جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

باکتری‌های حل‌کننده فسفات:
جداسازی، خالص‌سازی، ارزیابی و شناسایی

نگارندگان

علیرضا فلاح نصرت آباد، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب

بهمن خوشرو، محقق پسا دکترای موسسه تحقیقات خاک و آب

خدیجه اربابی اناری، کارشناس بخش آزمایشگاه بیولوژی خاک

اشرف اسمعیلی‌زاد، محقق بخش آزمایشگاه بیولوژی خاک

دستورالعمل فنی: 654

1403

مشخصات اثر

عنوان: باکتری‌های حل‌کننده فسفات: جداسازی، خالص‌سازی، ارزیابی و شناسایی

نگارندگان: علیرضا فلاح نصرت آباد، بهمن خوشرو، خدیجه اربابی اناری، اشرف اسمعیلی‌زاد

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

لیتوگرافی، چاپ و صحافی: انتشارات اسرار علم

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: آرش تافته

سال انتشار: 1403

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 66743 در تاریخ 1403/11/13 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 026 -36201900

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info.swri@areeo.ac.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

1 مقدمه 1
2 فسفر 2
3 کودهای شیمیایی فسفاته 3
4 میکروارگانیسم‌های خاکزی و نقش آنها در افزایش انحلال فسفر 5
4-1 باکتری‌های حل‌کننده فسفات 5
4-2 مکانیسم‌های انحلال فسفات 6
4-3 جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات 9
4-3-1 نمونه‌برداری 9
4-3-2 تهیه سریال رقت‌ها 9
4-3-3 انتقال به محیط کشت 10
4-3-4 شمارش جمعیت باکتری حل‌کننده فسفات 10
4-3-5 جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات 12
4-4 ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات 12
4-4-1 ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول 12
4-4-2 ارزیابی کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول 13
4-4-3 ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات آلی نامحلول 13
4-4-4 ارزیابی کمی توان حل‌کنندگی فسفات آلی نامحلول 14
4-5 محیط‌های کشت، مواد و استانداردها 15
4-5-1 محیط کشت اسپربر 15
4-5-2 سرم فیزیولوژیک 16
4-5-3 محیط کشت نوترینت آگار (NA) 17
4-5-4 معرف وانادات- مولیبدات (VMR) 17
4-5-5 تهیه محلول‌های استاندارد فسفر و اندازه‌گیری فسفر به روش زرد 18
4-6 دستگاه‌های موردنیاز 18
4-7 چکیده گرافیکی آزمایشات مربوط به باکتری‌های حل‌کننده فسفات 19

8-4 شناسایی جدایه‌های باکتریایی 20
1-8-4 رنگ‌آمیزی گرم 20
2-8-4 تست‌های بیوشیمیایی 21
3-8-4 شناسایی مولکولی 21
9-4 تعاریف مربوط به باکتری‌های حل‌کننده فسفات 22
1-9-4 باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) 22
2-9-4 محیط کشت اسپربر 22
3-9-4 شاخص حلالیت 22
4-9-4 هاله 23
5-9-4 استرپتومایسین 23
6-9-4 رزبنگال 23
7-9-4 سیکلوهگزیماید 23
8-9-4 مایه تلقیح حل‌کننده فسفات 23
9-9-4 کود میکروبی فسفاته 24
10-9-4 خاک فسفات 24
11-9-4 فسفاتاز 24
10-4 پیوست 24
1-10-4 باکتری‌های حل کننده فسفات 24
5 منابع 26

1 مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی اساسی برای رشد گیاهان است که نقش مهمی در فرایندهای زیستی مانند فتوسنتز و سنتز اسیدهای نوکلئیک دارد. کشاورزان معمولاً هرساله مقادیر زیادی کودهای شیمیایی فسفاته جهت تأمین فسفر موردنیاز گیاه در خاک مصرف می‌کنند (فلاح، 1382). بخش قابل‌توجهی از فسفر موجود در این کودها بعد از ورود به خاک، در خاک‌های آهکی با عناصر کلسیم و منیزیم و در خاک‌های اسیدی با آلومینیوم و آهن واکنش داده و رسوب نموده و به اشکال نامحلول فسفر تبدیل می‌گردد و از دسترس گیاه خارج می‌شود (کردل و همکاران، 2011) و تقریباً تنها 10 تا 30 درصد فسفر اضافه شده به خاک‌ها برای گیاه قابل‌استفاده خواهد بود (والپولا و یون، 2012). با این توصیف بخش اعظمی از هزینه‌های کشاورزان به هدر می‌رود. بهره‌گیری از پتانسیل میکروب‌های ریزوسفر به‌ویژه باکتری‌ها می‌تواند به افزایش زیست‌فراهمی فسفر، کاهش نیاز به کودهای شیمیایی و کاهش مخاطرات زیست‌محیطی کمک کند (فلاح و همکاران، 1386). باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان یکی از ابزارهای زیستی مهم در بهبود دسترسی گیاهان به فسفر، موردتوجه قرار گرفته‌اند. این باکتری‌ها توانایی تبدیل فسفرهای نامحلول به اشکال محلول و قابل‌جذب را دارند که می‌تواند نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی فسفاته را کاهش داده و درعین‌حال بهره‌وری محصولات کشاورزی را افزایش دهد (خوشرو و همکاران، 1394). در این دستورالعمل، فرایند جداسازی، خالص‌سازی، ارزیابی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌تفصیل مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این دستورالعمل، بررسی راهکارهای انتخاب سویه‌های باکتریایی با بالاترین کارایی در حل‌کردن فسفات و ارائه روشی استاندارد برای ارزیابی و شناسایی این باکتری‌ها در شرایط مختلف است. این گزارش می‌تواند به‌عنوان مرجعی برای پژوهشگران و متخصصان در زمینه میکروبیولوژی خاک و تولیدکنندگان کودهای زیستی در راستای کشاورزی پایدار و مدیریت بهینه خاک و آب مورد استفاده قرار گیرد.

2 فسفر

فسفر به‌عنوان عنصر غذائی حیاتی برای گیاهان و میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود. فرم‌های معدنی این عنصر در خاک به‌صورت ترکیباتی با کلسیم، آهن، آلومینیوم و فلور است درحالی‌که فرم‌های آلی آن شامل فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلوئیک بوده که اصولاً از طریق تجزیه گیاهان سبز تأمین می‌شود، بنابراین خاک‌های حاوی مواد آلی فراوان از نظر فسفر آلی نیز غنی هستند (خان و همکاران، 2007). فسفر نقش‌های متفاوت در موجودات زنده بر عهده دارد و کمبود آن می‌تواند عامل محدودکننده‌ای برای موجودات زنده به‌ویژه در تولیدات کشاورزی باشد. گیاهان فسفر موردنیاز خود را به شکل آنیون فسفات ($H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{2-}) از محلول خاک جذب می‌کنند. فسفر کل در خاک‌های کشاورزی به دو شکل آلی و معدنی و به مقدار فراوان در محدوده $400\text{-}1200 mg\ kg^{-1}$ وجود دارد (رودریگز و فراجا، 1999). اما غلظت فسفات محلول در خاک معمولاً خیلی پایین بوده و در سطح کمتر از $5\ mg\ kg^{-1}$ می‌باشد؛ بنابراین در غالب خاک‌ها از نظر مقدار کل فسفر مشکلی وجود ندارد؛ بلکه فراهمی و دردسترس‌بودن آن برای گیاهان مشکل می‌باشد (فلاح، 1399)؛ لذا علی‌رغم بالابودن فسفر کل خاک‌ها دسترسی آن برای گیاهان کم است. قسمت عمده فسفر خاک به همراه کاتیون‌های فلزی رسوب‌کرده و از دسترس گیاه خارج می‌شود و به همین دلیل نیز استفاده از کودها نتیجه‌بخش نیست (پائول، 2007). در خاک‌های ایران به دلیل دارابودن pH بالا و یون کلسیم زیاد، مقدار محلول و قابل‌جذب فسفر کمتر از مقدار لازم برای تأمین رشد مناسب گیاه است. روش متداول برای مقابله با این کمبودها استفاده از کودهای شیمیایی است که علاوه بر قیمت زیاد و بازدهی کم، احتمال آلودگی‌های زیست‌محیطی را به دنبال دارند (جیائو و همکاران، 2012). بر خلاف نیتروژن، منابع تولیدکننده فسفر تجدیدپذیر نیست و این منابع تا 100 سال دیگر به اتمام می‌رسد، از طرف دیگر آلودگی‌های روزافزون ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی فسفاته به‌خصوص آلودگی آنها به عنصر سنگین کادمیم، ضرورت یافتن جایگزین مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع‌یافته در خاک را ایجاب می‌کند، بنابراین ضروری است که به دنبال راه‌حل‌های مناسب برای رفع این مشکلات بود (احمد و همکاران، 2023).

