پیامدهای زیانبار زیست‌محیطی را نیز در پی داشته است. بنابراین، ضروری است گزینه‌ای مناسب برای جبران مصرف بخشی از این کودها معرفی گردد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات به دلیل توانایی در انحلال فسفات‌های نامحلول، به‌عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفوری در محیط خاک شناخته شده‌اند. این باکتری‌ها می‌توانند بخشی از فسفر حل‌شده را جذب نمایند که همان فسفر زیست‌توده میکروبی است. این فرایند به سیستم‌های طبیعی اجازه می‌دهد بدون استفاده از کودهای فسفاتی، خودپایدار باشند. با توجه به نقش سویه‌های باکتریایی توانمند در انحلال فسفات‌های نامحلول و اهمیت فسفر زیست‌توده میکروبی در تأمین بخشی از فسفر گیاهان در درازمدت، این پژوهش با هدف انتخاب سویه‌های کارآمد با اندازه‌گیری کمی فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی پس از مایه‌زنی باکتری‌ها در محیط اسپربر دارای منابع مختلف فسفاتی انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۹	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴	
واژه‌های کلیدی:	مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و در سه تکرار انجام گردید. فاکتور اول مایه‌زنی با سویه‌های باکتری شامل: <i>Pantoea agglomerans</i> Ggd/4، <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> Tkd/4 و <i>Sphingobium yanoikuyae</i> Rpd/4، همگی جداسازی شده از معدن فسفات جیروود شمشک، <i>Bacillus pumilus</i> RPY، جداسازی شده از معدن فسفات اسفوردی یزد، Ps/14 و <i>Pseudomonas putida</i> تهیه شده از مؤسسه تحقیقات خاک و آب (جداسازی شده از خاک مزارع ذرت) و شاهد (دارای منابع فسفات بدون مایه‌زنی باکتری) و فاکتور دوم شامل سه منبع باکتری حل‌کننده فسفات، تری‌کلسیم فسفات، خاک فسفات معدن، فسفر زیست‌توده میکروبی، فیتات کلسیم

فسفات: تری کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و خاک فسفات بودند. ویژگی‌های اندازه‌گیری شده شامل pH، EC، مقدار فسفر محلول و فسفر زیست‌توده میکروبی بود. فسفر حل شده کل از منبع فسفات (مجموع فسفر محلول و فسفر زیست‌توده میکروبی)، نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده میکروبی و درصد جذب زیستی فسفر نیز محاسبه شدند.

یافته‌ها: اثر سویه باکتری، منبع فسفات و برهم‌کنش آن‌ها بر همه ویژگی‌ها معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). توانایی سویه Ps/14 در ویژگی فسفر محلول، در هر سه منبع فسفات بیش از دیگر سویه‌ها بود. همه سویه‌ها از تری کلسیم فسفات نسبت به دو منبع فسفات دیگر، فسفر بیش‌تری جذب نمودند. فسفر زیست‌توده میکروبی در تیمارهای خاک فسفات مایه‌زنی شده با همه سویه‌ها به‌جز سویه Tkd/4 بیش از تیمارهای فیتات کلسیم مایه‌زنی شده با آن سویه‌ها بود. کم‌ترین pH (۳) و بیش‌ترین EC ($1/53 \text{ dS m}^{-1}$) به‌ترتیب در تیمارهای خاک فسفات و تری کلسیم فسفات مایه‌زنی شده با سویه Ps/14 دیده شد.

نتیجه‌گیری: سویه‌های مورد مطالعه اثرات متفاوتی بر دو ویژگی مقدار فسفر محلول و فسفر زیست‌توده میکروبی از منابع مختلف فسفات داشتند. توانایی سویه Ps/14 در انحلال فسفر از هر سه منبع فسفات، بیش از دیگر سویه‌ها بود. نتایج نشان داد، لزوماً سویه‌ای که پتانسیل بیش‌تری در انحلال فسفر از یک منبع دارد همان پتانسیل را در جذب فسفر از آن منبع ندارد. این را می‌توان به ماهیت ماده حل‌شونده و کارایی ریزموجود حل‌کننده نسبت داد. هم‌چنین نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان فسفر حل شده کل را به‌طور قوی‌تری به فسفر محلول نسبت داد تا فسفر زیست‌توده میکروبی. در کل نتایج نشان داد توانایی برخی از باکتری‌های مورد مطالعه در هر دو ویژگی فسفر محلول و فسفر زیست‌توده میکروبی، می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای امیدبخش در کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفوری و افزایش اثربخشی آن‌ها مد نظر قرار گیرد.

استناد: کرمی، یعقوب‌علی، صمدی، عباس، فلاح نصرت‌آباد، علیرضا، سپهر، ابراهیم، برین، محسن (۱۴۰۰). ارزیابی کمی فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی آزاد شده توسط برخی سویه‌ها از فسفات‌های نامحلول به‌منظور انتخاب باکتری‌های کارآمد.

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۱۱ (۴)، ۷۵-۵۵.

DOI: 10.22069/ejsms.2022.18475.1981



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

فسفر (P) عنصری ضروری برای رشد گیاهان بوده و یکی از اصلی ترین عناصر محدودکننده رشد دیگر موجودات نیز به شمار می رود. با این وجود، در بیش تر خاک ها فراهمی فسفر بسیار کم است (۱۶). میانگین فسفر کل خاک در حدود ۰/۰۵ درصد وزنی (w/w) است که به دو شکل معدنی و آلی وجود دارد. از این مقدار تنها ۰/۱ درصد آن قابل دسترس گیاهان می باشد که به شکل آنیون های فسفات است (۲۵) و (۳۰). آنیون های فسفات نیز بسیار واکنش پذیر هستند و ممکن است بسته به شرایط متفاوت، در خاک های مناطق مختلف از طریق واکنش با کاتیون هایی مانند Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Fe^{3+} و Al^{3+} نامحلول و غیرقابل دسترس برای گیاهان گردند (۲۴). از این رو، در برخی خاک ها فسفر به عنوان یک عامل محدودکننده رشد گیاهان شناخته شده و استفاده از کودهای شیمیایی فسفوری برای برآوردن نیاز رشد گیاهان توصیه می گردد. در سوی دیگر، اثربخشی فسفر در کودهای شیمیایی بسیار پایین و در حدود ۲۵-۵ درصد است (۴۴). این امر موجب مصرف بیش تر این کودها گشته که افزون بر هزینه بر بودن (۴۸)، پیامدهای زیانبار زیست محیطی را نیز در پی دارد (۱ و ۸).

ریزجانداران به دلیل توانایی در انحلال فسفات های نامحلول، به عنوان گزینه ای امیدبخش برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفوری تشخیص داده شده اند (۱۱) و به همین دلیل بسیار حیاتی و اثرگذار تلقی می شوند (۴۲). این موجودات در افزایش زیست فراهمی فسفر، از راه انحلال فسفات های معدنی و معدنی کردن فسفات های آلی نقش آفرین هستند (۱۷). بر اساس گزارش های موجود، در این فرآیند برخی از باکتری ها و قارچ ها دارای نقش ویژه و منحصر به فردی هستند (۴ و ۱۹).

بر اساس الگوهای مختلف انحلال فسفات، باکتری های حل کننده فسفات را می توان در دو گروه قرار داد. گروه نخست - حل کننده های فسفات های معدنی که برای انحلال ترکیب های فسفات، اسیدهای آلی یا معدنی ترشح می کنند و گروه دوم؛ معدنی کننده های فسفات های آلی که برای هیدرولیز ترکیب های آلی فسفات، آنزیم فسفاتاز یا فیتاز ترشح می کنند. عملکرد هر دو گروه در این خاک ها منجر به کاهش pH و آزادسازی فرم ویژه ای از فسفر محلول در منطقه ریزوسفر^۱ گیاه می گردد (۲۹).

در بررسی توانایی حل کنندگی فسفات توسط ریزجانداران، از دو روش کیفی و کمی استفاده می شود. در روش کیفی قطر هاله یا نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی در محیط کشت جامد (۲۸ و ۳۴) و در روش کمی مقدار فسفر رهانده در بخش محلول محیط کشت مایع، معیار توانایی حل کنندگی فسفات ریزجانداران است (۴۰).

