



Investigation and determination of some phosphate solubilizing bacteria characteristics from agricultural soil of wheat field located in Yazd province

Mohammad Reza Soudi^{*1}, Leila Amini², Behnaz Mirelmi³, Tayebeh Fooladi⁴

1. Corresponding Author, Dept. of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran. E-mail: msoudi@alzahra.ac.ir
2. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran. E-mail: mleila.amini@gmail.com
3. M.Sc. Graduate, Dept. of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran. E-mail: behnaz.mirelmi@yahoo.com
4. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran. E-mail: fooladitayebeh@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 10.10.2021

Revised: 11.29.2022

Accepted: 12.03.2022

Keywords:

Chemical fertilizer,
Nitrogen fixation,
Organic acid,
Phosphate solubilizing
bacteria

ABSTRACT

Background and Objectives: The widespread use of chemical fertilizers became common by coming the Haber-Bosch reaction product to the market in the second decade of the twentieth century, and thereafter the agricultural industry flourished. Nowadays, increasing usage of chemicals has caused adverse and harmful consequences against the environment and also increased costs of production of crop plants. The use of biofertilizers, which potentially solubilizes phosphorus compounds in the agricultural soil, is considered as an environmental friendly option and a superior alternative to further usage of chemical fertilizers. New collections of phosphate-solubilizing bacteria with a vast biodiversity are required to be used for greater varieties of crop plants in more different climates. The aim of this study was verification and characterization of some active phosphate-solubilizing bacteria isolated from several areas of wheat arable soils located in Yazd province.

Materials and Methods: In this study, soil microorganisms were screened and all the isolates were examined in PVK agar culture medium for halo formation and then phosphate solubilization index and efficiency were calculated. Phosphate release rate in liquid culture medium was measured in $\mu\text{g/ml}$. Nitrogen fixation test using two carbon sources (glucose and sucrose) was evaluated comparatively. All the isolates were examined for tolerance to various environmental conditions such as temperature, salinity and pH. Finally, the production of several types of organic acids by the isolates was examined using thin layer chromatography.

Results: Among the bacteria, 10 isolates created a halo zone in culture medium containing calcium phosphate and showed growth and discoloration in nitrogen-free medium with bromothymol blue reagent. Five isolates out of 10 showed the highest efficiency in phosphate solubilization (equal to or more than 200% Z/C) and 5 isolates showed the highest phosphate solubility index (between 2-4). The highest index belonged to YC isolate (4.1), while statistical analysis showed no significant difference between the means of solubility efficiency of different isolates. The quantitative study showed that the amount of phosphate released for 4 superior isolates was 150.25-203.91 $\mu\text{g/ml}$. Statistical analysis shows that among the 10 strains tested, YS and YG

showed the highest efficiency with the release of 203.9 and 194.8 $\mu\text{g/l}$ phosphate, respectively. These two strains were not significantly different from YK and YC isolates. Isolates YX, YA, YP, YH, YJ and YI also showed the least ability at the same statistical level. All the isolates were able to fix nitrogen in the presence of glucose and 4 isolates were able to fix nitrogen in the presence of sucrose as two different carbon sources. Experiments carried out to show the resistance of the isolates to environmental factors and indicated that almost all isolates can grow adequately in the range of acidic to alkaline pH (5-9) and temperatures of 25-37 °C. The isolates were also able to tolerate salinity up to 10% (w/v). The use of thin layer chromatography confirmed the excretion of organic acids such as citric acid and oxalic acid by the examined bacteria.

Conclusion: The present study indicates that the isolated microorganisms with high phosphate solubilizing ability show significant potential as a suitable substitute to chemical fertilizers with harmful side effects.

Cite this article: Soudi, Mohammad Reza, Amini, Leila, Mirelmi, Behnaz, Fooladi, Tayebbeh. 2023. Investigation and determination of some phosphate solubilizing bacteria characteristics from agricultural soil of wheat field located in Yazd province. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 12 (4), 53-75.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/EJSMS.2023.19464.2039

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



بررسی و تعیین ویژگی‌های چند باکتری حل‌کننده فسفات از خاک کشاورزی مزرعه گندم واقع در استان یزد

محمد رضا صعودی^{۱*}، لیلا امینی^۲، بهناز میرعلمی^۳، طیبه فولادی^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. رایانامه: msoudi@alzahra.ac.ir

۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. رایانامه: mleila.amini@gmail.com

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. رایانامه: behnaz.mirelmi@yahoo.com

۴. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. رایانامه: fooladitayebbeh@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: استفاده فراوان از کودهای شیمیایی از دهه دوم قرن بیستم با ورود محصول واکنش هابر-بوش به بازار رایج شد و متعاقب آن صنعت کشاورزی رونق گرفت. امروزه، افزایش مصرف مواد شیمیایی موجب پیامدهای زیانبار زیست محیطی و بالا رفتن هزینه‌های تولید محصولات کشاورزی شده است. استفاده از کودهای زیستی، با پتانسیل محلول‌سازی فسفر در خاک‌های کشاورزی، به عنوان یک گزینه دوستدار محیط زیست و جایگزین برتر به جای مصرف هرچه بیش‌تر کودهای شیمیایی در نظر گرفته می‌شود. مجموعه‌های جدیدی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات با گوناگونی زیستی وسیع برای استفاده به‌عنوان کود زیستی فسفات برای مصرف محصولات زراعی گوناگون و در اقلیم‌های متفاوت مورد نیازند. هدف از این پژوهش، بررسی و تعیین ویژگی‌های چند باکتری فعال حل‌کننده فسفات از خاک چند منطقه مختلف زیرکشت گندم در استان یزد بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲	
واژه‌های کلیدی: اسید آلی، باکتری حل‌کننده فسفات، تثبیت نیتروژن، کود شیمیایی	
	مواد و روش‌ها: در این پژوهش، میکروارگانیسم‌های خاک زمین کشاورزی غربالگری شده و جدایه‌ها در محیط کشت PVK آگار از نظر ایجاد هاله مورد بررسی قرار گرفتند و سپس شاخص و کارایی حل‌کنندگی فسفات محاسبه شد. میزان رهائش فسفات در محیط کشت مایع بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. تمامی جدایه‌ها از نظر تحمل شرایط مختلف محیطی (دما، شوری و pH) مورد بررسی قرار گرفتند و در پایان تولید انواعی از اسیدهای آلی توسط جدایه‌ها با کمک روش کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد.
	یافته‌ها: از میان جدایه‌ها، ۱۰ جدایه در محیط دارای کلسیم فسفات هاله ایجاد کرده و در محیط بدون نیتروژن حاوی شناساگر بروموتیمول بلو رشد و تغییر رنگ نشان دادند. ۵ جدایه