3 کودهای شیمیایی فسفاته

تأمین فسفات موردنیاز گیاه با استفاده از کودهای شیمیایی تاریخ دیرینه‌ای دارد و به انقلاب سبز و معرفی کودها در کشاورزی بازمی‌گردد. در ایران نیز، همگام با تحولات موجود در این زمینه، واردات کودهای شیمیایی و استفاده از آنها در بخش کشاورزی شروع شد. تأسیس اولین کارخانه کود شیمیایی برای تولید سوپر فسفات ساده به سال 1324 باز می‌گردد (فائو، 2006).

افزایش سطح تولید مواد غذایی به همراه توسعه بهداشت جهانی منجر به افزایش جمعیت بشر شده و در اکثر کشورها تهیه غذای کافی دوباره به چالش فراروی دولت‌ها تبدیل شده است. بر اساس گزارش سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO) در سال 2022، تا سال 2050، برای تأمین غذای جمعیت جهانی که پیش‌بینی می‌شود به 9/7 میلیارد نفر برسد، تولید مواد غذایی باید تا 60 درصد افزایش یابد. با توجه به محدودیت اراضی قابل کشت، این افزایش نیاز به تولیدات کشاورزی باید از طریق افزایش تولید در واحد سطح پاسخ داده شود، که به نوبه خود منجر به افزایش مصرف کودهای شیمیایی و فشار بیشتر بر منابع طبیعی خواهد شد (فائو، 2017).

بر اساس گزارش فائو میزان مصرف کودهای فسفره به‌صورت P_2O_5 در سال 2010، 30/4 میلیون تن تخمین زده شده بود که این آمار در سال 2021 به 47/8 میلیون تن رسید (فائو، 2006؛ 2022).

اگرچه کاربرد کودهای شیمیایی در ابتدا تأثیر بسزایی در افزایش عملکرد داشت، اما استفاده بیش از حد این نهاده‌ها، کاهش حاصلخیزی خاک و تخریب محیط‌زیست را در پی داشته است. علاوه بر این، کارایی مصرف کودهای شیمیایی هم‌اکنون از لحاظ تئوری به بالاترین سطح خود رسیده است، بدین معنی که استفاده بیشتر از کودهای شیمیایی به‌سختی می‌تواند عملکرد را افزایش دهد (لو و همکاران، 2021).

از بین عناصر معدنی، کمبود دو عنصر نیتروژن و فسفر بیشترین محدودیت را برای رشد و عملکرد گیاهان ایجاد می‌کنند. در سال 2008، برای پاسخ به نیاز فسفر سالیانه بیش از 4 میلیارد دلار صرف مصرف کودهای فسفره در جهان می‌شد که این آمار برای سال 2020 به

15 میلیارد دلار رسید (لیو و همکاران، 2008؛ راندایو و همکاران، 2021). در کشور ایران نیز در سال 1402-1401، میزان نیاز کود فسفاته کشور برابر 1/4 میلیون تن (1/2 میلیون تن در بخش زراعت و 0/2 میلیون تن در بخش باغبانی) تخمین زده شده است که بخش زیادی از آن از طریق واردات تامین می‌شود (مشیری و همکاران، 1402). این در حالی است که هر ساله بین 75 الی 90 درصد فسفر اضافه شده به خاک به دلیل آهکی بودن اکثر خاک‌ها، وجود pH بالا، تنش خشکی، وجود بیکربنات در آب آبیاری و کمبود مواد آلی موجود در خاک و همچنین در اثر ترکیب با یون‌های کلسیم، آلومینیوم و آهن در خاک به‌صورت رسوب در می‌آید و از حالت نفع رساندن برای گیاه خارج می‌گردد (استیونسون، 1986). ادامه چنین روندی برای مصرف کودهای فسفره علاوه بر اتلاف هزینه، تخریب و آلودگی منابع پایه یعنی خاک و آب را در پی دارد. این در حالی است که توانایی تامین بخشی از کودهای شیمیایی وارداتی از طریق تولید کودهای زیستی فسفاتی در داخل کشور وجود دارد.

نیاز به جایگزینی مناسب برای کودهای شیمیایی فسفاته زمانی احساس می‌شود که بدانیم استفاده زیاد از کودهای شیمیایی مخاطرات محیطی و خطراتی برای سلامت انسان به همراه دارد و در عمل بازدهی کودهای شیمیایی فسفاته بین 25-10 درصد می‌باشد. این به آن معنی است که تقریباً 90-75 درصد آن در خاک در اثر واکنش با کاتیون‌های فلزی به‌صورت رسوب و غیرقابل استفاده گیاه تبدیل می‌شود (استیونسون، 2005؛ ابراهیم و همکاران، 2022).

به‌طورکلی، تخمین زده می‌شود فسفات معدنی که با فناوری امروز استخراج می‌شود تا چند دهه دیگر به اتمام می‌رسد؛ بنابراین انگیزه زیادی برای تأمین فسفات از منابع جایگزین احساس می‌شود. ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع‌یافته در خاک زمانی بیشتر احساس می‌شود که بر این امر واقف گردیم که منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تأمین فسفات موردنیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا 100 سال دارا می‌باشد (گلدستین و همکاران، 1994).

یکی از راه‌های عملی برای استفاده از فسفر تجمع‌یافته در اراضی، به‌کارگیری کودهای زیستی فسفاته می‌باشد (فلاح و آرمنده، 1385؛ خوشرو و همکاران، 1396). این نهاده‌های

زیستی در واقع حاوی میکروارگانیسم‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه هستند که از طریق فرایندهای ویژه‌ای می‌توانند حلالیت ترکیبات فسفر رسوب‌کرده در خاک را افزایش داده و بدین صورت‌بخشی از فسفر موردنیاز گیاه را تأمین نمایند.

4 میکروارگانیسم‌های خاکزی و نقش آنها در افزایش انحلال فسفر

میکروارگانیسم‌های حل‌کنندهٔ فسفات در همه‌جا حضور دارند و از خاکی به خاک دیگر متفاوت هستند. آنها بیشتر از ریزوسفر گیاهانی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند جداسازی شده‌اند (فلاح و همکاران، 1382؛ دجونا و همکاران، 2022). میکروارگانیسم‌های خاک در اکثر فرایندهای آن دخالت دارند و یکی از آنها نقش و تأثیر در چرخه فسفر، تغییر و تبدیل شکل‌های مختلف فسفر و در نهایت تأثیر بر فراهمی زیستی آن را برای گیاهان می‌باشد. مدارکی مبنی بر نقش میکروارگانیسم‌های ریزوسفری در انحلال فسفات معدنی به سال 1903 برمی‌گردد (ایلمر و اسکینر، 1995). میکروارگانیسم‌ها از طریق معدنی کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب یافته، فراهمی زیستی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند (فلاح، 1396؛ خوشرو و همکاران، 2020 و 2023). این دسته از میکروارگانیسم‌ها گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن که در محیط آزاد شده است در اختیار گیاه قرار می‌گیرد. همچنین فسفر موجود در زیست‌توده میکروبی که به شکل غیرمتحرک می‌باشد، نیز به‌صورت بالقوه قابل‌استفاده برای گیاهان است (فراجا، 2009).

4-1 باکتری‌های حل‌کننده فسفات

باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار مؤثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (آلام و همکاران، 2002). بر اساس سنجش‌های غربالگری آزمایشگاهی از نمونه‌های ریزوسفری خاک، مشخص شده است که حدود بیش از 40 درصد جمعیت میکروبی قابل‌کشت و رشد، مربوط به میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات می‌باشند (فراجا، 2009). باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات حدود 50-1 درصد و قارچ‌ها حدود

0/1 تا 0/5 درصد از کل جمعیت میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند (چین و همکاران، 1996؛ خان و همکاران، 2009؛ لیانگ و همکاران، 2020). در مطالعات متعددی توانایی سویه‌های مختلف از باکتری‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول همچون تری کلسیم فسفات، دی کلسیم فسفات، دی هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات گزارش شده است (مالتیس-لاری و همکاران، 2014؛ فلاح، 1399). در میان انواع باکتری که توان حل‌کنندگی فسفات آنها ثابت شده است، می‌توان جنس‌های *فلاووباکتریوم*، *سودوموناس*، *باسیلوس*، *اگروباکتریوم*، *میکروکوکوس*، *انتروباکتر* و همچنین جنس‌های مختلف باکتری‌های *ریزوبیومی* را نام برد (فلاح، 1399؛ خوشرو و همکاران، 1397).