باکتری های حل کننده فسفات، بخشی از فسفر حل شده را جذب و در پیکر خود به شکل آلی درمی آورند که همان فسفر زیست توده میکروبی است. این نوع فسفر، یک شاخص زیستی بالقوه در قابلیت دسترسی گیاهان به فسفر خاک هاست (۹، ۱۳ و ۲۶). اهمیت بررسی فسفر زیست توده از آن جهت است که در فرآیند تجزیه یاخته باکتری در تأمین بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه، نقش دارد. شماری از پژوهش ها اهمیت بالقوه فسفر زیست توده در تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان را یادآور شده اند و زمان تبدیل فسفر زیست توده به فسفر قابل جذب گیاه را از ده ها روز تا نزدیک به یک روز برآورد نموده اند (۹، ۲۶ و ۲۷). فرایند آلی شدن فسفر به سیستم های طبیعی این اجازه را می دهد که بدون استفاده از کودهای شیمیایی فسفوری، خود پایدار^۲ باشند (۱۷). در واقع استفاده از

1- Rhizosphere
2- Self sustainable

تری‌کلسیم فسفات غیرواقعی است. زیرا اگرچه شکل غالب فسفر مثلاً در خاک‌های قلیایی تری‌کلسیم فسفات است، یا در برخی از خاک‌ها فسفر آلی می‌تواند ۶۵-۳۰ درصد (۹) یا حتی ۸۰-۳۰ درصد (۱۰) از فسفر کل را تشکیل دهد، اما سایر شکل‌های فسفر مانند آپاتیت، اکتاکلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، فسفات‌های آهن و آلومینیم نیز در خاک‌ها وجود دارند. بر همین اساس این روش بعدها اصلاح شد و فسفات‌های نامحلول دیگری همانند آپاتیت (۴۲)، فیتات (۳۷ و ۴۸) و دی‌کلسیم فسفات (۴۱) نیز مورد استفاده قرار گرفتند.

گزارش‌های زیادی از جداسازی و شناسایی ریزموجودات حل‌کننده فسفات از معادن فسفات دیگر مناطق دنیا به ثبت رسیده است. در این باره می‌توان به جدایه *Stenotrophomonas maltophilia* YC جداسازی شده از معدن فسفات هویی چین (۵۲)، باکتری *Serratia* ایزوله QC3.a.2 جداسازی شده از یک معدن در اندونزی (۳۲) و دو باکتری از جنس *Brevibacillus* و *Bacillus* از معادن فسفات هندوستان اشاره نمود (۵۵).

لزوم یافتن جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی زمانی بیش‌تر احساس می‌شود که متوجه این واقعیت باشیم که باقیمانده ذخایر قابل دسترس سنگ فسفات پاک فقط تا ۵۰ سال آینده کفایت می‌کند (۱۵). با توجه به نقش سویه‌های باکتریایی توانمند در انحلال فسفات‌های نامحلول و اهمیت فسفر زیست‌توده میکروبی در تأمین بخشی از فسفر گیاهان در درازمدت، این پژوهش با هدف انتخاب سویه‌های کارآمد با اندازه‌گیری کمی فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی پس از مایه‌زنی باکتری‌ها در محیط اسپربر دارای منابع مختلف فسفاتی انجام شد.

تثبیت میکروبی فسفر در خاک، یک روش بالقوه کارآمد برای جلوگیری از اتلاف وسیع فسفر خاک می‌باشد (۵۶)، هرچند این روش در کوتاه‌مدت سبب کاهش فسفر محلول خاک می‌گردد (۱۹). فسفر آلی حاصل فرآیندهای متابولیکی زیستی همانند جذب ارتوفسفات‌ها و بقایای میکروبی، گیاهی یا حیوانی است که بر اساس نوع پیوند به سه دسته تقسیم می‌شوند: الف- استرهای فسفات^۱ (قندهای فسفات^۲، فسفولیپیدها^۳، اسیدهای نوکلئیک^۴ و اینوسیتول فسفات‌ها^۵)، ب- فسفونات‌ها^۶ (پیوندهای C-P) و ج- انیدریدهای اسید فسفریک^۷ (آدنوزین تری‌فسفات^۸ و آدنوزین دی‌فسفات^۹) (۲۰). فیتات‌ها از دسته اینوسیتول‌ها، مولکول‌های ذخیره‌کننده فسفر و از مواد تشکیل‌دهنده ساختار غلات و دانه‌ها هستند که توسط بقایای مختلف گیاهی و کود حیوانی به خاک وارد می‌شوند. سالانه میلیون‌ها تن فیتات (مخزن بزرگی از فسفر) در میوه‌ها و دانه‌های محصولات تجاری ذخیره می‌شود که معادل حدود ۶۷ درصد از کاربرد سالانه کودهای معدنی فسفوری جهان است و نشان‌دهنده اهمیت کمی فیتات در چرخه فسفر خاک است (۱۳).

تری‌کلسیم فسفات، اولین بار در سال ۱۹۴۸ توسط پیکوواسکایا^{۱۰} جهت شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌کار رفت (۵) و از آن زمان بسیاری از دانشمندان دیگر، از این ماده به همین منظور در پژوهش‌های خود استفاده نموده‌اند (۲۲، ۳۸، ۳۹، ۴۲ و ۴۷). با گذشت زمان پژوهش‌گران دریافتند این جداسازی‌ها و آزمایش‌ها برای در نظر گرفتن سهم مستقیم گیاهان از فسفر، تنها بر اساس کانی

- 1- Phosphate esters
- 2- Sugar phosphates
- 3- Phospholipids
- 4- Nucleic acids
- 5- Inositol phosphates
- 6- Phosphonates
- 7- Phosphoric acid anhydrides
- 8- Adenosine triphosphate
- 9- Adenosine diphosphate
- 10- Pikovskaya

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول مایه‌زنی با سویه‌های باکتری شامل: *Bacillus pumilus* RPY (شماره دسترسی^۱ MW646604) جداسازی شده از معدن فسفات اسفوردی یزد واقع در ۲۶ کیلومتری شمال شرق شهر بافق یزد در طول جغرافیایی ۳۵° ۵۵' شرقی و عرض جغرافیایی ۴۸' ۳۱°، *Curtobacterium flaccumfaciens* Tkd/4 و *Sphingobium yanoikuyae* Rpd/4 Ggd/4 (به ترتیب با شماره دسترسی‌های MW646605، MW646606 و MW646607) جداسازی شده از معدن خاک فسفات جیروود شمشک واقع در ۴۵ کیلومتری شمال تهران در بخش مرکزی رشته کوه‌های البرز در طول جغرافیایی

۳۰' ۵۱° و عرض جغرافیایی ۰۰' ۳۶°، (۲۱) و *Pseudomonas putida* Ps/14 (شماره دسترسی MW646608) تهیه شده از مؤسسه تحقیقات خاک و آب (جداسازی شده از خاک مزارع ذرت) و شاهد (دارای منابع فسفات بدون باکتری) و فاکتور دوم شامل سه منبع فسفات: تری کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و خاک فسفات بود. ویژگی‌های اندازه‌گیری شده شامل pH، EC، مقدار فسفر محلول و فسفر زیست توده میکروبی بود. فسفر حل شده کل از منبع فسفات (مجموع فسفر محلول و فسفر زیست توده میکروبی)، نسبت فسفر محلول به فسفر زیست توده میکروبی و درصد جذب زیستی فسفر نیز محاسبه شدند. آنالیز خاک فسفات مصرفی (اسفوردی یزد) در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های خاک فسفات مصرفی.

Table 1. Some properties of applied phosphate mine soil.