دارای بیش‌ترین شاخص حل‌کنندگی فسفات (SI) (بین ۲ تا ۴) و ۵ جدایه بالاترین کارایی در حل‌کنندگی فسفات (PSE) (مساوی یا بیش‌تر از ۲۰۰ درصد قطر هاله/ قطر کلنی) را نشان دادند. بیش‌ترین شاخص حل‌کنندگی متعلق به جدایه YC به میزان ۴/۱ بوده است، در حالی‌که تجزیه و تحلیل آماری، هیچ اختلاف معناداری مابین میانگین‌های کارایی حل‌کنندگی جدایه‌های مختلف نشان نداد. میزان رهایش فسفات در بررسی کمی در ۴ جدایه برتر به میزان ۱۵۰/۲۵ تا ۲۰۳/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که از میان ۱۰ سویه آزمون شده، YS و YG به ترتیب با رهایش ۲۰۳/۹ و ۱۹۴/۸ میکروگرم بر لیتر فسفات، بیش‌ترین کارایی را از خود نشان دادند. این دو سویه، با جدایه‌های YK و YC اختلاف معناداری نداشتند. هم‌چنین جدایه‌های YX، YA، YP، YH، YJ و YI با قرار گرفتن در یک سطح آماری، کم‌ترین توانایی در این زمینه را از خود نشان دادند. آزمایش‌های مربوط به مقاومت جدایه‌ها به عوامل محیطی نشان داد که تقریباً تمامی ۱۰ جدایه می‌توانند در دامنه pH اسیدی تا قلیایی (۵-۹) و دمای ۲۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داشته باشند. هم‌چنین جدایه‌ها شوری محیط را تا نمک ۱۰ درصد تحمل کردند. روش کروماتوگرافی لایه نازک در تمامی جدایه‌ها حضور اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک و اسید اگزالیک را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌های مورد بررسی با دارا بودن توانایی بالای حل‌کنندگی فسفات، پتانسیل قابل‌توجهی به عنوان جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی دارای اثرات مخرب جانبی داشته باشند.

استناد: صعودی، محمدرضا، امینی، لایلا، میرعلمی، بهناز، فولادی، طیبه (۱۴۰۱). بررسی و تعیین ویژگی‌های چند باکتری حل‌کننده فسفات از خاک کشاورزی مزرعه گندم واقع در استان یزد. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۱۲ (۴)، ۷۵-۵۳.

DOI: 10.22069/EJSMS.2023.19464.2039



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

به گفته سازمان جهانی غذا و کشاورزی (فائو)، در سال ۲۰۵۰ نیاز به تولید مواد غذایی نسبت به سال ۲۰۱۲، نزدیک به ۵۰ درصد افزایش خواهد یافت. برای پاسخگویی مستمر به این نیاز، مواد مغذی و کیفیت خاک‌های کشاورزی باید حفظ شوند (۱). پس از نیتروژن، فسفر یک عنصر مغذی ضروری برای گیاهان در فرآیندهایی مانند فتوسنتز، انتقال انرژی، تولید ماکروملکول‌های سلولی و تنفس می‌باشد که تقریباً ۰/۲ تا ۰/۸ از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد (۲، ۳). فسفر در اسیدهای نوکلئیک، آنزیم‌ها، نوکلئوتیدها و فسفولیپیدها وجود دارد. هم‌چنین فسفر نقش مهمی در رشد ریشه، تولید گل و دانه، کیفیت محصول و مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهان دارد (۴). کمبود فسفر در خاک تا اندازه چشمگیری از رشد گیاه جلوگیری می‌کند. حدود ۲۰ تا ۸۰ درصد از فسفر موجود در خاک به شکل ترکیبات آلی و معدنی نامحلول است و با کاتیون‌های فلزی موجود در خاک کمپلکس‌های غیر یونی‌تار تشکیل می‌دهد؛ پس تنها ۱ درصد از کل فسفر موجود در خاک به شکل محلول و قابل دسترس برای گیاه است. بنابراین استفاده از کودهای فسفر می‌تواند این کمبود را جبران کند (۵).

در صنعت کشاورزی سالانه میلیون‌ها تن کود شیمیایی برای رشد بیش‌تر گیاهان استفاده می‌شود. استفاده از انواع کودها در شرایطی مؤثر، کارا و از نظر محیط زیست مناسب است که عناصر موجود در کود در کنار ریشه گیاه قرار گرفته و توسط ریشه جذب شود. اما متأسفانه، بخش زیادی از کودهای فسفوری معدنی بلافاصله پس از افزوده شدن به خاک نامحلول شده و از دسترس گیاه خارج می‌شوند (۶). از سویی دیگر کاربرد کودهای شیمیایی هزینه تولید محصولات کشاورزی را افزایش داده و منجر به پیامدهای ناخواسته زیست‌محیطی مانند فرسایش خاک‌های سطحی و از بین رفتن حاصلخیزی خاک با برهم زدن

تنوع میکروبی می‌شود. نکته قابل ملاحظه دیگر آن است که کانسنگ‌های فسفات عموماً در ایران نایاب هستند و یا به اندازه کافی وجود ندارد و بنابراین ترکیبات معدنی فسفات وارداتی هستند استفاده از مواد تلقیحی میکروبی (کودهای زیستی) که دارای پتانسیل محلول‌سازی فسفر در خاک‌های کشاورزی باشند به‌عنوان یک گزینه دوستدار محیط زیست و جایگزین کودهای شیمیایی در نظر گرفته می‌شود (۲). میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات نقش مهمی در تولید کودهای زیستی برای خاک‌هایی با کمبود فسفر دارند که تقریباً ۱ تا ۵۰ درصد از جمعیت میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند. تاکنون گزارش‌های زیادی از شناسایی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک ارائه شده است که نقش مؤثر آن‌ها را در تبدیل فسفر آلی و معدنی خاک به شکل قابل جذب برای گیاه نشان می‌دهد (۷).

میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات با آزادسازی اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز می‌توانند ملکول‌های فسفات کمپلکس و ثابت را در خاک آزاد کرده و آن‌ها را به صورت آنیون‌های فسفات (H_2PO_4^-) و (HPO_4^{2-}) محلول درآورده و بسته به pH خاک در دسترس گیاه قرار دهند (۸). به‌علاوه، حل‌کنندگان فسفات با تولید هورمون رشد و افزایش بهره‌وری تثبیت نیتروژن می‌توانند باعث رشد بیشتر گیاه و افزایش بازده محصول شوند. در دهه‌های گذشته فارچ‌های رشته‌ای و باکتری‌های حل‌کننده فسفات زیادی از منابع مختلف جداسازی و شناسایی شده‌اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به گونه‌های رایزوبیوم، آسپرژیلوس، باسیلوس، پنسیلیوم و سودوموناس اشاره کرد (۹، ۱۰، ۱۱).