2-4 مکانیسم‌های انحلال فسفات

باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[1]) در طول استفاده از مواد آلی خاک به‌عنوان منابع کربن و انرژی، اسیدهای آلی تولید می‌کنند (شارما و همکاران، 2013). این اسیدهای آلی کاتیون‌ها (Al^{3+}، Fe^{3+} و Ca^{2+}) را کلات می‌کنند (شارما و همکاران، 2013) و آنها را در مقابل فسفات، غیرفعال (خلع سلاح) می‌کنند. اسیدهای کربوکسیلیک تولید شده توسط PSB میل ترکیبی بالایی برای Ca^{2+} دارند؛ بنابراین، کربوکسیلیک اسید ممکن است فسفر را از کانی حاوی فسفات نامحلول مانند سنگ فسفات (RP[2]) و همچنین از فسفر متصل به کلسیم جدا کرده و حل کند (اینگل و پادول، 2017). پروتون (H^+) و اسیدهای آلی، pH خاک را کاهش می‌دهند و آنیون‌های اسید آلی برای مکان‌های جذب روی خاک با فسفات رقابت می‌کنند (شریواستاوا و همکاران، 2018)؛ بنابراین، تثبیت فسفر را کاهش داده و قابلیت دسترسی آن را افزایش می‌دهند. همچنین، آنیون‌های اسید آلی می‌توانند فسفر را از طریق تبادل آنیونی PO_4^{3-} حل کنند (سوماری و همکاران، 2020).

اسیدهای آلی می‌توانند مواد معدنی سیلیکات را با کیلیت کردن آلومینیم (Al) از آنها هوازده کرده و یون‌های سیلیکات تولید کنند. این یون‌های سیلیکات می‌توانند با یون‌های فسفات برای مکان‌های جذب، رقابت کنند و تثبیت فسفر را کاهش دهند (زیدی و

[1] Phosphate solubilizing bacteria
[2] Rock phosphate

همکاران، 2009). در طول جذب کاتیون، برای تعادل بار، PSB اقدام به ترشح پروتون کرده و محیط اطراف کلنی‌های خود را اسیدی می‌کنند (مونار و همکاران، 2020). بنابراین، غلظت $H_2PO_4^-$ را نسبت به HPO_4^{2-} افزایش می‌دهند (وایتلاو، 2000).

دی‌اکسیدکربن (CO_2) تولید شده توسط تنفس میکروبی می‌تواند با H_2O واکنش داده و اسیدهای کربنیک تشکیل دهد (خان و همکاران، 2009). کربنات (CO_3^{2-}) و بی‌کربنات (HCO_3^-) تشکیل شده از اسیدهای کربنیک ممکن است در واکنش تبادل آنیون با فسفات شرکت کنند. کربنات می‌تواند به کلسیم در خاک‌های خنثی به‌طرف آهکی متصل شده و جایگزین فسفات (PO_4^{3-}) از سنگ فسفات شود. هنگامی که کربنات (فرم ورقه‌ای) جایگزین فسفات (فرم چهاروجهی) در سنگ فسفات می‌شود، ساختار کریستالی سنگ فسفات ناپایدار شده و به انحلال فسفر از آن کمک می‌کند (کوماری و فوقات، 2008).

تنفس PSB ممکن است باعث کمبود O_2 در نواحی موضعی اطراف کلنی میکروب‌ها شده که آهن فریک (Fe^{3+}) را به فرم آهن فرو (Fe^{2+}) کاهش داده و فسفات آهن فریک ($FePO_4$) را به فسفات آهن فرو [$Fe_3(PO_4)_2$] تبدیل کند و در نتیجه انحلال فسفر را افزایش دهد (احمد و همکاران، 2009).

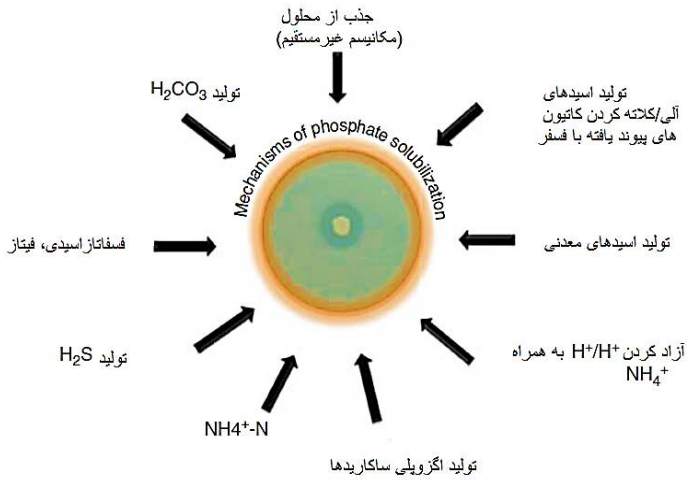
آمونیاک و سولفید هیدروژن تولید شده در طی تجزیه میکروبی مواد آلی، می‌توانند به اسیدهای قوی (مانند HNO_3، H_2SO_4) در خاک اکسید شوند و این اسیدهای معدنی می‌توانند فسفات نامحلول خاک را حل کنند. یک PSB مانند *Pseudomonas* sp. می‌تواند سیدروفورهای کلات کننده آهن تولید کند، واکنش بین آهن و فسفر را کاهش دهد و فسفر را بیشتر در دسترس گیاهان قرار دهد (پاهاری و همکاران، 2017).

تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS[1]) توسط PSB و جداسازی فلزات (Fe، Al و Ca) توسط EPS (تاقوت و همکاران، 2015) ممکن است مکانیسم دیگر حل‌شدن فسفر نامحلول باشد. همچنین PSB می‌تواند فسفر محلول خاک را جذب کرده و غلظت فسفر را در مجاورت خود کاهش دهد و با ایجاد شیب غلظت به طور غیرمستقیم فسفر نامحلول را (برای حفظ غلظت تعادلی فسفر در محلول خاک) حل کند (ژانگ و همکاران، 2021). PSB

[1] Exopolysaccharide

هتروتروف مواد آلی خاک را تجزیه کرده و بدین ترتیب فسفر متصل به مواد آلی را در خاک آزاد می‌کند (زیدی و همکاران، 2009). همچنین، این میکروب‌ها می‌توانند فسفر خاک را به شکل فسفر زیست‌توده میکروبی (MBP[1]) آلی کنند، بنابراین تثبیت فسفر را توسط خاک کاهش دهند. MBP می‌تواند به مدت کوتاهی فسفر را غیرمتحرک کند، اما پس از مرگ و تجزیه بعدی میکروب‌ها، MBP در دسترس گیاهان قرار خواهد گرفت (خان و همکاران، 2009).

اکثر آنزیم‌های فسفاتاز خارج سلولی توسط جمعیت‌های PSB تولید شده‌اند (دودور و طباطبایی، 2003). آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی، فسفر آلی را از طریق هیدرولیز معدنی کرده و فسفر معدنی را از بقایای آلی جدا می‌کنند (لی و همکاران، 2021)؛ بنابراین، PSB به طور مستقیم یا غیرمستقیم، فسفر را از خاک و سنگ فسفات محلول کرده و درعین‌حال از تثبیت فسفر محلول در خاک نیز جلوگیری می‌کند. برخی از مکانیسم‌های درگیر در انحلال فسفات نامحلول در شکل 1 ارائه شده است.