کادمیوم Cd	مس Cu	منگنز Mn	مولیبدن Mo	روی Zn	آهن Fe	فسفر P	پتاسیم K	منیزیم Mg	کلسیم Ca	هدایت الکتریکی EC	اسیدیته pH
(mg kg ⁻¹)										(dS m ⁻¹)	
0.1	49	102	2	8	1.4×10 ⁴	1.6×10 ⁵	0.1×10 ⁴	0.1×10 ⁴	2.9×10 ⁵	0.2	8.78

۷/۱ تنظیم شد. محیط کشت‌ها به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و پس از استریل شدن در اتوکلاو (دمای °C ۱۲۱، فشار یک اتمسفر و به مدت ۱۵ دقیقه)، با ۵۰۰ (μl) سوسپانسیون دارای سویه‌ها (با چگالی نوری ۰/۸ در طول موج (nm) ۶۰۰) مایه‌زنی شدند. تیمارهای شاهد فقط با ۵۰۰ (μl) نوترینت برات استریل مایه‌زنی شدند. تمامی ارلن‌ها (دارای باکتری و شاهد (دارای منابع فسفات بدون مایه‌زنی باکتری)) به مدت هفت روز در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ rpm در دمای °C ۲۷ گرماگذاری و تکان داده

برای مایه‌زنی محیط‌های کشت مورد نظر با سویه‌ها، کشت تازه باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت برات تهیه شد. سپس محیط کشت اسپریر مایع (۴۵) شامل (g) ۱۰ گلوکز، (g) ۰/۵ عصاره مخمر، (g) ۰/۱ کلرید کلسیم، (g) ۰/۲۵ سولفات منیزیم و (mg) ۱۰۰۰ فسفر از هر منبع فسفات به طور جداگانه در یک لیتر آماده شد. اسیدیته محیط‌ها پیش از استریل کردن آنها با استفاده از KOH و HCl با pH متر JENWAY مدل 3505 بر روی

1- Accession number

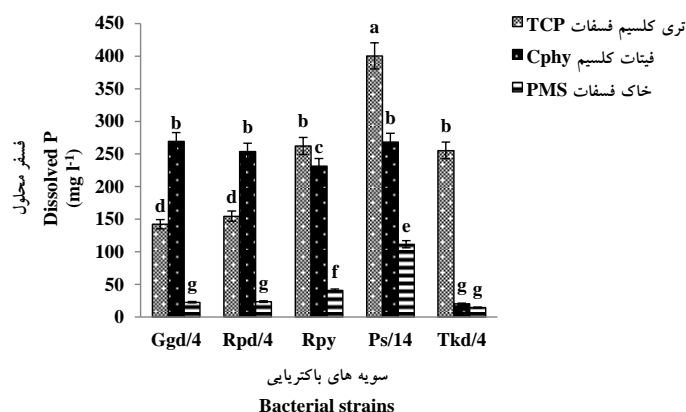
شاهد (دارای منابع فسفات بدون باکتری‌ها) نیز به همین روش اندازه‌گیری شد و فسفر زیست‌توده میکروبی از تفاضل این فرکشن فسفر در تیمارهای دارای باکتری با تیمارهای شاهد به‌دست آمد. ویژگی‌های اندازه‌گیری شده شامل pH، EC، مقدار فسفر محلول و فسفر زیست‌توده میکروبی بود. فسفر حل‌شده کل از منابع فسفات، نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده و درصد جذب زیستی فسفر نیز محاسبه شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، آزمون میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثر سویه باکتری، منبع فسفات و برهم‌کنش آن‌ها بر ویژگی‌های فسفر محلول، فسفر زیست‌توده میکروبی و فسفر حل‌شده کل معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). بر اساس مقایسه میانگین‌های فسفر محلول (شکل ۱)، مقدار فسفر محلول در تیمارهای دارای تری‌کلسیم فسفات مایه‌زنی شده با سویه‌های به‌ترتیب Ps/14 *Bacillus pumilus* Rpy، *Pseudomonas putida* Tkd/4 و *Curtobacterium flaccumfaciens* Rpd/4 بیش از دیگر سویه‌ها بود. البته در این محیط سویه Ps/14 در بالاترین گروه آماری و دو سویه Rpy و Tkd/4 که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، در گروه آماری بعدی قرار گرفتند. هم‌چنین در تیمار تری‌کلسیم‌فسفات مایه‌زنی شده با دو سویه دیگر (*Ggd/4* و *Rpd/4*) اختلافی معنی‌داری در مقدار فسفر محلول دیده نشد، اما این دو سویه در این محیط نسبت به دیگر سویه‌ها در پایین‌ترین گروه آماری قرار گرفتند.

پس از پایان دوره گرماگذاری EC و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. ده دقیقه پس از هم‌زدن ارلن‌ها، از بخش رویی هر ارلن (ml) ۲ در میکروتیوپ ریخته شد. میکروتیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند (۱۲). مایع بخش رویی میکروتیوپ‌ها برای اندازه‌گیری فسفر محلول با روش زرد (مولیدات و انادات) (۶) و بخش ته‌نشین شده در میکروتیوپ‌ها با استفاده از روش آبی (مولیدات-آسکوربیک اسید) برای اندازه‌گیری فسفر ذره‌ای شناور مورد استفاده قرار گرفت. این بخش از فسفر شامل فسفر زیست‌توده و فسفر جامد رهاشده از منابع فسفات است که در ارلن‌ها به صورت شناور وجود دارد.

برای اندازه‌گیری فسفر ذره‌ای ته‌نشین شده میکروتیوپ‌ها، دو میلی‌لیتر اسید سولفوریک سه نرمال روی هر نمونه و شاهد‌های آزمایش ریخته شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۸۵ در بن‌ماری گرما داده‌شد تا عمل هضم انجام و فسفر آن‌ها آزاد شود. پس از سردشدن، چند قطره معرف فنل فتالین و (ml) ۲/۵ هیدرواکسید سدیم سه نرمال اضافه شد تا باقی‌مانده اسید استفاده‌شده خنثی گردد. سپس حجم محلول به (ml) ۱۰ رسانده شد (۲). در این مرحله فسفر به‌روش آبی (اسکوربیک اسید مولیدات) اندازه‌گیری شد (۳۳). در پایان (ml) ۲/۵ عصاره آماده شده با (ml) ۴ محلول کاری آمونیوم هپتامولیدات، (ml) ۵ آب مقطر و (ml) ۰/۵ اسید آسکوربیک مخلوط شد و هم‌زمان استانداردها آماده شدند. پیدایش رنگ آبی در طول موج (nm) ۷۳۰ با دستگاه اسپکتروفتومتر پس از ۱۵ دقیقه خوانده شد. مقدار فسفر ته‌نشین شده در میکروتیوپ‌ها در تیمارهای



شکل ۱- فسفر محلول شده از سه منبع فسفات توسط سویه‌ها.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

Figure 1. Dissolved P from three phosphate sources by strains.
Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

(۵۳ و ۵۴). یداو و همکاران (۲۰۱۵) نیز در این مورد به اختلاف منشاء جداسازی سویه‌ها و تأثیر آن بر بروز تفاوت در انحلال منبع فسفات اشاره نموده‌اند (۵۵). گوپتا و همکاران (۲۰۰۷) ضمن تأکید بر تفاوت سویه‌ها در انحلال منابع فسفات با توجه به منشاء جداسازی سویه‌ها، بر تحمل ریزجاندار جداسازی شده از هر منشاء به‌نوع عناصر (فلز) موجود در زیستگاه خود نیز اشاره نموده‌اند (۱۸).

مقدار فسفر محلول در تیمارهای فیتات کلسیم مایه‌زنی شده با سه سویه Ggd/4, Rpd/4 و Ps/14 تقریباً به یک مقدار بود و در یک گروه آماری قرار گرفتند. از نظر این ویژگی در این محیط دو سویه Rpy و Tkd/4 به‌ترتیب در گروه‌های بعدی آماری جای گرفتند (شکل ۱).