مکانیسم استفاده شده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات شامل آزادسازی اسیدهای آلی با وزن ملکولی پایین است که از طریق گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل کاتیون‌های پیوند یافته به فسفات را خنثی

و گسترش میکروارگانیسم‌های خاک بوده و استفاده از مایه تلقیح آن‌ها در خاک رویکرد مناسبی جهت مدیریت و تامین عناصر غذایی گیاه و در نهایت افزایش بازدهی تولید و رشد گیاه است. باکتری‌هایی قادر هستند فراهمی فسفر را برای گیاهان تحت شرایط تنش محیطی افزایش دهند که خودشان مقاوم به این تنش‌ها باشند. بنابراین هدف از این مطالعه، علاوه بر جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از خاک کشاورزی مزارع گندم، بررسی مقاومت باکتری‌ها در شرایط سخت محیطی مانند تغییرات شوری، دما و pH نیز بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک: نمونه مورد آزمایش به‌طور تصادفی از چند نقطه از خاک زمین کشاورزی تحت کشت گندم در اطراف شهر یزد، با مختصات جغرافیایی $31^{\circ}54'24''$ و $54^{\circ}23'35''$ از عمق ۱۰ سانتی‌متری خاک جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی به آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهراء، تهران منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا جداسازی و بررسی ویژگی‌های باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر روی آن انجام شود.

جداسازی و غربالگری سویه‌های حل‌کننده فسفات بر روی پلیت: ابتدا نمونه خاک از نظر بافت و pH مورد بررسی قرار گرفت. سپس بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. رقت‌های سریالی از خاک در محلول نمکی (۰/۹ گرم نمک سدیم کلراید/لیتر) تهیه شد و به مدت یک ساعت روی شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ دور در دقیقه هم زده شدند. سپس از رقت‌های تهیه شده، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار^۱ جهت خالص‌سازی نمونه‌ها به‌صورت متوالی کشت داده شد. جدایه‌های خالص شده توسط

کرده و در نتیجه آن را به گونه محلول تبدیل می‌کند. از سوی دیگر می‌توان این مکانیسم را به کاهش pH محیط خاک توسط اسیدهای آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها نسبت داد. نوع و میزان اسید آلی تولید شده در میکروارگانیسم‌های گوناگون متفاوت است. اسیدهای گلیکولیک، تارتاریک، مالئیک و اگزالیک از مهم‌ترین اسیدهای تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها هستند (۱۲). معدنی کردن فسفر نیز مکانیسم دیگری است که در نتیجه آن فسفات آلی توسط آنزیم فسفاتاز با آزادسازی پروتون به فسفات معدنی محلول تبدیل می‌شود.

از سال ۱۹۰۰ میلادی محیط‌های کشت گوناگونی مانند (PVK)^۱ و (NBRIP)^۲ (۱۳، ۱۴) برای غربالگری میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات به کار گرفته شده است. منبع فسفات استفاده شده در این محیط کشت‌ها به چالش اصلی جداسازی میکروارگانیسم‌ها تبدیل شده است. در این محیط کشت‌ها فسفات کلسیم $(Ca_3(PO_4)_2)$ به‌عنوان منبع فسفات در نظر گرفته شده است و در کنار آن ایجاد هاله پیرامون کلنی باکتری بر روی محیط آگاردار با عنوان شاخص غربالگری میکروارگانیسم‌هایی با توانایی انحلال فسفات مشخص می‌شود. از آنجا که بخش عمده‌ای از کشور ایران جزو مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد و مشکل تغذیه فسفر در گیاهان و نیز تنش‌های محیطی شدید از جمله چالش‌های مهم در تولید بخش کشاورزی محسوب می‌شود، برخی از عوامل غیرزیستی مانند کم آبی، شوری، pH بالا و آهکی بودن خاک بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی از جمله گندم اثر می‌گذارند. تنش‌های محیطی در میزان فراهمی و جذب فسفر توسط گیاهان و حلالیت کم ترکیب Ca-P تأثیر به‌سزایی دارند. در این میان مقاومت به این تغییرات محیطی از عوامل مهم استقرار

1- Pikovskaya

2- Botanical Research Institute Phosphate

3- Nutrient Agar

تغییرات شوری: از سوسپانسیون جدایه‌ها با غلظت استاندارد (نیم مک فارلند) به میزان ۱ درصد به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت نوترینت برات با غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم (۰-۵-۱۰-۱۵ درصد) تلقیح کرده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. میزان رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد.

تعیین شاخص حل‌کنندگی (SI) و کارایی (PSE) حل‌کنندگی فسفات در جدایه‌های منتخب: به منظور تعیین توانایی و کارایی جدایه‌های انتخاب شده، شاخص SI و راندمان PSE به روش زیر تعیین می‌گردد. از سوسپانسیون میکروبی غلظت استاندارد مطابق نیم مک فارلند تهیه شد و به مقدار ۱۰ میکرولیتر به صورت نقطه‌ای در محیط کشت آگاردار PVK کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۳-۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس قطر کلنی و قطر هاله شفاف ایجاد شده در پیرامون کلنی با خط‌کش اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه زیر:

$$(1) \quad (SI) = \frac{C+Z}{C} \text{ شاخص}$$

$$(2) \quad (\%) (PSE) = \frac{Z}{C} \times 100 \text{ بازده}$$

میزان حل‌کنندگی فسفات محاسبه شد که در آن، C برای قطر کلنی (میلی‌متر) و Z برای قطر هاله (میلی‌متر) تعریف شده است (۱۸، ۱۹).

ارزیابی کمی تولید فسفات معدنی توسط جدایه‌های منتخب: تمامی جدایه‌هایی که بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگاردار PVK، کانی فسفات را حل کرده و هاله ایجاد کرده بودند، در این مرحله به‌منظور بررسی کمی توانایی آزادسازی فسفر با استفاده

رنگ‌آمیزی گرم بررسی و تصاویر میکروسکوپی از آن‌ها تهیه شد و برای مطالعات بیش‌تر به دو روش فعال و غیرفعال نگهداری شدند. در نهایت، به منظور بررسی ویژگی حل‌کننده فسفات در باکتری‌ها، جدایه‌ها بر روی محیط کشت PVK آگار به صورت چمنی کشت داده شد (۱۱، ۱۵). ترکیبات محیط کشت PVK آگار بر حسب گرم بر لیتر شامل گلوکز (۱۰)، تری کلسیم فسفات (۵)، سولفات آمونیوم (۰/۵)، کلرید کلسیم (۰/۲)، سولفات منیزیم (۰/۲)، کلرید پتاسیم (۰/۲)، عصاره مخمر (۰/۵)، سولفات منگنز (۰/۰۰۲)، سولفات آهن (۰/۰۰۲) و آگار (۱۵) می‌باشد. پلیت‌ها به مدت ۳-۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. باکتری‌های حل‌کننده فسفات با ایجاد هاله در پیرامون کلنی جداسازی و انتخاب شدند.