شکل 1- مکانیسم‌های انحلال فسفات توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات

[1] Microbial biomass phosphorus

3-4 جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

1-3-4 نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خاک یا ریزوسفر گیاهان برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات نیازمند برنامه‌ریزی دقیق و استفاده از ابزارهای مناسب است. ابتدا باید نقاط مناسب برای نمونه‌برداری در مزرعه انتخاب شوند. این نقاط ممکن است به‌صورت تصادفی یا بر اساس یک طرح مشخص انتخاب شوند تا تفاوت‌های محیطی مانند سطح فسفات در خاک‌پوشش داده شود. برای انجام این کار، ابزارهایی مانند بیلچه یا مته دستی[1] برای حفاری و برداشت نمونه خاک از عمق مشخص (معمولاً 0 تا 20 سانتی‌متر) موردنیاز است. کیسه‌های پلاستیکی یا شیشه‌های استریل برای جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها استفاده می‌شوند و برای جلوگیری از آلودگی، اسپری الکل برای استریل کردن ابزارها بین هر برداشت نمونه ضروری است. همچنین برچسب و ماژیک برای علامت‌گذاری نمونه‌ها و ثبت اطلاعات مانند شماره نمونه، مکان، تاریخ، و دماسنج خاک برای اندازه‌گیری دمای خاک در زمان نمونه‌برداری موردنیاز است. در صورت نمونه‌برداری از ریزوسفر، خاک چسبیده به ریشه‌ها باید جمع‌آوری شود. پس از برداشت نمونه‌ها، آن‌ها باید به‌دقت در کیسه‌های استریل قرار داده شده و با برچسب‌هایی که شامل اطلاعات دقیق محل و زمان برداشت هستند، علامت‌گذاری شوند. در نهایت، نمونه‌ها باید در شرایط مناسب، معمولاً در دمای 4 درجه سانتی‌گراد (مثلاً درون یک جعبه حاوی یخ)، به آزمایشگاه منتقل شوند تا از تغییرات در جامعه میکروبی جلوگیری شود. پس از انتقال، جداسازی و کشت باکتری‌های حل‌کننده فسفات با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی در آزمایشگاه انجام می‌شود. این اقدامات باید بادقت صورت گیرد تا دقت و صحت نتایج حاصل از تحلیل‌های میکروبیولوژیکی تضمین شود (ریچاردسون و سیمپسون، 2011).

2-3-4 تهیه سریال رقت‌ها

به‌منظور تهیه رقت‌ها از تکنیک رقت‌های سریالی[2] استفاده می‌شود. برای رقت اولیه (10^1)، 10 میلی‌لیتر یا 10 گرم از نمونه (خاک، آب، کودهای زیستی و غیره، با فرض

[1] Auger
[2] Serial dilution technique

چگالی 1 گرم بر سانتی‌متر مکعب برای ترکیبات جامد) به 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل (مطابق با بند 5-3) اضافه می‌شود. رقت‌های بعدی تا رقت 10^9 در لوله‌هایی که حاوی 9 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل هستند، با انتقال 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه می‌شوند (بلوجت، 2005).

3-3-4 انتقال به محیط کشت

برای مطالعه و جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات، از محیط‌های کشت مختلفی استفاده می‌شود که هر یک به‌منظور شناسایی و ارزیابی توانایی این باکتری‌ها در حل‌کردن فسفات‌های نامحلول طراحی شده‌اند. محیط‌های رایج شامل Sperber، Pikovskaya (PVK)، NBRIP[1] و Alexandrov هستند. هر کدام از این محیط‌ها حاوی منابع مختلف فسفات نامحلول مانند فسفات کلسیم، آهن یا آلومینیوم هستند و باکتری‌هایی که توانایی حل‌کردن این فسفات‌ها را دارند، نواحی شفافی در اطراف کلنی‌های خود ایجاد می‌کنند. انتخاب صحیح محیط کشت بر اساس نوع فسفات و شرایط محیطی، نقش مهمی در موفقیت فرایند جداسازی و مطالعه این باکتری‌ها دارد. در میان محیط‌های ذکر شده، محیط کشت Sperber دارای اهمیت زیادی بوده و رایج‌تر است (نوتیال، 1999).

برای جداسازی سویه‌های PSB موجود در نمونه، 100 میکرولیتر از چهار رقت پایانی (رقت 10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7} و 10^{-6}) در سه تکرار روی محیط کشت جامد Sperber (اسپربر، 1958) با استفاده از میله شیشه‌ای L شکل منتقل می‌شود. پس از انتقال سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های مشخص شده روی محیط کشت جامد، پلیت‌ها در دمای مناسب به مدت 14-7 روز گرماگذاری می‌شوند. رشد باکتریایی در محیط کشت باید پس از 2-3 روز از کشت اولیه پایش شود (نصرتی و همکاران، 2014).

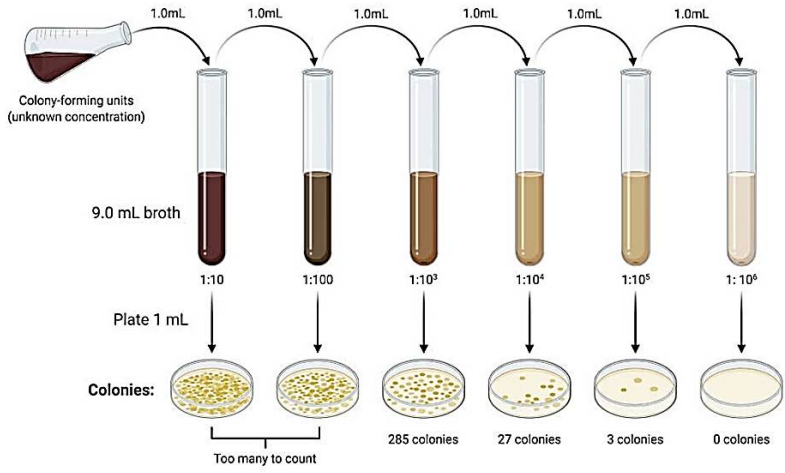
4-3-4 شمارش جمعیت باکتری حل‌کننده فسفات

برای شمارش، تنها کلنی‌هایی که دارای هاله شفاف اطراف خود هستند باید شمارش شوند (شکل 2). تعداد باکتری‌های موردنظر را مطابق با دستورالعمل‌های موجود در شکل 3

[1] National Botanical Research Institute's Phosphate

محاسبه کرده و نتایج را به‌صورت واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم (cfu/g) برای محصولات جامد یا در هر میلی‌لیتر (cfu/mL) برای محصولات مایع گزارش کنید (بلوجت، 2005).

شکل 2- شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفات با روش رقت‌های سریالی و تفکیک باکتری‌های دارای هاله انحلال.



CFU/mL = (no. of colonies x dilution factor) / volume of culture plate

Example: (285 colonies x 10^3) / 1= 2.85 x 10^5 CFU/mL in sample

شکل 3- آماده سازی نمونه با استفاده از روش رقت‌های سریالی و نحوه تعیین جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات (بلوجت، 2005).

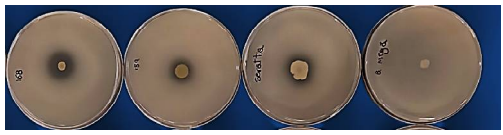
5-3-4 جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

کلنی‌های متمایز باکتری‌های دارای هاله در محیط کشت، همچنین براساس فنوتیپ و مورفولوژی آنها جداسازی و خالص‌سازی می‌شوند. این باکتری‌ها به محیط کشت معمولی باکتری مانند NA منتقل می‌شوند. مراحل بعدی شامل انجام آزمایش‌های کارایی باکتری‌ها برای حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی و آلی در محیط‌های جامد و مایع Sperber است. علاوه بر این، فرایندهای شناسایی با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی و تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی باکتری‌های توانمند حل‌کننده انجام می‌شوند.

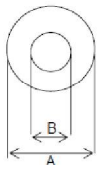
4-4 ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات

4-4-1 ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

برای انجام این آزمون، از محیط کشت Sperber که حاوی منابع نامحلول فسفات مانند تری‌کلسیم فسفات (به‌عنوان تنها منبع فسفر) استفاده می‌شود. برای هر جدایه باکتریایی، سه پتری‌دیش تخصیص داده می‌شود. ناحیه مرکزی هر پتری‌دیش با 10-5 میکرولیتر از کشت شبانه باکتریایی (کشت شده در محیط NB) تلقیح می‌شود. پس از آن، پتری‌دیش‌های تلقیح شده به مدت 7 روز در دمای مناسب انکوبه می‌شوند (Sperber, 1985). پس از دوره انکوباسیون، نسبت قطر هاله که به‌عنوان (A) مشخص می‌شود به قطر کلنی باکتریایی (B) با استفاده از ابزار مناسب اندازه‌گیری می‌شود. نسبت آنها را طبق شکل‌های 4 و 5 محاسبه کنید.



شکل 4 - توانایی تشکیل هاله در اطراف کلنی‌های باکتریایی



شکل 4 – اندازه‌گیری کیفی (نیمه‌کمی) توان تشکیل هاله در اطراف کلنی‌های باکتریایی با محاسبه نسبت (A/B)، A) قطر هاله و B) قطر کلنی.