در کل سویه Ps/14 *Pseudomonas putida* تواناترین سویه در فسفر محلول از محیط‌های تری کلسیم فسفات و خاک فسفات بود. این سویه در انحلال فیتات کلسیم نیز از توانایی بالایی برخوردار بود و با دیگر سویه‌های برتر در انحلال فیتات کلسیم

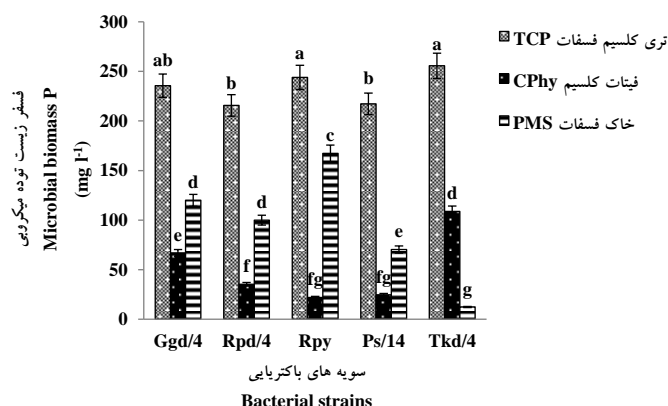
در تیمار خاک فسفات مایه‌زنی شده با سویه Ps/14، بیش‌ترین مقدار فسفر محلول دیده شد. پس از سویه Ps/14، بیش‌ترین فسفر محلول توسط سویه Rpy در این محیط ایجاد شد و این سویه در گروه بعدی آماری قرار گرفت. بین سه سویه دیگر (Ggd/4, Rpd/4 و Tkd/4) از نظر این ویژگی اختلاف معنی‌داری دیده نشد و هر سه سویه در آخرین گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۱). این نکته قابل‌توجه است که سویه *Bacillus pumilus* Rpy جداسازی شده از معدن اسفوردی یزد با توجه به نوع خاک فسفات به‌کار رفته در محیط کشت (خاک فسفات اسفوردی یزد)، توانایی بیش‌تری در انحلال خاک فسفات نسبت به باکتری‌های جداسازی شده از معدن فسفات منطقه جیروود شمشک نشان داد، که ممکن است نشان‌دهنده سازگاری بیش‌تر این سویه به منبع فسفات زیست‌گاه خود باشد. گزارش شده است که در فرآیند انحلال خاک فسفات، ریزجانداران بومی یک معدن فسفات سازگاری بیش‌تری به خاک فسفات زیستگاه خود نسبت به ریزجانداران غیربومی دارند

است (۵، ۲۲ و ۴۲)، اما گزارش‌های مربوط به پتانسیل باکتری‌های خاک برای افزایش دسترسی فسفر، از منابع آلی کم است. نتایج آزمایش وان و همکاران (۲۰۲۰) در استفاده از چهار منبع فسفات تری‌کلسیم‌فسفات، فسفات آهن، فسفات آلومینیوم و فیتات در محیط^۱ NBRIP مایع نشان داد جدایه *Acinetobacter pittii* gp-1 در بین ۱۸ جدایه، در این محیط‌ها عملکرد بهتری داشته و تری‌کلسیم فسفات منبع بهینه فسفر برای ۱۸ باکتری مورد استفاده بوده است (۵۰). گزارش شده است که باکتری‌ها بیش‌ترین انحلال را از کانی تری‌کلسیم‌فسفات و قارچ‌ها از منابع آلی فیتات و لسیتین داشته‌اند (۳۷).

بر اساس مقایسه میانگین‌های ویژگی فسفر زیست‌توده میکروبی (شکل ۲)، این ویژگی در تیمار تری‌کلسیم‌فسفات مایه‌زنی شده با سویه‌های Tkd/4، Rpy و Ggd/4 بیش از دیگر سویه‌ها بود و این سه سویه در این محیط اختلاف معنی‌داری در این ویژگی با یکدیگر نشان ندادند. دوسویه Rpd/4 و Ps/14 در گروه آماری بعدی قرار گرفتند. البته دوسویه Rpd/4 و Ps/14 نیز با سویه Ggd/4 از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. تقریباً همه سویه‌های مایه‌زنی شده در محیط تری‌کلسیم‌فسفات توانایی خوبی در ویژگی فسفر زیست‌توده میکروبی از خود نشان دادند.

اختلاف معنی‌داری نشان نداد. بنابراین، این سویه را می‌توان به‌عنوان سویه برتر در ویژگی فسفر محلول از هر سه منبع فسفات معرفی نمود (شکل ۱). شاید بتوان توانایی سویه Ps/14 در انحلال فسفر را به توان اسیدی کردن بیش‌تر محیط کشت توسط این سویه نسبت به دیگر سویه‌ها نسبت داد (شکل ۴). زیرا با افزایش ترشح اسید در محیط و کاهش اسیدیته مقدار فسفر بیش‌تری در محیط آزاد می‌شود (۲۹). گرچه در برخی مواقع، کاهش اسیدیته حتماً با بالا رفتن غلظت فسفر در محیط همراه نمی‌گردد که عامل آن می‌تواند جذب فسفر توسط یاخته‌های باکتری و تشکیل فرم‌های آلی فسفر از طریق بیوستنز فسفر باشد (۶). بلاه و همکاران (۲۰۱۹) به‌طور کلی پتانسیل این حل‌کننده‌ها برای انحلال فسفر را متفاوت می‌دانند و آن‌را بیش‌تر به سازوکار در پیش گرفته شده برای انحلال، ژنتیک مولکولی و هم‌چنین توانایی آزادسازی فسفر آن‌ها نسبت می‌دهند (۴). ضیائو و همکاران (۲۰۲۰)، اسیدی شدن محیط به‌واسطه فعالیت میکروبی را به عوامل مختلفی همانند آزادسازی اسیدهای آلی، تنفس و جذب NH_4^+ نسبت می‌دهند که ممکن است از شرایط تغذیه‌ای، فیزیولوژیکی و رشدی ریزجانداران تأثیر پذیرد (۵۴). بر اساس نتایج این پژوهش جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* از قوی‌ترین حل‌کننده‌های فسفات بودند و تری‌کلسیم‌فسفات در مقایسه با خاک فسفات از حلالیت بیش‌تری برخوردار بود که هم‌سو با نتایج پژوهش‌گران دیگر (۴۲) بود. نتایج بررسی‌های خوشرو و ساریخانی (۲۰۱۸) نیز نشان داد انحلال فسفر سویه‌ها از منبع تری‌کلسیم‌فسفات، در مقایسه با خاک فسفات بیش‌تر بود (۲۵). گزارش‌ها مبنی بر انحلال اشکال مختلف فسفر معدنی به‌وفور ثبت شده

1- National Botanical Research Institute's phosphate



شکل ۲- فسفر زیست توده میکروبی سویه‌ها از سه منبع فسفات.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

Figure 2. Microbial biomass P of strains from three phosphate sources.

Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

زیست توده میکروبی را هم نسبت به سویه‌های جداسازی شده از معدن فسفات جیروود شمشک به سازگاری بیش‌تر این سویه به خاک فسفات زیستگاه خود نسبت داد (۵۳ و ۵۴).

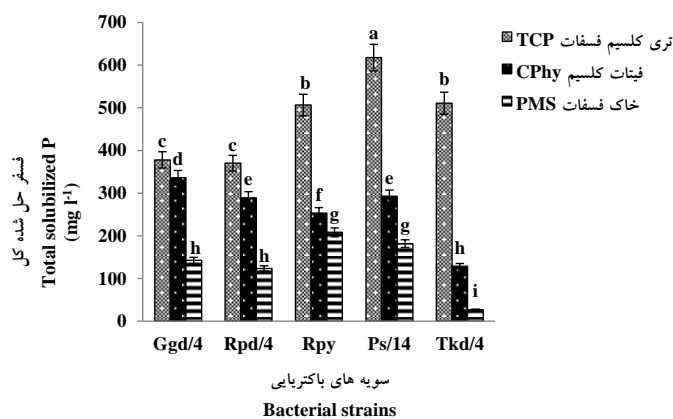
ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که مقدار فسفر جذبی سویه‌های مورد استفاده آن‌ها از محیط تری‌کلسیم فسفات بیش از خاک فسفات بوده است (۱۲). قادری و همکاران (۲۰۰۸) توان انحلال سه سویه *Pseudomonas* را روی هیدروکسی آپاتیت در دو فاز محلول و زیست توده میکروبی مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند سویه *Pseudomonas fluorescence* تبرز مؤثرترین سویه در این ویژگی بود. این سویه ۵۰ درصد از فسفر محلول را در فاز محلول رها و بقیه را جذب نمود (۱۴).