بررسی مقاومت جدایه‌های حل‌کننده فسفات به شرایط سخت محیطی

تغییرات pH: ابتدا از جدایه‌های انتخاب شده کشت تازه بر روی محیط نوترینت آگار تهیه شد. از هر جدایه، غلظت استاندارد مطابق با استاندارد (نیم مک فارلند) در محیط کشت نوترینت برات تهیه و به میزان ۱ درصد به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت نوترینت برات با pHهای ۵، ۷ و ۹ تلقیح شد. پس از گرماگذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جذب نوری محیط حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گرفته شد (۱۶).

تغییرات دما: به منظور بررسی اثرات تغییرات دمایی، از جدایه‌های مورد نظر با غلظت استاندارد (نیم مک فارلند) به محیط کشت نوترینت برات تلقیح صورت گرفته و رشد آن‌ها در مدت زمان ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد با جذب نوری ۶۰۰ نانومتر بررسی شد (۱۷).

1- Phosphate Solubilization Index
2- Phosphate Solubilizing Efficiency

استفاده از محیط کشت بدون نیتروژن (NFB) دارای معرف برومو تیمول بلو^۲ در (pH=۶/۲) با اندکی تغییرات مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات محیط کشت بر حسب گرم بر لیتر شامل: سوکروز (۲۰)، دی پتاسیم فسفات (۰/۰۵)، مونو پتاسیم فسفات (۰/۱۵)، سولفات منیزم (۰/۲)، کلرید آهن (۰/۰۱)، آگار (۱۵) و معرف بروموتیمول آبی می باشد. محیط کشت به صورت مقایسه‌ای با استفاده از دو منبع کربن گلوکز و ساکارز تهیه شد. بدین منظور از کشت تازه هر سویه، سوسپانسیون میکروبی استاندارد مطابق (نیم مک فارلند) تهیه شده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. تغییر رنگ محیط به زرد نشان‌دهنده تثبیت نیتروژن توسط باکتری و تولید اسید می باشد که نتایج به صورت مثبت یا منفی گزارش می شوند (۲۱، ۲۲).

بررسی اسیدهای آلی تولید شده در محیط کشت برات در جدایه‌های دارای توانایی حل‌کنندگی فسفات: به منظور بررسی اسیدهای آلی تولید شده در محیط کشت PVK برات، توسط جدایه‌های انتخابی، از روش TLC^۳ یا کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. اسیدهای آلی سیتریک، تارتاریک و مالئیک با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شدند. فاز متحرک شامل متانول و هیدروکسید آمونیوم به نسبت ۱ به ۴ در نظر گرفته شد. پس از خشک شدن پلیت TLC، از معرف آشکارساز که شامل آب و متانول با نسبت ۱:۴ به همراه ۸ قطره محلول هیدروکسید سدیم و ۰/۳ درصد معرف رنگی بروموکروزول سبز^۴ است استفاده شد. در صورت

از روش رنگ‌سنجی آسکوربیک اسید آزمایش شدند. در این ارزیابی غلظت استاندارد از سوسپانسیون میکروبی کلنی‌های خالص تمامی جدایه‌ها (نیم مک فارلند) به میزان ۱ درصد از حجم محیط کشت اصلی (PVK) برات که pH آن روی ۷/۲ تنظیم شده است) تلقیح شده و به مدت ۵ روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. جهت بررسی روند تغییرات pH در روزهای دوم و پنجم گرماگذاری از هر یک از فلاسک‌های مورد آزمایش مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در شرایط استریل برداشته و pH آن با کمک دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. در آخرین روز گرماگذاری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه از هر فلاسک برداشته و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کرده (به جهت جداسازی بخش نامحلول) و از مایع رویی برای انجام آزمایش استفاده شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف رنگی (۵۰ میلی‌لیتر محلول پتاسیم آنتی تارتارات (K₂Sb₂C₈H₄O₁₂ 3H₂O) در ۱۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵ نرمال با ۱۲/۵ میلی‌لیتر محلول آمونیوم مولیبدات (N₆H₂₄Mo₇O₂₄) مخلوط شد. محلول تهیه شده به آرامی با ۰/۲۶۴ گرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک مخلوط شد. رنگ آبی ملایم پس از گذشت ۱۵ دقیقه قابل مشاهده بوده که جذب نوری آن در طول موج ۸۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فسفات تولید شده بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با KH₂PO₄ گزارش شد. در نمونه شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، آب مقطر استفاده شد. شدت رنگ آبی می‌تواند به عنوان شاخصی از میزان فعالیت فسفاتازی باشد (۱۸، ۲۰).

بررسی قابلیت تثبیت‌کنندگی نیتروژن توسط سویه‌های

منتخب: توانایی تثبیت‌کنندگی نیتروژن در جدایه‌ها با

- 1- Nitrogen free blue
- 2- Thymol blue (C₂₇H₃₀O₅S)
- 3- Thin Layer Chromatography
- 4- Bromocresol green

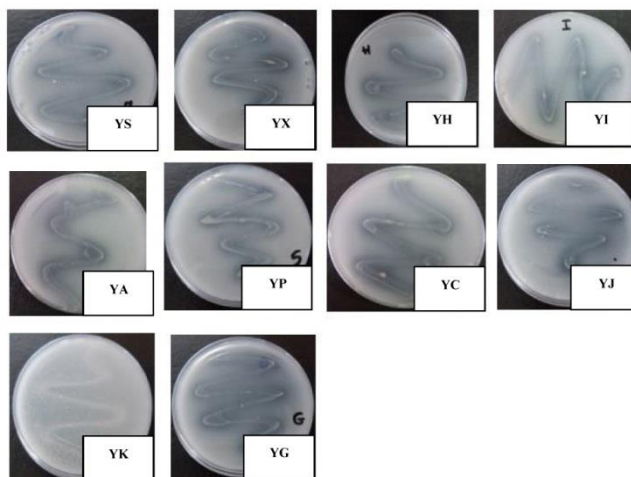
هم‌چنین رطوبت خاک به روش اندازه‌گیری مستقیم، به میزان ۳۲/۵٪ اندازه‌گیری شد. بعد از خالص‌سازی جدایه‌ها، از میان ۲۸ نمونه جدا شده تعداد ۱۰ جدایه که توانایی حل کردن فسفات را با تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی بر روی محیط PVK آگار حاوی فسفات کلسیم نشان دادند، انتخاب شدند. تشکیل هاله شفاف برای نمونه‌های (YK, YC, YG, YS, YP, YX, YI, YA, YH, YJ) اولین مرحله شناسایی سویه‌های حل‌کننده فسفات بود. سه جدایه باکتریایی B8, B23, YK که توانسته بودند بر روی محیط PVK آگار کلنی بدون هاله ایجاد کنند نیز به عنوان جدایه‌های دارای پتانسیل حل‌کنندگی فسفات به جهت بررسی ویژگی‌های مؤثر احتمالی برای مرحله دوم انتخاب شدند (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، سویه‌های YX, YS, YC, YG بیش‌ترین هاله شفاف را ایجاد کرده‌اند.