2-4-4 ارزیابی کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول

در این مرحله، برای ارزیابی کمی حلالیت فسفات باکتریایی، هر جدایه با سه تکرار در محیط کشت مایع Sperber (بدون آگار) تلقیح می‌شود. برای این کار، 500 میکرولیتر از کشت شبانه باکتریایی (رشدیافته در محیط NA) به ارلن حاوی 30 میلی‌لیتر محیط کشت مایع Sperber اضافه می‌شود. ارلن‌های تلقیح شده و نمونه کنترل (بدون تلقیح) در دمای مناسب و در شرایط تاریکی در انکوباتور شیکر به مدت 7 روز قرار می‌گیرند.

پس از اتمام زمان انکوباسیون، 2 میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های به‌دست‌آمده برداشته شده و پس از انجام 5 بار رقیق‌سازی با آب مقطر (حجم نهایی 10 میلی‌لیتر باشد)، سانتریفوژ در 5000 دور در دقیقه انجام می‌شود. سپس 2 میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی[1] و 2 میلی‌لیتر از محلول معرف وانادات-مولیبدات (VMR[2]) به لوله‌های شیشه‌ای تمیز (اسیدواش شده) اضافه می‌شود. پس از آن 5 میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شده و مخلوط به‌طور کامل تکان داده می‌شود. پس از تشکیل کمپلکس زردرنگ، جذب محلول‌های آماده شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 430 نانومتر تعیین می‌شود. در نهایت، با استفاده از منحنی کالیبراسیون که با غلظت‌های مختلف استاندارد فسفر تهیه شده است، مقدار قرائت (خوانش) اسپکتروفتومتر برای نمونه‌ها به غلظت استاندارد معادل تبدیل می‌شود (گی و دیتز، 1953).

3-4-4 ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات آلی نامحلول

برای اجرای این آزمایش نیز از محیط کشت Sperber استفاده می‌شود که در آن اسید اینوزیتول هگزافسفریک (IHP[3]) به‌عنوان تنها منبع فسفر به کار می‌رود. علاوه بر این، از سوبسترای BCIP[4] به‌عنوان نشانگر فعالیت فسفاتاز در محیط کشت استفاده می‌شود. هر جدایه بر روی یک پتری دیش در نظر گرفته می‌شود و سطح هر پتری دیش به سه قسمت مساوی تقسیم می‌شود. مرکز هر قسمت با 5-10 میکرولیتر از باکتری‌های ایزوله شده تلقیح

[1] Supernatant
[2] Vanadate-molybdate reagent
[3] Inositol hexaphosphoric acid
[4] 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

می‌شود. پتری دیش‌های تلقیح شده در دمای مناسب به مدت 7 روز در انکوباتور قرار می‌گیرند. تولید فنوتیپ آبی توسط کلنی‌ها و شدت رنگ آبی به‌طور کیفی ارزیابی می‌شود (گیبسون و همکاران، 1988؛ لورنز و همکاران، 2007). شکل 6 نمایش‌دهنده فنوتیپ آبی در محیط Sperber است.

شکل 5- محیط اسپربر حاوی IHP و BCIP برای ارزیابی انحلال فسفات آلی.

4-4-4 ارزیابی کمی توان حل‌کنندگی فسفات آلی نامحلول

در این مرحله، برای بررسی دقیق‌تر حل‌شدن فسفات آلی توسط باکتری‌ها، هر جدایه با سه تکرار در محیط کشت مایع Sperber حاوی اسید اینوزیتول هگزافسفریک کشت داده می‌شود. به این منظور، 500 میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ارلن‌های حاوی 30 میلی‌لیتر محیط کشت مایع Sperber اضافه می‌شود. ارلن‌های تلقیح شده و نمونه‌های کنترل (بدون تلقیح) به مدت 7 روز در دمای مناسب و در تاریکی در شیکر انکوباتور قرار می‌گیرند.

پس از پایان دوره انکوباسیون، 2 میلی‌لیتر از محیط مایع برداشته شده و پس از رقیق‌سازی 5 برابری با آب مقطر (حجم نهایی 10 میلی‌لیتر)، به مدت 10 دقیقه با سرعت 5000 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. سپس 2 میلی‌لیتر از مایع رویی و 2 میلی‌لیتر از محلول واکنش‌گر وانادات-مولیبدات (VMR) به لوله‌های شیشه‌ای تمیز منتقل می‌شود. در ادامه 5 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و مخلوط به‌خوبی تکان داده می‌شود. پس از تشکیل کمپلکس زرد رنگ، جذب محلول‌های آماده شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 430 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در نهایت، با استفاده از منحنی کالیبراسیون که با

غلظت‌های استاندارد مختلف تهیه شده است، قرائت‌های اسپکتروفتومتر برای نمونه‌ها به غلظت‌های استاندارد مربوطه تبدیل می‌شود (گی و دیتز، 1953).

5-4 محیط‌های کشت، مواد و استانداردها

1-5-4 محیط کشت اسپربر

جدول 1- اجزای محیط کشت اسپربر

اجزاء	مقدار (گرم)
گلوکز[1]	10
عصاره مخمر[2]	0/5
سولفات منیزیم هپتاهیدرات[3]	0/23
کلرید کلسیم دی‌هیدرات[4]	0/14
تری‌کلسیم فسفات یا فیتات*	2/5
آگار	15
BCIP[5]*	50mg
آب	1000ml
Ph	6/8-7/2
دما	25 °C

*: در ارزیابی توان انحلال فسفات نامحلول آلی کاربرد دارد.

1-1-5-4 روش تهیه

ترکیبات را در آب حل کرده و در صورت لزوم، حرارت دهید تا کاملاً حل شود. محیط کشت را در مقادیر مناسب در ارلن‌ها تقسیم کرده و به مدت 30 min در اتوکلاو با دمای 121 ˚C استریل کنید. پس از استریل شدن، محیط کشت را به مقدار مناسب در پلیت‌های به قطر 9cm تقسیم کنید.

[1] $C_6H_{12}O_6$
[2] Yeast extract
[3] $MgSO_4.7H_2O$
[4] $Cacl_2.2H_2O$
[5] 5-bromo-4-choloro-3-indolyl phosphate

اجزای سایر محیط‌های کشت

مواد مختلف محیط‌های کشت مورداستفاده برای مطالعه باکتری‌های حل‌کننده فسفات به همراه تفاوت‌ها و شباهت‌های آن‌ها در جدول 2 ارائه شده است.

جدول2- محیط کشت‌های رایج در مطالعه باکتری‌های حل‌کننده فسفات.

اجزا	Sperber	Pikovskaya (PVK)	NBRIP	Alexandrov
گلوکز	10 گرم	10 گرم	10 گرم	5 گرم
کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)_2$)	2/5 گرم	5 گرم	-	2 گرم
$MgCl_2.6H_2O$	-	-	5 گرم	-
$MgSO_4.7H_2O$	0/23 گرم	0/1 گرم	0/25 گرم	0/5 گرم
$CaCl_2 2H_2O$	0/14	-	-	-
KCl	-	0/2 گرم	0/2 گرم	-
CaCO3	-	-	-	0/6 گرم
$(NH_4)_2SO_4$	-	0/5 گرم	0/1 گرم	-
$FeSO_4.7H_2O$	-	0/001 گرم	-	0/006 گرم
$MnSO_4$	-	0/001 گرم	-	-
عصاره مخمر	0/5 گرم	0/5 گرم	-	-
آگار	15-20 گرم	15-20 گرم	-	15-20 گرم
آب مقطر	1 لیتر	1 لیتر	1 لیتر	1 لیتر

2-5-4 سرم فیزیولوژیک

جدول 3- اجزای سرم فیزیولوژیک 0/85 درصد

نام مواد	مقدار
سدیم کلراید	8/5 g
آب	1000 ml
pH در 25 ˚C =6/5 ± 0/1	

1-2-5-4 روش تهیه

سدیم کلراید را در آب حل کرده و به مدت 15 min در اتوکلاو با دمای 121 ˚C استریل کنید. پس از استریل شدن، در حجم مناسب تقسیم کنید.

3-5-4 محیط کشت نوترینت آگار (NA)

جدول 4- ترکیب محیط کشت NA

مواد اولیه	مقدار
عصاره گوشت	3 گرم
پپتون	5 گرم
کلرید سدیم	5 گرم
آگار	15 گرم
آب مقطر	1000 میلی‌لیتر

1-3-5-4 روش تهیه

برای تهیه این محیط کشت، مواد ذکر شده در جدول 2 را در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید، مخلوط را با حرکات مکرر هم بزنید و برای 1 دقیقه به جوش آورید تا پودر به‌طور کامل حل شود. محیط کشت را با اتوکلاو در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15-20 دقیقه استریل کنید. محیط کشت را در داخل پتری دیش‌ها تقسیم کنید. محیط کشت آماده شده را در مکانی خنک و تاریک نگهداری کنید.