بر اساس مقایسه میانگین‌های فسفر حل شده کل (مجموع مقدار فسفر محلول و زیست توده میکروبی)، بالاترین مقدار این ویژگی در همه سویه‌های به کار رفته در تیمار تری‌کلسیم فسفات دیده شد (شکل ۳). تیمار تری‌کلسیم فسفات مایه‌زنی شده با سویه *Pseudomonas putida* Ps/14

از فیئات کلسیم، سویه *Curtobacterium Tkd/4* بیش‌ترین و دو سویه *Bacillus flaccumfaciens* و *Pseudomonas putida* Ps/14 و *pumilus* کم‌ترین فسفر را جذب نمودند. دو سویه Ps/14 و Rpy در این ویژگی اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. فسفر زیست توده میکروبی در محیط خاک فسفات مایه‌زنی شده با دو سویه Rpy و Tkd/4 به ترتیب در بالاترین و پایین‌ترین گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۲). به طور کلی، همه سویه‌ها بیش‌ترین مقدار فسفر را از تری‌کلسیم فسفات جذب نمودند. در این فرایند فسفر جذب شده در فرایند بیوسنتز توسط یاخته‌های باکتریایی به مواد آلی، مانند فسفولپیدها، پلی فسفات‌ها و اسید نوکلئیک تبدیل می‌گردد. یکی از علت‌های تفاوت در این ویژگی در تیمارهای مختلف، تفاوت سویه‌های مختلف در سرعت و مقدار جذب فسفر و بیوسنتز آن برای ساختن شکل‌های مختلف فسفر آلی است (۷). چنانچه پیش‌تر هم درباره سازگاری سویه بومی منبع فسفات اسفوردی یزد (*Bacillus pumilus* Rpy) در انحلال بیش‌تر خاک فسفات زیستگاه خود عنوان شد، شاید بتوان برتری این سویه در ویژگی فسفر

بالاترین میانگین فسفر حل شده کل را در محیط تری کلسیم فسفات به خود اختصاص دادند و بین آن‌ها از نظر آماری اختلاف معنی داری دیده نشد.

بالاترین جایگاه آماری را به خود اختصاص داد. دو سویه *Curtobacterium flaccumfaciens* Tkd/4 و *Bacillus pumilus* Rpy پس از سویه Ps/14



شکل ۳- فسفر حل شده کل از سه منبع فسفات توسط سویه‌ها.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی داری ندارند ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Total solubilized P from three sources of phosphate by strains. Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

است شامل این موارد باشد: ۱- تفاوت سرعت رشد باکتری‌ها، ۲- تولید و ترشح مواد مختلف حل‌کننده فسفر مانند H^+ به شکل اسیدهای مختلف، مواد احیاکننده برای تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} و اتصال پروتئین‌های یاخته‌ای به Ca^{2+} تری کلسیم فسفات برای انحلال فسفر، ۳- جذب و واجذب Ca^{2+} و PO_4^{3-} به یاخته برای افزایش تجزیه تری کلسیم فسفات و ۴- تولید و ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مرتبط با آزادسازی فسفر از فسفر آلی، مانند لکتین (۶). نتایج این پژوهش نشان داد، پتانسیل سویه‌ها در دو ویژگی فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی متفاوت است و لزوماً سویه‌ای که پتانسیل بیش‌تری در انحلال فسفر از یک منبع فسفات دارد در جذب فسفر از آن منبع نیز، همان پتانسیل را ندارد و برعکس. به عقیده کائو و همکاران (۲۰۱۷)، این تفاوت علاوه بر تفاوت توان انحلال فسفر نامحلول سویه‌ها ممکن است به تفاوت

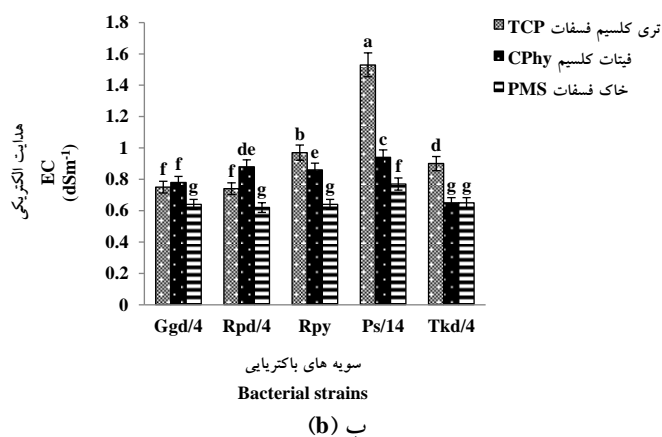
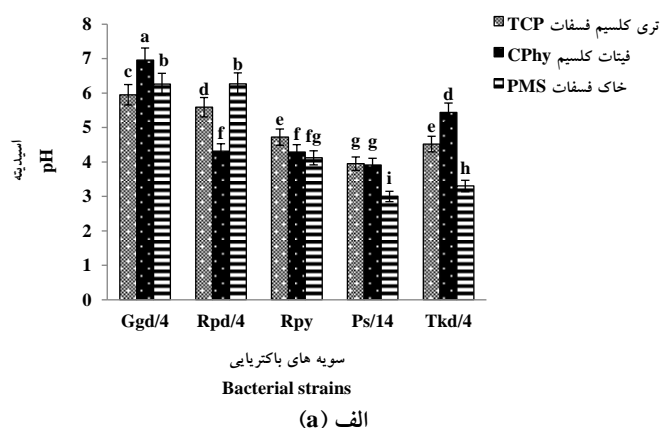
دو تیمار خاک فسفات مایه‌زنی شده با سویه‌های Rpy و Tkd/4 به ترتیب در این ویژگی در بالاترین و پایین‌ترین گروه آماری قرار گرفتند. در محیط فیتات کلسیم هم دو سویه Ggd/4 و Tkd/4، بالاترین و پایین‌ترین جایگاه آماری را در ویژگی فسفر حل شده کل به خود اختصاص دادند (شکل ۳).

مقادیر هم‌بستگی بین فسفر حل شده کل با فسفر محلول ($r=0.739^{**}$) و فسفر حل شده کل با فسفر زیست‌توده میکروبی ($r=0.538^{**}$) نشان داد که می‌توان فسفر حل شده کل را به‌طور قوی‌تری به فسفر محلول نسبت داد. نتایج ما با نتایج ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) که مقدار فسفر حل شده کل را تابع مقدار فسفر زیست‌توده عنوان نمودند (۱۲) متفاوت است که می‌توان آن‌را به تفاوت سازوکارهای انحلال، ماهیت منبع فسفات و توانایی موجودات درگیر در این فرآیند نسبت داد (۳۷). این سازوکارها ممکن

pH خاک منجر می گردد (۲۸). میانگین داده های pH (شکل ۴- الف) نشان داد بیشترین کاهش pH توسط سویه *Pseudomonas putida* Ps/14 در تیمار خاک فسفات اتفاق افتاد. پس از آن سویه Tkd/4 در این محیط، کاهش بیشتری نسبت به دیگر سویه ها ایجاد نمود. این دو سویه با بیشترین مقدار کاهش pH (۳ و ۳/۳) در پایین ترین گروه های آماری قرار گرفتند. کینی و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیشترین مقدار کاهش pH توسط سویه های مورد استفاده در خاک فسفات را، ۳/۰ گزارش کردند (۲۳). سویه Ps/14، pH دو محیط دارای فیتات کلسیم و تری کلسیم فسفات را نیز به ترتیب به ۳/۹۱ و ۳/۹۵ کاهش داد (شکل ۴- الف).

مقدار مصرف فسفر این باکتری ها نیز بستگی داشته باشد. آن ها این تفاوت را به تفاوت پتانسیل جذب فسفر باکتری ها از محیط نسبت دادند و نتیجه گرفتند که مصرف زیاد فسفر و سنتز بیولوژیکی آن، باعث کاهش فسفر محلول در محیط مایع خواهد شد (۶). بدین ترتیب شاید بتوان گفت انحلال فسفر فرآیندی است که هم به ریزموجود حل کننده بستگی دارد و هم به ماهیت ماده حل شونده (۳۷)، حال آنکه جذب فسفر فرآیندی است که بیش تر به موجود حل کننده وابسته است تا ماهیت ماده حل شونده.

بر اساس الگوهای مختلف انحلال فسفات، عملکرد باکتری های حل کننده فسفات نهایتاً به کاهش



شکل ۴- تغییرات الف) اسیدیته و ب) هدایت الکتریکی در تیمارهای منابع فسفات پس از مایه زنی با سویه ها. میانگین های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی داری ندارند ($P \leq 0.05$).