وجود اسید آلی در نمونه لکه زرد بر روی زمینه سبز آشکار خواهد شد (۲۱).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون توکی در سطح ۰/۰۵ انجام شد. هم‌چنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

جداسازی و غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات: در این مطالعه نمونه‌های مورد آزمایش که از چند نقطه مختلف از خاک‌های تحت کشت گندم واقع در اطراف شهر یزد جدا شده بودند، به منظور دستیابی به باکتری‌های حل‌کننده فسفات ارزیابی شدند. نمونه‌های خاک از نظر خصوصیات فیزیکی دارای بافت ظاهری لومی شنی با (pH=۷/۱) بود.



شکل ۱- تشکیل هاله توسط سویه‌های حل‌کننده فسفات.

Figure 1. Halo zone formation by phosphate solubilizing isolates.

حل‌کنندگی و شاخص حل‌کنندگی فسفات در سطح ۵ درصد بود.

تعیین شاخص SI و کارایی PSE حل‌کنندگی فسفات در سویه‌ها: داده‌های جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، تأییدکننده اثر معنی‌دار جدایه‌ها بر کارایی

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌ها بر کارایی (PSE) و نیز شاخص حل‌کنندگی فسفات (SI).

Table 1. Analysis of variance of Phosphate Solubilizing Efficiency (PSE) and the Phosphate Solubilization Index (SI) in isolates.

میانگین مربعات Mean square	درجه آزادی DF	منابع Sources
کارایی حل‌کنندگی Phosphate Solubilizing Efficiency (PSE) (%Z/C)	شاخص حل‌کنندگی Phosphate Solubilization Index	
417.6*	9	جدایه‌ها Isolates
561.8	10	خطا Error

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

* Significant at 5% probability levels

آماره قرار گرفت. هم‌چنین کم‌ترین میزان این شاخص در جدایه‌های YS و YH (۲/۶۶) مشاهده شد که با جدایه‌های YG، YK، YP، YX و YA در یک سطح آماری قرار داشتند. جدایه YC در پارامتر کارایی حل‌کنندگی نیز موفق ظاهر شد به‌طوری‌که بالاترین میزان (۳۲۰) را به خود اختصاص داد.

شاخص حل‌کنندگی فسفات بر اساس اندازه کلنی و اندازه هاله ایجاد شده برای هرکدام از جدایه‌های منتخب، در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، تمام جدایه‌ها قادر به حل کردن فسفات بودند و بیش‌ترین شاخص متعلق به جدایه YC به میزان ۴/۱ بود که با جدایه YI در یک سطح

جدول ۲- مقایسه شاخص حل‌کنندگی (SI) و کارایی حل‌کنندگی فسفات (PSE) در جدایه‌ها.

Table 2. Comparison of the Phosphate Solubilization Index (SI) and Phosphate Solubilizing Efficiency (PSE) in the isolates.

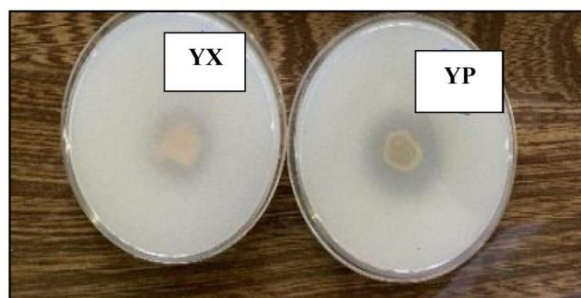
کارایی حل‌کنندگی Phosphate Solubilizing Efficiency (PSE) (%Z/C)	شاخص حل‌کنندگی Phosphate Solubilization Index (SI)	قطر هاله Halo zone (mm)	قطر کلنی Colony diameter (mm)	نام جدایه Isolate
320 ^b	4.1 ^d	24	8	YC
200 ^a	2.88 ^{ab}	18	9	YG
190 ^a	2.9 ^{ab}	21	11	YK
166.6 ^a	2.66 ^a	15	9	YS
188.8 ^a	2.88 ^{ab}	17	9	YP
200 ^a	3 ^{ab}	18	9	YX
250 ^a	3.5 ^{cd}	20	8	YI
180 ^a	2.8 ^a	18	10	YA
166.6 ^a	2.66 ^a	20	12	YH
228.5 ^a	3.28 ^{bc}	16	7	YJ

^Z قطر هاله

^C قطر کلنی

در هر ستون، میانگین‌هایی که دست‌کم یک حرف مشابه داشته باشند، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون توکی، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵)

In each column, the means with at least one similar letter have no significant difference (Tukey test, at the significance level of 0.05)



شکل ۲- مقایسه هاله تولید شده توسط جدایه‌های مختلف برای تعیین شاخص SI و کارایی PSE (محیط PVK آگار، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و زمان گرماگذاری ۳-۵ روز).

Figure 2. Comparison of the halo zone production by different isolates for Phosphate Solubilization Index (SI) and Phosphate Solubilizing Efficiency (PSE) determination (PVK agar, 28 °C, 3-5 days of incubation).

میزان فسفات و سویه‌های YP و YA به ترتیب با مقادیرهای ۶۱/۸۳ و ۶۶/۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر کم‌ترین میزان فسفات رها شده در محیط را داشتند (شکل ۳). همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس مربوط به تأثیر جدایه‌ها بر رهائش فسفات مشهود است (جدول ۳)، جدایه‌ها بر رهائش فسفات در سطح ۵ درصد تأثیر معناداری دارند. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که از میان ۱۰ سویه آزمون شده، YS و YG به ترتیب با رهائش ۲۰۳/۹ و ۱۹۴/۸ میکروگرم بر لیتر فسفات، بیش‌ترین کارایی را از خود نشان دادند. این دو سویه، با جدایه‌های YK و YC اختلاف معناداری نداشتند. همچنین جدایه‌های YX، YA، YP، YH، YJ و YI با قرار گرفتن در یک سطح آماری، کم‌ترین توانایی را در این زمینه از خود نشان دادند (شکل ۳).