4-5-4 معرف وانادات-مولیبدات (VMR)

جدول 5- ترکیب معرف وانادات-مولیبدات (VMR).

مواد تشکیل‌دهنده	مقدار
آمونیوم مولیبدات	1/67 گرم
آمونیوم وانادات	0/083 گرم
اسید نیتریک	11/11 میلی‌لیتر
آب مقطر	100 میلی‌لیتر

4-5-4-1 روش تهیه

برای تهیه 100 میلی‌لیتر از این واکنش‌گر، به 1/67 گرم آمونیوم مولیبدات، 0/083 گرم آمونیوم وانادات و 11/11 میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ نیاز است. برای تهیه محلول آمونیوم وانادات، نیاز به حرارت تا دمای جوش می‌باشد، سپس بایستی اسید نیتریک غلیظ و محلول آمونیوم مولیبدات را به آن اضافه کرد و حجم نهایی محلول را به 100 میلی‌لیتر رسانید (اولسن و سامرز، 1982).

4-5-5 تهیه محلول‌های استاندارد فسفر و اندازه‌گیری فسفر به روش زرد

برای تهیه محلول استاندارد حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر فسفر، 0/439 گرم نمک KH_2PO_4 خشک‌شده در آون (در دمای 40 درجه سانتی‌گراد) به دقت وزن شده و در 1 لیتر آب مقطر حل می‌شود. برای تهیه محلول‌های استاندارد با غلظت‌های 0، 1، 2، 3، 4 و 5 میلی‌گرم در لیتر فسفر، حجم‌های معینی (0، 2، 4، 6، 8 و 10 میلی‌لیتر) از محلول استاندارد اولیه (100 میلی‌گرم در لیتر فسفر) به دقت به بالن‌های حجمی 50 میلی‌لیتری انتقال داده می‌شود. سپس 2 میلی‌لیتر از معرف به هر یک از نمونه‌های استاندارد اضافه می‌شود و حجم نهایی با آب مقطر به 9 میلی‌لیتر رسانده می‌شود (اولسن و سامرز، 1982). پس از تشکیل کمپلکس زرد مشخص، جذب محلول‌های استاندارد در طول موج 430 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. منحنی کالیبراسیون دستگاه تهیه شده و از طریق معادله‌ای که از این منحنی به‌دست می‌آید، اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتر برای نمونه‌ها به غلظت استاندارد فسفر تبدیل می‌شود.

4-6 دستگاه‌های موردنیاز

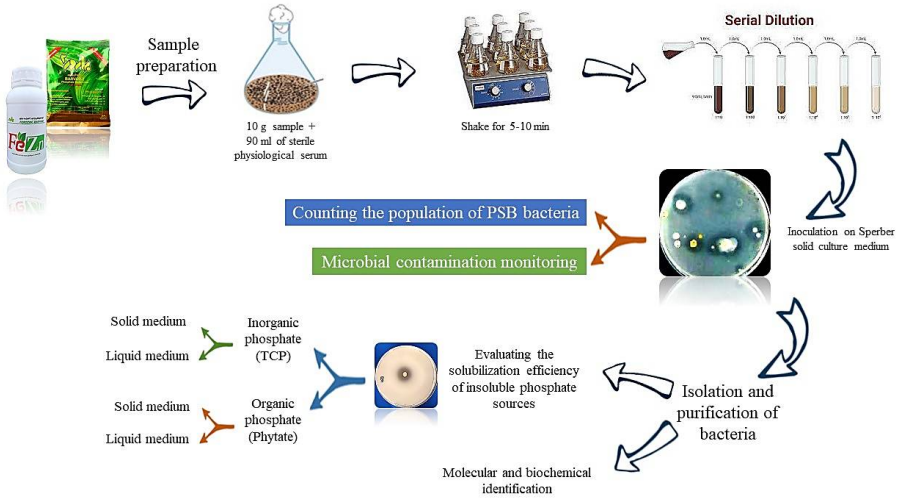
- pH متر (با خطای کالیبراسیون کمتر از ± 0.1 واحد pH در دمای 20 ± 1 درجه سانتی‌گراد).
- ترازو (بادقت 0/001 گرم)
- اتوکلاو
- انکوباتور

- آون
- یخچال
- فریزر (قابل‌تنظیم در دمای 20- درجه سانتی‌گراد)
- تکان‌دهنده (ورتکس)
- ارلن مایر در حجم‌های مختلف (100 میلی‌لیتر، 250 میلی‌لیتر، 500 میلی‌لیتر و 1000 میلی‌لیتر).
- لوله‌های آزمایش (از اندازه 15x125 میلی‌متر تا 30x250 میلی‌متر)
- پیپت یا سمپلر
- پتری‌دیش استریل (از جنس شیشه یا پلاستیک).
- میکروسکوپ (به همراه لام و لامل).
- میله شیشه‌ای ال شکل
- هود لامینار
- انکوباتور شیکردار
- دیونایزر[1]
- دیسپنسر محیط کشت
- کلنی شمار
- ترمو سایکلر (PCR[2])
- اسپکتروفتومتر

7-4 چکیده گرافیکی آزمایش‌های مربوط به باکتری‌های حل‌کننده فسفات

چکیده گرافیکی از آزمایش‌های مختلف مربوط به باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شکل 6 ارائه شده است.

[1] Deionizer
[2] Polymerase chain reaction



شکل6- شماتیک جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات و ارزیابی توان حل‌کنندگی آنها.

8-4 شناسایی جدایه‌های باکتریایی

شناسایی جدایه‌های باکتریایی شامل چندین مرحله است که از روش‌های کلاسیک تا تکنیک‌های پیشرفته مولکولی را در بر می‌گیرد. این فرایند شامل رنگ‌آمیزی گرم، انجام تست‌های بیوشیمیایی، و در نهایت، شناسایی مولکولی است که در ادامه به‌تفصیل شرح داده می‌شود.

8-4-1رنگ‌آمیزی گرم[1]

رنگ‌آمیزی گرم اولین گام در شناسایی باکتری‌ها است که بر اساس ویژگی‌های دیواره سلولی آن‌ها انجام می‌شود. در این روش، جدایه‌های باکتریایی ابتدا با کریستال ویوله (Crystal Violet) رنگ‌آمیزی می‌شوند. سپس محلول ید (Iodine) اضافه می‌شود که با کریستال ویوله واکنش داده و کمپلکسی را در داخل سلول ایجاد می‌کند. در مرحله بعد،

[1] Gram Staining

باکتری‌ها با الکل یا استون شسته می‌شوند؛ در این مرحله، باکتری‌های گرم مثبت (Gram-positive) رنگ بنفش خود را حفظ می‌کنند، زیرا دیواره سلولی ضخیم آن‌ها مانع از خروج کمپلکس کریستال ویوله-ید می‌شود. اما باکتری‌های گرم منفی (Gram-negative) رنگ را ازدست‌داده و در نهایت با استفاده از رنگ‌آمیزی با سافرانین (Safranin) یا فوشین قرمز (Fuchsin) به رنگ صورتی یا قرمز در می‌آیند. این فرایند اطلاعات اولیه‌ای را درباره ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها به دست می‌دهد (براون و هاپس، 1973).

4-8-2 تست‌های بیوشیمیایی

پس از رنگ‌آمیزی گرم، جدایه‌های باکتریایی به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی شناسایی می‌شوند. تست‌های بیوشیمیایی نقش مهمی در شناسایی باکتری‌ها ایفا می‌کنند و بر اساس ویژگی‌های متابولیکی و آنزیمی باکتری‌ها طراحی شده‌اند. این تست‌ها به بررسی توانایی‌های مختلف باکتری‌ها در تجزیه مواد خاص، تولید ترکیبات ویژه، یا تغییر ویژگی‌های محیط کشت می‌پردازند. برای مثال، تست کاتالاز برای شناسایی باکتری‌هایی که آنزیم کاتالاز تولید می‌کنند و هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کنند، استفاده می‌شود. تست اکسیداز بررسی می‌کند که آیا باکتری‌ها آنزیم سیتوکروم اکسیداز را دارند که به تولید رنگ آبی یا بنفش منجر می‌شود. تست اوره‌آز برای شناسایی باکتری‌هایی است که قادر به تجزیه اوره به آمونیاک هستند و تغییر رنگ محیط به صورتی را نشان می‌دهد. تست تخمیر کربوهیدرات‌ها توانایی باکتری‌ها در تخمیر قندها و تولید اسید را با تغییر رنگ محیط به زرد مشخص می‌کند. این تست‌ها با فراهم‌کردن اطلاعات دقیق در مورد ویژگی‌های متابولیکی و آنزیمی باکتری‌ها، به شناسایی و طبقه‌بندی دقیق انواع باکتری‌ها کمک می‌کنند (برنر و همکاران، 2005).