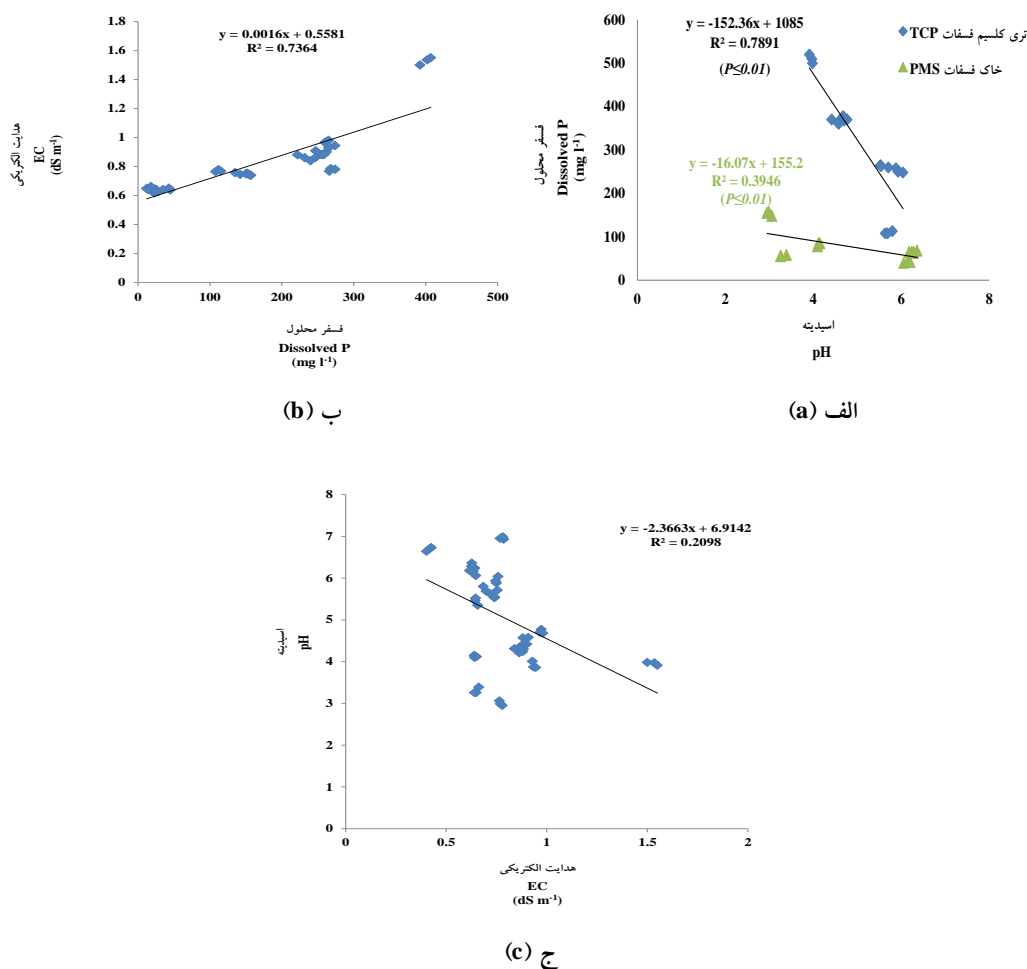
Figure 4. Acidity (a) and electrical conductivity (b) changes in phosphate sources after inoculation with strains. Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان داد که بین کاهش pH محیط و مقدار فسفر محلول شیب وابستگی منفی وجود دارد (۱۷). به دلیل تفاوت مقدار انحلال فسفات توسط سویه‌ها، شیب وابستگی منفی در منابع فسفات متفاوت بود. مقدار این شیب وابستگی بین pH و مقدار فسفر محلول در تری‌کلسیم‌فسفات بسیار بیش‌تر از خاک فسفات بود (شکل ۵-الف)، هرچند چنین رابطه‌ای بین pH و مقدار فسفر محلول در تیمار فیتات کلسیم دیده نشد که دلیل آن افزون بر سویه، می‌تواند ماهیت خود منبع فسفات نیز باشد (۳۶). در آزمایشی، هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین انحلال فسفر و کاهش pH، زمانی که منبع تامین فسفر، منبع غیرآلی (تری‌کلسیم فسفات) بود دیده شد، اما زمانی که از منبع آلی لکتین در محیط کشت استفاده شد هیچ هم‌بستگی معنی‌داری بین فسفر آزاد شده با کاهش pH دیده نشد (۶). از آنجا که گزارش شده است در فرایند انحلال، گروه‌های هیدروکسیلی، آمیدی، کربوکسیلی و پیوند آلکیل C-H، دخیل هستند (۵۵)، ممکن است عدم ایجاد چنین رابطه‌ای بین pH و مقدار فسفر محلول در تیمار فیتات کلسیم به‌عنوان یک منبعی آلی، بافر نمودن تغییر pH این محیط نسبت به دو محیط دیگر توسط OH های زیاد فیتات کلسیم باشد.

بر اساس مقایسه میانگین‌های هدایت الکتریکی (شکل ۴-ب) بیش‌ترین EC توسط سویه Ps/14 *Pseudomonas putida* به مقدار $1/53$ (dS m^{-1}) از کانی تری‌کلسیم‌فسفات با $400/33$ (mg l^{-1}) فسفر محلول (شکل ۱) ایجاد شد، که ناشی از توانایی بیش‌تر این سویه در انحلال این کانی نسبت به دیگر سویه‌ها بود. زیرا با افزایش انحلال کانی فسفات، یون‌های محلول بیش‌تری در محیط آزاد شده و EC افزایش می‌یابد. سویه *Bacillus pumilus* Rpy با 372 (mg l^{-1}) فسفر محلول (شکل ۱) در همین محیط با $0/973$ (dS m^{-1}) EC (شکل ۴-ب) در گروه آماری بعدی قرار گرفت.

یافته‌های این پژوهش نشان داد با کاهش pH مقدار فسفر محلول در محیط بیش‌تر می‌گردد، به‌طوری‌که سویه Ps/14 با ایجاد pH حدود $3/95$ (شکل ۴-الف) بیش‌ترین مقدار فسفر محلول به مقدار $400/33$ (mg l^{-1}) را از تری‌کلسیم‌فسفات (شکل ۱) آزاد کرد که مطابق با یافته‌های پژوهش‌گران دیگر است (۲۹).

بر اساس نتایج این پژوهش یک شیب وابستگی منفی بین کاهش pH با مقدار فسفر محلول در دو کانی تری‌کلسیم‌فسفات و خاک فسفات ($P \leq 0/01$) دیده شد (شکل ۵-الف). نتایج بررسی‌های جیونگ و



شکل ۵- رگرسیون خطی بین الف) اسیدیت و فسفر محلول، ب) هدایت الکتریکی و فسفر محلول و ج) اسیدیت و هدایت الکتریکی.

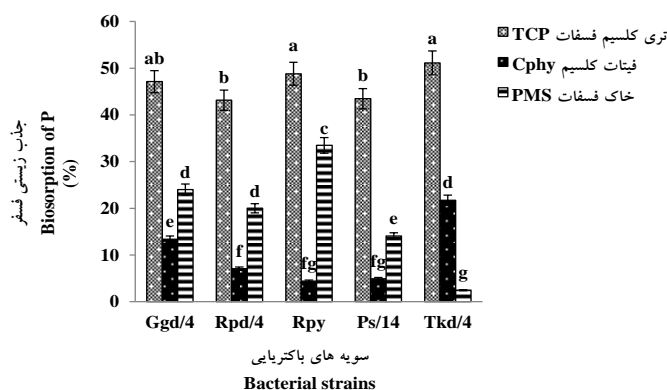
Figure 5. Linear regression between acidity and dissolved P (a), electrical conductivity and dissolved P (b) and acidity and electrical conductivity (c).

از دیگر سو یک شیب وابستگی مثبت و معنی دار (شکل ۵- $P \leq 0/01$) بین EC با فسفر محلول دیده شد (شکل ۵- ب)، در حالی که چنین شیبی بین EC و فسفر زیست توده میکروبی دیده نشد. چراکه انحلال فسفر واکنشی زیست شیمیایی (وابسته به ماهیت منبع فسفات به کاررفته و توانایی انحلال سویه‌ها) است، اما همان گونه که پیش تر هم بیان شد، جذب زیستی فسفر صرفاً واکنشی زیستی و وابسته به توان جذبی سویه‌ها است.

شیب وابستگی منفی بین pH و EC (شکل ۵- ج) نیز نشان داد، با کاهش pH محیط که منجر به افزایش غلظت فسفر محلول گردید (شکل ۵- الف)، هدایت الکتریکی افزایش یافت. در آزمایشی، مایه زنی با باکتری‌ها و قارچ‌های حل کننده فسفر باعث کاهش pH محلول و افزایش غلظت P، Ca و EC در محیط شد و بالاترین مقادیر EC، غلظت Ca و P در محیط دارای تری کلسیم فسفات مایه زنی شده با قارچ FS9 دیده شد (۴۸).