رشد باکتریایی جدایه‌های حل‌کننده فسفات به‌طور مستقیم با کاهش میزان pH مرتبط است (شکل ۴) و غلظت فسفات آزاد شده در محیط کشت، با کاهش میزان pH همراه است. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در روز دوم از گرماگذاری مقدار pH به محدوده ۴-۴/۲ در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد باکتری) که ۷/۲ بوده کاهش یافته است. جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، معناداری تأثیر جدایه‌ها بر

نتایج حاصل نشان می‌دهد که در مطالعه حاضر، بیش‌تر جدایه‌ها به صورت چشمگیری دارای کارایی و شاخص حل‌کنندگی فسفات در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از مطالعات مشابه می‌باشد. به‌طور مثال، معتمدی و همکاران (۲۰۱۶)، ۳ سویه باکتریایی: *Aeromonas sp.*، *Proteus mirabilis* و *Raoultella terrigena* را از رایزوسفر مزرعه کلم جداسازی و از نظر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ارزیابی کردند. محدوده کارایی حل‌کنندگی فسفات بین ۳۳/۳ تا ۳۶۶/۶ و شاخص حل‌کنندگی فسفات در محدوده ۱/۳ تا ۴/۷ برای این ۴ سویه گزارش شده است (۱۰). در همین راستا ۳ سویه مختلف از *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* جدا شده از رایزوسفر کشت برنج منطقه جامو در هند، کارایی حل‌کنندگی فسفات بین ۳۵/۴ تا ۵۰/۹ را نشان دادند. به‌علاوه، این سویه‌ها با کشت بر روی محیط PVK آگار در حضور کلسیم فسفات توانستند هاله شفاف در اطراف کلنی با قطر بین ۲/۱ تا ۳/۲ میلی‌متر ایجاد کنند (۲۳).

بررسی کمی میزان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌ها:
تمامی جدایه‌های انتخاب شده در محیط PVK برات در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد کرده و جدایه‌های YC، YG، YS به ترتیب با ۲۰۳/۹۱، ۱۹۴/۸ و ۱۵۱/۵۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین

و سرایشا بوده است که به ترتیب با مقدار فسفر آزاد شده ۵۸/۱ میلی گرم بر لیتر در ۸ ساعت اول فعالیت و ۸۸/۱ میلی گرم بر لیتر پس از ۱۲ ساعت میزان دانه‌دهی گیاه را تا ۹۰ درصد و وزن خشک را تا ۶۸ میلی گرم افزایش دادند (۲۵). هم‌چنین بهار و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت حل‌کنندگی فسفات را در باکتری‌های جدا شده از خاک کنار رودخانه دلتا در کشور هند مورد سنجش قرار دادند و بیش‌ترین میزان فعالیت را در حدود ۴۴/۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *Serratia* گزارش کردند که در این بررسی میزان pH محیط از ۷ به ۳/۱۵ کاهش پیدا کرده است (۲۶). چن و همکاران (۲۰۲۱) با جداسازی باکتری‌های اندوفیت از خاک درختان صنوبر در کشور چین دریافتند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات توانایی افزایش میزان فسفات در دسترس خاک را از ۵/۳۱ میلی گرم در هر کیلوگرم به ۲۰/۵۶ میلی گرم در هر کیلوگرم دارند. به علاوه، این باکتری‌ها توانستند میزان رشد قدی گیاه را تا ۱/۲۶ برابر و قطر ساقه را تا حدود ۴۰ درصد افزایش دهند (۲۷).

تغییرات pH پس از ۲ و ۵ روز را تأیید می‌کند. اگرچه پس از گذشت ۲ روز از گرماگذاری سویه‌ها (شکل ۴)، هیچ اختلاف معناداری ما بین pH آن‌ها دیده نشد اما بین pH نمونه کنترل و جدایه‌ها اختلاف وجود داشت. تجزیه داده‌های به‌دست آمده پس از گذشت ۵ روز از گرماگذاری نشان دادند که سویه‌های YK و YS فاقد اختلاف معنادار با یکدیگر هستند اما با جدایه‌های YX، YH، YA، YI، YG، YJ، YP و YC اختلاف معنادار دارند.

تاکنون گزارش‌های زیادی مبنی بر رهاسازی فسفر از باکتری‌های متداول خاک مانند *Bacillus* و *Pseudomonas* ارائه شده است که نشان می‌دهد این باکتری‌ها به علت تولید و ترشح اسید آلی، آنزیم و سیدروفورها، بین آنیون‌های این اسیدهای آلی با آنیون‌هایی مانند فسفات تبادل برقرار کرده و باعث انحلال و آزادسازی ترکیبات نامحلول مانند فسفات کلسیم می‌شود (۲۴). بلانکو و همکاران (۲۰۲۰) با مطالعه بر روی میزان حل‌کنندگی فسفات در باکتری‌های جدا شده از خاک مزرعه کشت گیاه *Allium cepa* در کشور کلمبیا دریافتند که بیش‌ترین میزان فعالیت متعلق به ترکیب سویه‌های سودوموناس

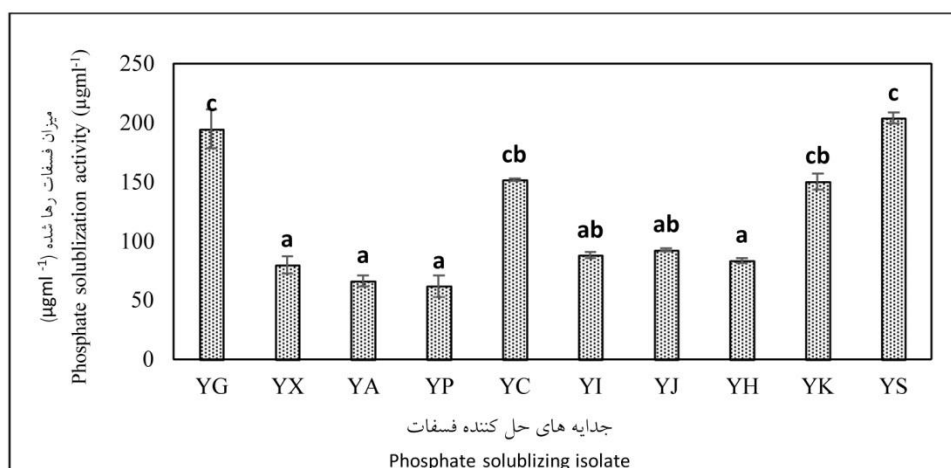
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌ها بر رهایش فسفات و تغییر پی‌اچ پس از ۲ و ۵ روز.

Table 3. Analysis of variance of phosphate release and pH changes after 2 and 5 days.