4-8-3 شناسایی مولکولی

در فرایند شناسایی مولکولی، DNA ژنومی از جدایه‌های باکتریایی با استفاده از کیت استخراج DNA تجاری استخراج می‌شود. سپس مارکرهای ژنتیکی خاص، مانند ژن‌های 16S rRNA، برای تقویت از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) هدف‌گذاری می‌شوند.

محصولات PCR حاصل از آن تحت فناوری توالی‌سنجی سانگر[1] برای تعیین توالی‌های DNA قرار می‌گیرند. توالی‌های به‌دست‌آمده تحت تحلیل‌های بیوانفورماتیکی قرار می‌گیرند و با استفاده از ابزارهای تخصصی و مقایسه با پایگاه‌های داده، شناسایی دقیق گونه‌های باکتریایی انجام می‌شود (جیانگ و همکاران، 2006). ادغام تکنیک‌های کشت میکروبی، مولکولی و بیوشیمیایی در این رویکرد، شناسایی و توصیف دقیق و قابل‌اعتماد جدایه‌های باکتریایی به‌دست‌آمده از نمونه‌ها را تضمین می‌کند.

9-4 تعاریف مربوط به باکتری‌های حل‌کننده فسفات

1-9-4 باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[2])

به گروهی غالب از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات نامحلول گفته می‌شود که قادرند با دو مکانیسم عمده ترشح اسیدهای معدنی و آلی (مانند 2-کتوگلوکونیک[3]، سیتریک[4]، آزلایک[5]، مالیک[6] و سوکسینیک[7] اسید) و تولید آنزیم فسفاتاز و انحلال ترکیبات مختلف معدنی و آلی فسفاته، یا افزایش حلالیت این ترکیبات، مقداری از نیاز فسفری گیاهان را تأمین کنند.

2-9-4 محیط کشت اسپربر[8]

محیط کشت اختصاصی برای میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است.

3-9-4 شاخص حلالیت[9]

نسبت قطر هاله به قطر کلنی در محیط کشت جامد اسپربر است که بعد از مدت‌زمان مشخصی قابل‌مشاهده است.

---

[1] Sanger sequencing technology
[2] Phosphate solubilizing bacteria
[3] 2- ketogluconic acid
[4] Citric acid
[5] Azelaic acid
[6] Malic acid
[7] Succinic acid
[8] Sperber culture medium
[9] Solubility index

4-9-4 هاله[1]

ناحیه شفاف شده اطراف کلنی باکتری که در اثر انحلال فسفات نامحلول ایجاد می‌شود.

4-9-5 استرپتومایسین[2]

ماده باکتری‌کشی است که برای ازبین‌بردن باکتری‌ها در محیط کشت بکار می‌رود. استرپتومایسین همراه با رزبنگال[3] به محیط کشت اسپربر[4] اضافه می‌شود تا قارچ‌های حل‌کننده فسفات قابل‌شمارش گردند.

4-9-6 رزبنگال

ماده باکتری‌کشی است که به‌منظور ازبین‌بردن باکتری‌ها به محیط کشت اسپربر[5] اضافه می‌شود، تا قارچ‌های حل‌کننده فسفات قابل‌شمارش گردند.

4-9-7 سیکلوهگزیماید[6]

ماده قارچ‌کشی است که برای ازبین‌بردن قارچ‌ها به محیط کشت اضافه می‌شود تا باکتری‌های حل‌کننده فسفات قابل‌شمارش گردند.

4-9-8 مایه تلقیح حل‌کننده فسفات[7]

مایه تلقیح میکروبی حاوی میکروارگانیسم‌های آزادکننده، حل‌کننده و اکسیدکننده (به ترتیب از اشکال تثبیت شده و فرم‌های نامحلول و گوگرد عنصری اضافه شده به خاک) عناصر غذایی است که به‌منظور تأمین بخشی از نیازهای گیاه به این عناصر مورداستفاده قرار می‌گیرد.

---

[1] Halo zone
[2] Streptomycin
[3] Rose Bengal
[4] Sperber culture medium
[5] Sperber
[6] Cycloheximide
[7] Phosphate solubilizing inoculant

4-9-9 کود میکروبی فسفاته[1]

کود بیولوژیک جامد و به شکل گرانوله، حاوی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است که به‌منظور تأمین فسفر موردنیاز گیاهان استفاده می‌شود.

4-9-10 خاک فسفات[2]

خاک فسفات یا آپاتیت[3]، ماده و منبع اصلی فسفر در تولید کودهای شیمیایی و بیولوژیک فسفاته است. این خاک، از غنی‌سازی و فراوری سنگ معدن حاصل می‌شود و از نظر ارزش اقتصادی اهمیت زیادی دارد.

4-9-11 فسفاتاز[4]

به گروه وسیعی از آنزیم‌ها گفته می‌شود که باعث هیدرولیز فسفر آلی به معدنی می‌شوند، یعنی پیوند استری C-O-P را شکسته و باعث آزادسازی فسفر می‌گردند. این آنزیم‌ها به دو گروه فسفاتاز اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند.

4-10 پیوست

(آگاهی‌دهنده)

4-10-1 باکتری‌های حل‌کننده فسفات

یادآوری- این فهرست جامع نبوده و شامل مثال‌هایی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد که صرفاً برای کسب اطلاع ارائه شده است.

Alcaligenes sp.,
Aerobactor aerogenes,
Achromobacter sp.,
Actinomadura oligospora,
Agrobacterium sp.,

[1] Microbial phosphatic biofertilizer
[2] Rock phosphate
[3] Apatite
[4] Phosphatase

Azospirillum brasilense,
Bacillus sp.,
Bacillus circulans,
B.cereus,
B.fusiformis,
B. pumils,
B. megaterium,
B. mycoides,
B. polymyxa,
B. coagulans
B,.chitinolyticus,
B. subtilis,
Bradyrhizobium sp.,
Brevibacterium sp.,
Citrobacter sp.,
Pseudomonas sp.,
P putida,
P. striata,
P. fluorescens,
P. calcis,
Flavobacterium sp.,
Nitrosomonas sp.,
Erwinia sp.,
Micrococcus sp.,
Escherichia intermedia,
Enterobacter asburiae,
Serratia phosphoticum,
Nitrobacter sp.,
Thiobacillus ferroxidans,
T. thioxidans,
Rhizobium meliloti,
Xanthomonas sp.

5 منابع

خوشرو ب. و ساریخانی م ر. 1397. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاته. مجله آب و خاک. جلد 32، شماره 1، 167- 155.

خوشرو ب.، ساریخانی م ر. و علی‌اصغرزاد ن. 1396. بررسی انحلال فسفات، تحمل دمایی و زنده‌مانی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در کود میکروبی فسفاته. دانش آب و خاک.

خوشرو ب.، ساریخانی م ر.، علی‌اصغرزاد ن. و زارع پ. 1394. ارزیابی ویژگی‌های مهم افزایندگی رشد گیاه در باکتری‌های جدا شده از کودهای زیستی بارور2، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین. تحقیقات کاربردی خاک. جلد3، شماره1، 52-39.

فلاح نصرت‌آباد، ع. ر. 1382. بررسی پراکنش میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های استان گیلان و مقایسه اثربخشی آن‌ها در عملکرد گندم و برنج. پایان‌نامه دکتری. دانشگاه تربیت‌مدرس. ایران.

فلاح نصرت‌آباد، ع. ر. 1398. اثر مواد آلی از منابع گوناگون بر جمعیت میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. نشریه شماره 51633. مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج. ایران.

فلاح نصرت‌آباد، ع. ر. 1399. ضرورت استفاده از سنگ فسفات و میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات درکشت کلزا. نشریه دانه های روغنی، جلد 2. شماره 2. صفحه62-52. گرگان. ایران

فلاح نصرت‌آباد، ع. ر.، آرمنده، م. 1385. نقش ریزجانداران حل‌کننده فسفات در مدیریت فسفر در کشاورزی، (تالیف). انتشارات موسسه تحقیقات خاک و آب. کرج. ایران. (401 ص).