بالاترین درصد جذب زیستی فسفر را از کانی تری کلسیم فسفات به خود اختصاص دادند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۶). دو سویه دیگر Ggd/4 و Ps/14 نیز با هم و با سویه Rpd/4 اختلاف آماری معنی داری نشان ندادند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر سویه باکتری، منبع فسفات و برهم‌کنش آن‌ها بر درصد جذب زیستی فسفر و نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده میکروبی معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). براساس مقایسه میانگین‌ها، سویه‌های Ggd/4 و Rpy، Tkd/4 و Ps/14



شکل ۶- جذب زیستی فسفر توسط سویه‌ها.

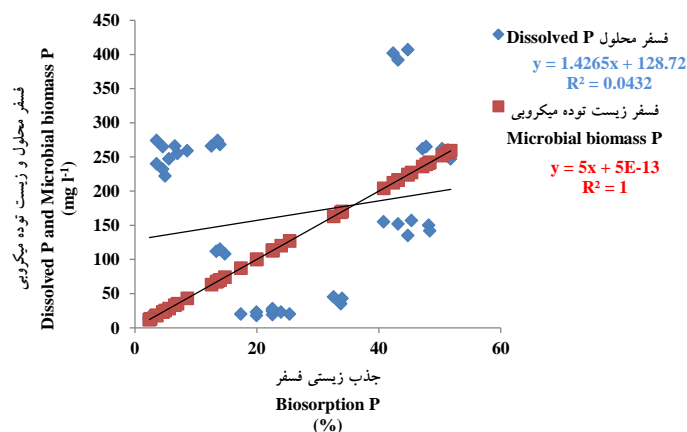
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

Figure 6. Biosorption of P by strains.

Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

مکانیسم‌های انحلال و انتقال فسفر را به تفاوت سازوکارهای انحلال (۳۵، ۳۶، ۴۶)، ماهیت منبع فسفات (۴۸، ۴۹ و ۵۲) و توانایی موجودات درگیر (۳۱، ۴۳، ۴۹ و ۵۰) در این فرآیند نسبت داده‌اند. به‌طور کلی بیش‌ترین درصد جذب زیستی فسفر سویه‌ها، همانند فسفر زیست‌توده میکروبی، به‌ترتیب از منابع تری‌کلسیم فسفات، خاک فسفات و فیتات کلسیم به‌دست آمد (شکل ۶) و این ویژگی متأثر از فسفر زیست‌توده میکروبی بود (شکل ۷).

نتایج آزمایش ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داد که سویه‌های مورد استفاده آن‌ها بیش‌ترین فسفر زیست‌توده میکروبی و درصد جذب زیستی فسفر را از منبع تری‌کلسیم فسفات در مقایسه با خاک فسفات به‌دست آوردند (۱۲). نتایج این پژوهش نشان داد، توان‌ترین سویه در جذب زیستی فسفر از خاک فسفات، سویه *Bacillus pumilus* RPY و از منبع فیتات کلسیم سویه *flaccumfaciens* Tkd/4 *Curtobacterium* بود (شکل ۶). برخی از پژوهش‌گران،

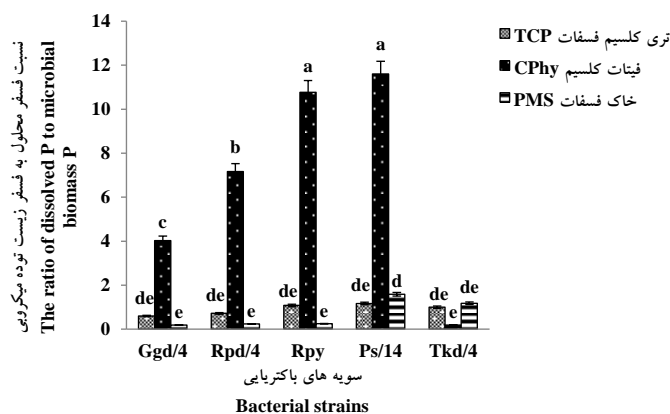


شکل ۷- رگرسیون خطی جذب زیستی فسفر با فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی.

Figure 7. Linear regression of biosorption of P with dissolved P and microbial biomass P.

به‌همراه سویه *Bacillus pumilus* Rpy بیش‌ترین مقدار را به‌خود اختصاص دادند. در آزمایشی، بیش‌ترین مقدار این ویژگی با مقادیر ۳/۱۳ و ۲/۹۱ به‌ترتیب با مایه‌زنی با سویه‌های *Pseudomonas* sp. 35sp-2 و *Klebsiella* sp. 47A1-3 از منبع تری‌کلسیم‌فسفات به‌دست آمد (۱۲).

نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده میکروبی به‌عنوان شاخص زیست‌فراهمی فسفر گیاه به‌کار می‌رود (۵۱). میانگین‌های نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده میکروبی (شکل ۸) نشان داد که بیش‌ترین مقدار زیست‌فراهمی فسفر برای تمام سویه‌ها به‌جز سویه Tkd/4 از فیتات کلسیم به‌دست آمد و در این محیط سویه *Pseudomonas putida* Ps/14



شکل ۸- نسبت فسفر محلول به فسفر زیست‌توده میکروبی از منابع فسفات تحت تأثیر سویه‌ها.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

Figure 8. The ratio of dissolved P to microbial biomass P from phosphate sources under the influence of strains. Means with common letters are not significantly different based on Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش که با هدف انتخاب سویه‌های کارآمد با اندازه‌گیری کمی فسفر محلول و زیست‌توده میکروبی پس از مایه‌زنی باکتری‌ها در محیط اسپریر دارای منابع مختلف فسفاتی انجام شد، دیده شد که توانایی سویه‌ها در انحلال منبع تری‌کلسیم فسفات بیشتر از فیتات کلسیم و از فیتات کلسیم بیشتر از خاک فسفات بود. توانایی سویه Ps/14 *Pseudomonas putida* در ویژگی فسفر محلول از هر سه منبع فسفات بیشتر از دیگر سویه‌ها بود. شیب وابستگی بین اسیدیته محیط و مقدار فسفر محلول، منفی اما مقدار این شیب به دلیل تفاوت توانایی انحلال سویه‌ها و تفاوت ماهیت منابع فسفات به کاررفته یکسان نبود. سویه *Bacillus pumilus* Rpy که از معدن فسفات اسفوردی یزد جداسازی شده بود نسبت به سویه‌هایی که از معدن فسفات منطقه جیرود

شمشک جداسازی شده بودند فسفر بیشتری را از خاک فسفات اسفوردی، حل و جذب نمود. نتایج این پژوهش نشان داد لزوماً سویه‌ای که پتانسیل بیشتری در انحلال فسفر از یک منبع فسفات دارد همان پتانسیل را در جذب فسفر از آن منبع ندارد. همچنین دیده شد که غلظت فسفر حل شده کل بیش‌تر وابسته به فسفر محلول است تا فسفر زیست‌توده میکروبی. در کل نتایج این پژوهش نشان داد توانایی برخی از این سویه‌ها چه در ویژگی فسفر محلول و چه در ویژگی فسفر زیست‌توده میکروبی، می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای امیدبخش در کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفوری و افزایش اثربخشی آن‌ها مد نظر قرار گیرد. پیشنهاد می‌گردد اثربخشی سویه‌های کارآمد در این پژوهش در شرایط گلخانه و مزرعه نیز مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1. Arab, S., El Habil-Addas, F., Laglaoui, A., Bakkali, M., and Arakrak, A. 2015. Solubilization of inorganic phosphate by *Pseudomonas* strains isolated from rice rhizosphere. *International Journal of Biosciences*. 6: 10. 116-124.
2. Achat, D.L., Morel, C., Bakker, M.R., Augusto, L., Pellerin, S., Gallet-Budynek, A., and Gonzalez, M. 2010. Assessing turnover of microbial biomass phosphorus: combination of an isotopic dilution method with a mass balance model. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 12. 2231-2240.
3. Babana, A.H., and Antoun, H. 2006. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant and Soil*. 287: 1-2. 51-58.
4. Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T.U., Munir, A., and Gurmani, A.R. 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*. 36: 10. 904-916.
5. Bashan, Y., Kamnev, A.A., and de-Bashan, L.E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*. 49: 4. 465-479.
6. Cao, Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G., and Hu, Z. 2018. Phosphorus solubilizing and releasing bacteria screening from the rhizosphere in a natural wetland. *Water*. 10: 2. 195.
7. Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1961. *Methods of analysis for soils, plants and waters*. Riverside University California press. 309p.
8. Charana Walpola, B., and Yoon M.H. 2013. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R.