میانگین مربعات Mean square		درجه آزادی DF	منابع Sources
pH پس از ۵ روز pH after 5 days	pH پس از ۲ روز pH after 2 days	رهایش فسفات Phosphate release	
0.2664*	1.8*	5667.3*	10 جدایه‌ها Isolates
0.0249	0.0017	296.7	11 خطا Error

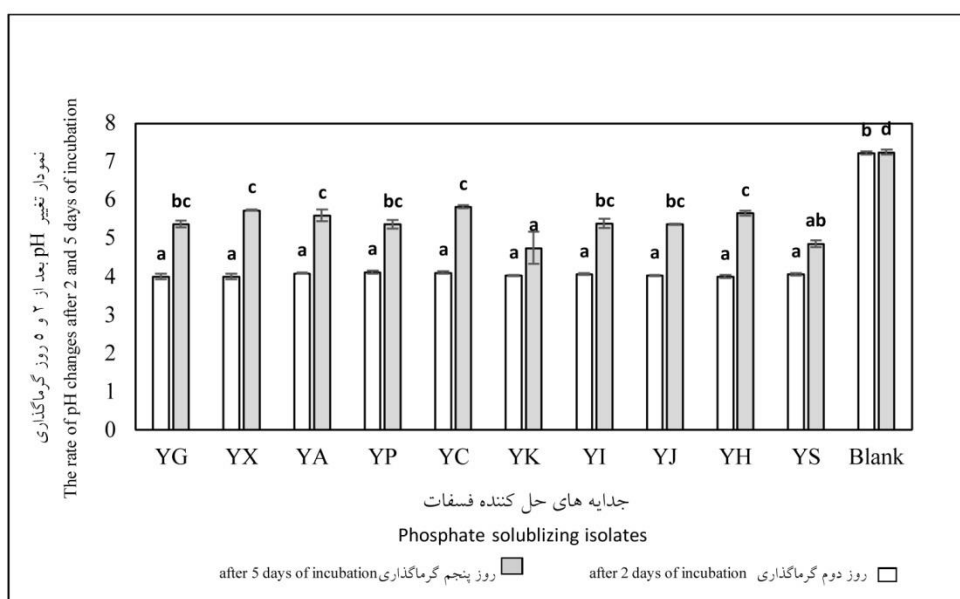
* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

* Significant at 5% probability levels



شکل ۳- میزان رهائش فسفات در هر جدایه ($\mu\text{g ml}^{-1}$) پس از ۵ روز گرماگذاری در محیط کشت PVK برات (۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه). میانگین‌هایی که دست‌کم یک حرف مشابه داشته باشند، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون توکی، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵).

Figure 3. Phosphate solubilization abilities of the bacterial isolates (μgml^{-1}), after 5 days incubation in PVK Broth, 28 °C, 150 rpm. In each column, the means with at least one similar letter have no significant difference (Tukey test, at the significance level of 0.05).



شکل ۴- نمودار تغییرات میزان pH جدایه‌های مورد بررسی در محیط کشت PVK برات در روزهای دوم و پنجم گرماگذاری (۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه). میانگین‌هایی که دست‌کم یک حرف مشابه داشته باشند، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون توکی، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵).

Figure 4. The rate of pH changes after 2 and 5 days of incubation in PVK Broth, 28 °C, 150 rpm. In each column, the means with at least one similar letter have no significant difference (Tukey test, at the significance level of 0.05).

تأثیر عوامل مختلف محیطی بر رشد باکتری‌های حل‌کننده فسفات

مقاومت به دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک: از آنجایی که اغلب خاک‌های کشاورزی کشور به سمت شور و قلیایی شدن پیش می‌روند، بررسی فعالیت محلول‌کنندگی فسفات در باکتری‌های جداسازی شده در شرایط سخت محیطی (دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک) بسیار دارای اهمیت است. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیش‌تر باکتری‌های جدا شده قادرند در خاک‌های قلیایی و اسیدی مقاومت نشان داده و رشد قابل توجهی داشته باشند (شکل ۱-۵). جدول ۴، حکم تأییدی بر این ماجراست. در این مطالعه، بر اساس نتایج مقایسه میانگین رشد جدایه‌ها در pH=۵، سویه YG با بیشینه رشد ۱/۰۱ بهترین کارکرد را داشته است. هم‌چنین جدایه‌های YI و YA در رتبه‌های بعدی و در یک سطح آماری قرار می‌گیرند. با بررسی نتایج رشد جدایه‌ها در pH=۷ مشخص شد که سویه YS با رشد ۱/۳ بهترین بازده را به نمایش گذاشته است. هم‌چنین بررسی‌ها در pH=۹، همانند آنالیزهای pH=۵، جدایه‌های YG و YA را که جذب نوری آن‌ها به ترتیب ۱/۰۳ و ۰/۸۱۶ بود به‌عنوان جدایه‌هایی با بیش‌ترین رشد مطرح می‌کند. به‌طورکلی فسفر، در خاک‌های اسیدی بیش‌تر از خاک‌های قلیایی در دسترس است زیرا محیط‌های اسیدی حاوی پروتون‌های بیش‌تری برای آزادسازی

فسفات و کند کردن تشکیل کمپلکس فسفر با عناصر فلزی است. بنابراین ممکن است خاک‌های اسیدی برای آزادسازی فسفر نیازی به اجتماعات بزرگ میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات نداشته باشند. در خاک قلیایی مقدار انبوهی از فسفر توسط کاتیون‌ها به دام افتاده و به‌جامعه میکروبی بیش‌تری برای آزادسازی آن نیاز است (۲۸). ژائو و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که در (pH = ۳/۲)، حدود ۴۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر از فعالیت میکروارگانیسم *Burkholderia cepacia* آزاد می‌شود در حالی که با افزایش pH تا ۴/۹۵ این مقدار به ۱۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش می‌یابد. اگرچه pH بین ۴ تا ۶ به‌عنوان بهترین محدوده فعالیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات گزارش شده است (۲۹)، اما جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه توانسته‌اند رشد نسبتاً خوبی را در محدوده pH ۵ تا ۹ داشته باشند. بر خلاف آنچه در بیش‌تر مطالعات گزارش می‌شود، هیو و همکاران (۲۰۱۰) ثابت کردند که باکتری حل‌کننده فسفات *Pantoea stewartii* در pH خنثی بالاترین فعالیت حل‌کنندگی را دارد. به‌علاوه، این باکتری می‌تواند محدوده دمایی ۱۵ تا ۳۵ درجه و مقدار شوری ۳۵-۵ در صد را تحمل کند (۳۰). در مطالعه دیگری نشان داده شد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات در رایزوسفر برنج در pH اسیدی هیچ‌گونه فعالیتی ندارند (۳۱).