فلاح نصرت‌آباد، ع. ر.، بشارتی، ح.، نور قلی‌پور، ف. و شهبازی، ک. 1386. تأثیر کاربرد سنگ فسفات، باکتری‌های تیوباسیلوس و میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات بر عملکرد کمی و کیفی ذرت. مجله دانش کشاورزی، 17(3): 25-36. ایران.

فلاح نصرت‌آباد، ع.ر. 1396. کودهای بیولوژیک-مایه تلقیح‌های حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون (استانداردها). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. نشریه شماره 22301. مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج. ایران.

مشیری، ف.، صفرپورحقیقی، ش.، بصیرت، م.، طهرانی، م. م.، هادی اسدی رحمانی، ه.، رجالی ف.، بلالی م. ر. و بازرگان ک. ، 1402. گزارش فنی برآورد کود مورد نیاز محصولات زراعی و باغی برای سال‌های زراعی 1399 - 1402، انتشارات موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، کرج ایران.

Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M.S. and Oves, M. 2009. Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes–An overview. *Phosphate Solubilising Microbes for Crop Improvement, eds MS Khan and A. Zaidi (New York, NY: Nova Science Publishers, Inc)*, 1-14.

Ahmad, N., Usman, M., Ahmad, H.R., Sabir, M., Farooqi, Z.U.R. and Shehzad, M.T. 2023. Environmental implications of phosphate-based fertilizer industrial waste and its management practices. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(11), 1326.

Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4, 454-58.

Armandeh, M., Mahmoudi, N. and Fallah Nosratabad, A.R., 2022. Screening and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria isolated from aquaculture ponds in a step-by-step strategy as potential biofertilizer. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1581-1596.

Blodgett, R.J. 2005. Serial dilution with a confirmation step. Food microbiology, 22(6), 547-552.

Brown, R.C. and Hopps, H.C. 1973. Staining of bacteria in tissue sections: a reliable Gram stain method. *American Journal of Clinical Pathology*, 60(2), 234-240.

Chien, S.H., Menon, R.G. and Billingham, K.S. 1996. Phosphorus availability from phosphate rock as enhanced by water-soluble phosphorus. *Soil Science Society of America Journal*. 60, 1173–1177.

Cordell, D, Rosemarin, A, Schröder, J.J, Smit, A.L .2011. Towards global phosphorus security: a systems framework for phosphorus recovery and reuse options.Chemosphere, 84, 747–758

Djuuna, I.A.F., Prabawardani, S. and Massora, M. 2022. Population distribution of phosphate-solubilizing microorganisms in agricultural soil. *Microbes and Environments*, 37(1), ME21041.

Dodor, D.E. and Tabatabai, M.A. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(1), 7-13.

Fageria, N.K. 2009. The use of nutrients in crop plants. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. USA. New York.

FAO. 2006. Use of phosphate rock for sustainable agriculture. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin No. 13. Rome.

FAO. 2022. World Food and Agriculture Statistical Yearbook 2022. FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. The future of food and agriculture: Trends and Challenges. Rome: FAO.

Gee, A. and Deitz, V.R. 1953. Determination of phosphate by differential spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 25(9), 1320-1324.

Gibson, D.M., Christen, A.A. and Mullaney, E.J. 1988. Direct screening for acid phosphatase production on BCIP-Agar plates. *Biotechnology Techniques*, 2, .63-68.

Goldstein, A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini, A., Yagil, E.,Silver, S., editors. Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular biology. Washington, DC: ASM Press, 197-203.

Ibrahim, M., Iqbal, M., Tang, Y.T., Khan, S., Guan, D.X. and Li, G. 2022. Phosphorus mobilization in plant–soil environments and inspired strategies for managing phosphorus: A review. *Agronomy*, 12(10), 2539.

Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 27, 257-263.

Ingle, K.P. and Padole, D.A. 2017. Phosphate solubilizing microbes: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 844-852.

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R. and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3832-3845.

Jiao, W., Chen, W., Chang, A.C. and Page, A.L. 2012. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environmental Pollution*, 168, 44-53.

Khan, A., Singh, A.V., Gautam, S.S., Agarwal, A., Punetha, A., Upadhayay, V.K., Kukreti, B., Bundela, V., Jugran, A.K. and Goel, R. 2023. Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science, 14.

Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Saqlan Naqvi, S.M., and Rasheed, M. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 48-58.

Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review.Agronomy for sustainable development. *Agronomy for Sustainable Development*. 27, 29–43.

Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E.M., Uniyal, N., Mahakur, B., Mohapatra, P.K.D., Panneerselvam, P., Boutaj, H., Alizadeh, M. and Cely, M.V.T. 2020. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: An economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), 3062-3092.

Khoshru, B., Nosratabad, A.F., Mitra, D., Chaithra, M., Danesh, Y.R., Boyno, G., Chattaraj, S., Priyadarshini, A., Anđelković, S., Pellegrini, M. and Guerra-Sierra, B.E., 2023. Rock phosphate solubilizing potential of soil microorganisms: advances in sustainable crop production. *Bacteria*, 2(2), 98-115.

Kumari, K. and Phogat, V.K. 2008. Rock phosphate: Its availability and solubilization in the soil–A review. *Agricultural Reviews*, 29(2), 108-116.

Li, J., Xie, T., Zhu, H., Zhou, J., Li, C., Xiong, W., Xu, L., Wu, Y., He, Z. and Li, X. 2021. Alkaline phosphatase activity mediates soil organic phosphorus mineralization in a subalpine forest ecosystem. *Geoderma*, 404, 115376.

Liu, Y., Villalba, G., Ayres, R.U. and Schroder, H. 2008. Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. *Journal of Industrial Ecology*, 12(2), 229-247.

Lorenz, A.J., Scott, M.P. and Lamkey, K.R. 2007. Quantitative determination of phytate and inorganic phosphorus for maize breeding. Crop science, 47(2), 600-604.

Lu, Y., Gao, Y., Nie, J., Liao, Y. and Zhu, Q. 2021. Substituting chemical P fertilizer with organic manure: effects on double-rice yield, phosphorus use efficiency and balance in subtropical China. *Scientific Reports*, 11(1), 8629.

Munar, A., Sembiring, M., Tantawi, A.R. and Sabrina, T. 2020, February. Effect of sound treatment on phosphate solubilizing microbial activity. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 454, No. 1, p. 012145). IOP Publishing.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.

Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I. and Malboobi, M.A. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iranian journal of microbiology*, 6(4), 285.

Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. p. 403-430. In: A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.

Pahari, A., Pradhan, A., Nayak, S.K. and Mishra, B.B. 2017. Bacterial siderophore as a plant growth promoter. *Microbial Biotechnology: Volume 1. Applications in Agriculture and Environment*, 163-180.

Paul, E.A. 2007. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. 3ed Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier .

Randive, K., Raut, T. and Jawadand, S. 2021. An overview of the global fertilizer trends and India's position in 2020. *Mineral Economics*, 1-14.

Richardson, A.E. and Simpson, R.J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.

Rodriguez, H., and Reynaldo, F. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17, 319-339.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. 2017. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.

Shrivastava, M., Srivastava, P.C. and D'souza, S.F. 2018. Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 2: Nutrient Management and Crop Improvement*, 137-165.

Soumare, A., Boubekri, K., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y. and Kouisni, L. 2020. From isolation of phosphate solubilizing microbes to their formulation and use as biofertilizers: status and needs. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 425.

Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9(6), 778-781.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphours, Sulfur, Micronutrients. Wiley, New York .

Stevenson, F.J. 2005. Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phophorus, Sulfur, Micronutients.John Wiley and Sons, New York.

Taguett, F., Boisset, C., Heyraud, A., Buon, L. and Kaci, Y. 2015. Characterization and structure of the polysaccharide produced by Pseudomonas fluorescens strain TF7 isolated from an arid region of Algeria. *Comptes Rendus Biologies*, *338*(5), 335-342.

Walpola, B.C. and Yoon, M. 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability inagricultural soils: a review, African Journal of Microbiology Research, 6, 6600–6605.

Whitelaw, M.A, Harden, T.J and Helyar, K.R. 1999. Phosphate solubulisation in solution culture by the soil fungus Penicillium radicum. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 655-665.

Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M. and Oves, M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.

Zhang, Y., Li, Y., Wang, S., Umbreen, S. and Zhou, C. 2021. Soil phosphorus fractionation and its association with soil phosphate-solubilizing bacteria in a chronosequence of vegetation restoration. *Ecological Engineering*, 164, 106208.