- Wilczek). Chilean Journal of Agricultural Research. 73: 3. 275-281.
9. Chen, G.C., He, Z.L., and Huang, C.Y. 2000. Microbial biomass phosphorus and its significance in predicting phosphorus availability in red soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 31: 5-6. 655-667.
 10. Condron, L.M., Turner, B.L., and Cade-Menun, B.J. 2005. Chemistry and Dynamics of Soil Organic Phosphorus. P 87-121. In: J.T. Sims and A.N. Sharpley (eds.) Phosphorus, Agriculture and Environment. ASA, Madison, WI.
 11. De Oliveira Mendes, G., Zafra, D.L., Vassilev, N.B., Silva, I.R., Ribeiro, J.I., and Costa, M.D. 2014. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride. Applied and Environmental Microbiology. 80: 10. 3081-3085.
 12. Ebrahimi, M., Safari-Sinegani, A.A., Sarikhani, M.R., and Aliasghar zad, N. 2018. Study on phosphate solubilizing ability of some bacterial isolates and determination of solubilized phosphorus fractionation in supernatant and microbial biomass. Biological Journal of Microorganism. 7: 25. 109-125. (In Persian)
 13. Gerke, J. 2015. Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. Plants. 4: 2. 253-266.
 14. Ghaderi, A., Aliasghar zad, N., Oustan, S., and Olsson, P.A. 2008. Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). Soil and Environment. 27: 1. 71-76.
 15. Gilbert, N. 2009. Environment: the disappearing nutrient. Nature News, 461: 7265. 716-718.
 16. Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica (Cairo). Pp: 1-15.
 17. Guang-Can, T.A.O., Shu-Jun, T.I.A.N., Miao-Ying, C.A.I., and Guang-Hui, X.I.E. 2008. Phosphate-solubilizing and-mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. Pedosphere. 18: 4. 515-523.
 18. Gupta, N., Sabat, J., Parida, R., and Kerkatta, D. 2007. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. Acta Botanica Croatica. 66: 2. 197-204.
 19. Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.J., and Ouhdouch, Y. 2008. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 11. 2565-2575.
 20. Huang, L.M., Jia, X.X., Zhang, G.L., and Shao, M.A. 2017. Soil organic phosphorus transformation during ecosystem development. A review. Plant Soil. 417: 17-42.
 21. Karami, Y., Samadi, A., Fallah Nosrat Abad, A., Sepehr, E., and Barin, M. 2021. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate mines and investigation on their soil phosphate solubilization potential. Applied Biology. 35: 3. 83-98.
 22. Karpagam, T., and Nagalakshmi, P.K. 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3: 3. 601-614.
 23. Keneni, A., Assefa, F., and Prabu, P.C. 2010. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean of Ethiopia and their abilities on solubilizing insoluble phosphates. Agricultural Science and Technology. 12: 1. 79-89.
 24. Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science. 56: 1. 73-98.
 25. Khoshru, B., and Sarikhani, M.R. 2018. Isolation and identification of temperature resistant phosphate solubilizing bacteria for use in phosphatic microbial fertilizer. Journal of Water and Soil. 32: 1. 155-167. (In Persian)

26. Kouno, K., Wu, J., and Brookes, P.C. 2002. Turnover of biomass C and P in soil following incorporation of glucose or ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 617-622.
27. Liebisch, F., Keller, F., Huguenin-Elie, O., Frossard, E., Oberson, A., and Bünemann, E.K. 2014. Seasonal dynamics and turnover of microbial phosphorus in permanent grassland. *Biology and Fertility of Soils*. 50: 465-475.
28. Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S., and Zhang, M. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*. 96: 217-224.
29. Liu, S. 2019. Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China. *Frontiers in Microbiology*. 10: 2171.
30. Maharajan, T., Ceasar, S.A., Ajeesh Krishna, T.P., Ramakrishnan, M., Duraipandian, V., Naif Abdulla, A.D., and Ignacimuthu, S. 2018. Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants. *Plant Breeding*. 137: 1. 10-26.
31. Melo, J., Carvalho, L., Correia, P., de Souza, S.B., Dias, T., Santana, M., and Ramos, A.C. 2018. Conventional farming disrupts cooperation among phosphate solubilizing bacteria isolated from *Carica papaya*'s rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 124: 284-288.
32. Mursyida, E., Mubarik, N.R., and Tjahjoleksono, A. 2015. Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing bacteria from the area around the limestone mining in Cirebon quarry. *Research Journal of Microbiology*. 10: 6. 270.
33. Murphy, J.A.M.E.S., and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
34. Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 1. 265-270.
35. Neal, A.L., Rossmann, M., Brearley, C., Akkari, E., Guyomar, C., Clark, I.M., and Hirsch, P.R. 2017. Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils. *Environmental Microbiology*. 19: 7. 2740-2753.
36. Ogbo, F.C. 2010. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. *Bioresource Technology*. 101: 4120-4124.
37. Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E., and Sa, N.M.H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 9. 1782-1787.
38. Park, J., Bolan, N., Mallavarapu, M., and Naidu, R. 2010. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World Brisbane. 1-6 August. 2010. 65-68.
39. Park, J.H., Bolan, N., Megharaj, M., and Naidu, R. 2011. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Hazardous Materials Journal*. 185: 829-836.
40. Paul, D., and Sinha, S.N. 2013. 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*. 4: 4. 409-412.
41. Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., and Velazquez, E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strains of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 1. 103-110.
42. Rodriguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 4. 319-339.

43. Savita, P.D., Suvarna, V.C., Yallappa, M., and Nivetha, N. 2017. Phytate solubilizing microorganisms and enzyme phytase to combat nutritional problems in cereal-based foods. *Bacteriology and Mycology*. 4: 3. 86-89.
44. Schnug, E., and Haneklaus, S.H. 2016. The Enigma of Fertilizer Phosphorus Utilization. P 7-26. In: E. Schnug and L.J. De Kok (eds.) *Phosphorus in Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht.
45. Sperber, J.I. 1985. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Crop and Pasture Science*. 9: 6. 778-781.
46. Tan, H., Wu, X., Xie, L., Huang, Z., Peng, W., and Gan, B. 2016. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from fungus-garden associated metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 2225-2241.
47. Taurian, T., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., Tonelli, M.L., Ludueña, L., Pena, D., Ibáñez, F., and Fabra, A. 2010. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*. 329: 1-2. 421-431.
48. Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T., and Osaki, M. 2005. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental Microbiology*. 7: 3. 396-404.
49. Vyas, P., and Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing *fluorescent Pseudomonas*. *BMC Microbiology*. 9: 1. 1-15.
50. Wan, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., and Hem, D. 2020. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1-15.
51. Whitelaw, M.A., Harden, T.J., and Helyar, K.R. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 5. 655-665.
52. Wu, J., Huang, M., Xiao, H.A., Su, Y.R., Tong, C.L., Huang, D.Y., and Syers, J.K. 2007. Dynamics in microbial immobilization and transformations of phosphorus in highly weathered subtropical soil following organic amendments. *Plant and Soil*. 290: 1-2. 333-342.
53. Xiao, C.Q., Wu, X.Y., and Chi, R.A. 2015. Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus Niger* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176: 2. 518-528.
54. Xiao, C., Zhou, Y., Hu, J., Guo, S., Zhou, N., and Chi, R. 2020. Biosolubilization of low-grade rock phosphate by native microbial consortia from phosphate mines: effect of sampling sources and culture media. *Geomicrobiology Journal*. 37: 9. 859-866.
55. Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S., and Ghosh, P. 2015. Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their rock phosphate solubilizing abilities. *Geomicrobiology Journal*, 32: 6. 475-481.
56. Zhang, L., Ding, X., Peng, Y., George, T.S., and Feng, G. 2018. Closing the loop on phosphorus loss from intensive agricultural soil: A microbial immobilization solution. *Frontiers in Microbiology*. 9: 104.