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان رشد جدایه‌ها در pH اسیدی (۵)، خنثی (۷) و قلیایی (۹).

Table 4. Analysis of variance of isolations growth at acidic (5), neutral (7) and basic (9) pH.

میانگین مربعات			درجه آزادی DF	منابع Sources
رشد در pH ۹ Culture at pH 9	رشد در pH ۷ Culture at pH 7	رشد در pH ۵ Culture at pH 5		
0.1172*	0.1667*	0.1140*	9	جدایه‌ها Isolates
0.0005	0.0007	0.0013	10	خطا Error

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

* Significant at 5% probability levels

فاقد اختلاف معناداری هستند در مرتبه بعدی قرار می‌گیرند (شکل ۵ (ب)). به نظر می‌رسد که تمامی جدایه‌ها به خوبی توانسته‌اند با شرایط سخت دمای منطقه‌ای که از آن جدا شده‌اند (زمین کشاورزی منطقه بیابانی شهر یزد) سازگار باشند. جدایه‌هایی با تحمل دمای بالای خاک‌های مناطق خشک که در تثبیت نیتروژن دچار مشکل هستند می‌توانند بسیار قابل توجه باشند (۳۵).

کارپاگام و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که *Bacillus* و *Pseudomonas* جدا شده از خاک کشاورزی در ابتدا با افزایش دما، میزان فعالیت بالاتری را داشته و در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر مقدار خود می‌رسد اما با افزایش دما تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد (۹). برخی از فنوتیپ‌های باکتری *Kosakonia radicincitans* به‌علت دارا بودن ویژگی نمک دوستی می‌توانند تراکم ریشه گیاه تربچه را تا ۳ برابر افزایش داده و اثرات تقویت‌کننده چشمگیری را در این گیاه نشان دهد. استرس نمک در محیط کشت این گیاه باعث فعالیت اسید فسفاتازها از ۱/۲۴ به ۳/۳۴ واحد بر میلی‌گرم شده که متعاقب آن فعالیت آزادسازی فسفر نیز افزایش پیدا می‌کند. بنابراین تنش نمکی و املاح دیگر با باکتری اندوفیت می‌تواند فنوتیپ‌های سازگاری از آن‌ها در بهبود عملکرد شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی خاک ایجاد کند (۳۶).

در مورد تأثیر دما بر روند حلالیت فسفر توسط باکتری‌های خاک اطلاعات بسیار متفاوتی در دسترس است. برخی، دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد را دمای بهینه برای رشد باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌دانند (۳۲)؛ در حالی که برخی دیگر در دمای ۲۸-۳۰ درجه بیش‌ترین میزان فسفات آزاد شده را مشاهده کرده‌اند (۳۳، ۳۴). نائوتیال و همکاران (۱۹۹۹) دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد را برای حداکثر فعالیت باکتری‌های جدا شده از خاک‌های بیابانی در نظر گرفتند (۱۴).

تجزیه‌های آماری میانگین رشد جدایه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بیانگر بیشینه بودن رشد جدایه YP با جذب نوری ۱/۱۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر است. هم‌چنین، سویه‌های YH، YP، YA در دمای ۳۷ درجه بالاترین رشد را داشتند. در این مطالعه، همان‌طور که در شکل ۵ (ب) نشان داده شده است، اگرچه دمای بهینه برای رشد جدایه‌ها ۳۷ درجه سانتی‌گراد است، اما تمامی جدایه‌ها دارای توانایی بقا در شرایط دمایی تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. در شرایط سخت مانند دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در رشد باکتری بر اساس میزان کدورت، در بیش‌تر سویه‌ها کاهش چشمگیری مشاهده شده است به‌طور مثال در میزان جذب نوری سویه‌های YG، YJ، YI و YH به‌ترتیب ۵۹/۱، ۶۱/۷، ۵۸/۲ و ۴۲/۱ درصد کاهش نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. سویه YA در دمای ۴۵ درجه بیش‌ترین رشد را داشته است و دو سویه YH و YP نیز که

جدول ۵- تجزیه واریانس میزان رشد جدایه‌ها در دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد.

Table 5. Analysis of variance of isolations' growth at 25, 37, and 45 °C.

میانگین مربعات Mean square			درجه آزادی DF	منابع Sources
رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد Culture at 45 °C	رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد Culture at 37 °C	رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد Culture at 25 °C		
0.1477*	0.2179*	0.1166*	9	جدایه‌ها Isolates
0.0021	0.0048	0.0016	10	خطا Error

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

* Significant at 5% probability levels

نوری جدایه‌ها در ۴۸ ساعت به کم‌تر از ۰/۵ رسید (الف-۳-۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ توسط ماهاجان و همکاران انجام شد، مشخص شد که سویه *Pseudomonas stutzeri* یک باکتری مقاوم به نمک است که افزایش غلظت نمک باعث کموتاکسی منفی و افزایش سلول به دلیل مهار تشکیل سپتوم می‌شود. آن‌ها نشان دادند که این باکتری می‌تواند با تحمل طیف گسترده‌ای از نمک، دما و pH برای رشد و نمو گیاهان کشاورزی بسیار کارآمد باشد. از آن‌جا که شرایط بهینه رشد برای جدایه‌های پژوهش حاضر، محیط بدون نمک یا کم نمک است نمی‌توان نام نمک‌دوست را برای آن‌ها انتخاب کرد (۳۷). شرایط استرس نمکی برای رشد گیاهان مناطقی با خاک شور و هم‌چنین احیای این نوع از خاک‌های کشاورزی مزیت چشمگیری محسوب می‌شود (۳۸).

به منظور تعیین تحمل و رشد جدایه‌ها در محیط‌های نمکی از محیط کشت نوترینت برات استفاده شد. طبق جدول ۶ (تجزیه واریانس رشد جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم)، در تمام غلظت‌های آزمون شده به جز ۱۵٪، رشد جدایه‌ها معنادار است. شکل (الف-۳-۵) نشانگر بیشینه رشد سویه‌های YA، YI و YH در غلظت صفر سدیم کلرید است در حالی که سویه YP در غلظت ۵ درصد نمک بهترین رشد را از خود نشان داد. نام جدایه YP بار دیگر در غلظت ۱۰ درصد نیز به عنوان برترین سویه تکرار شده است. جدایه YP را می‌توان به عنوان جدایه پذیرنده شرایط استرس نمکی در نظر گرفت زیرا با اندکی کاهش در رشد، محیط کشت نمکی ۵ و نیز ۱۰ درصد را تحمل می‌کند. اگرچه شرایط ۱۵٪ نمک، رشد جدایه‌ها را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد به طوری که میزان جذب

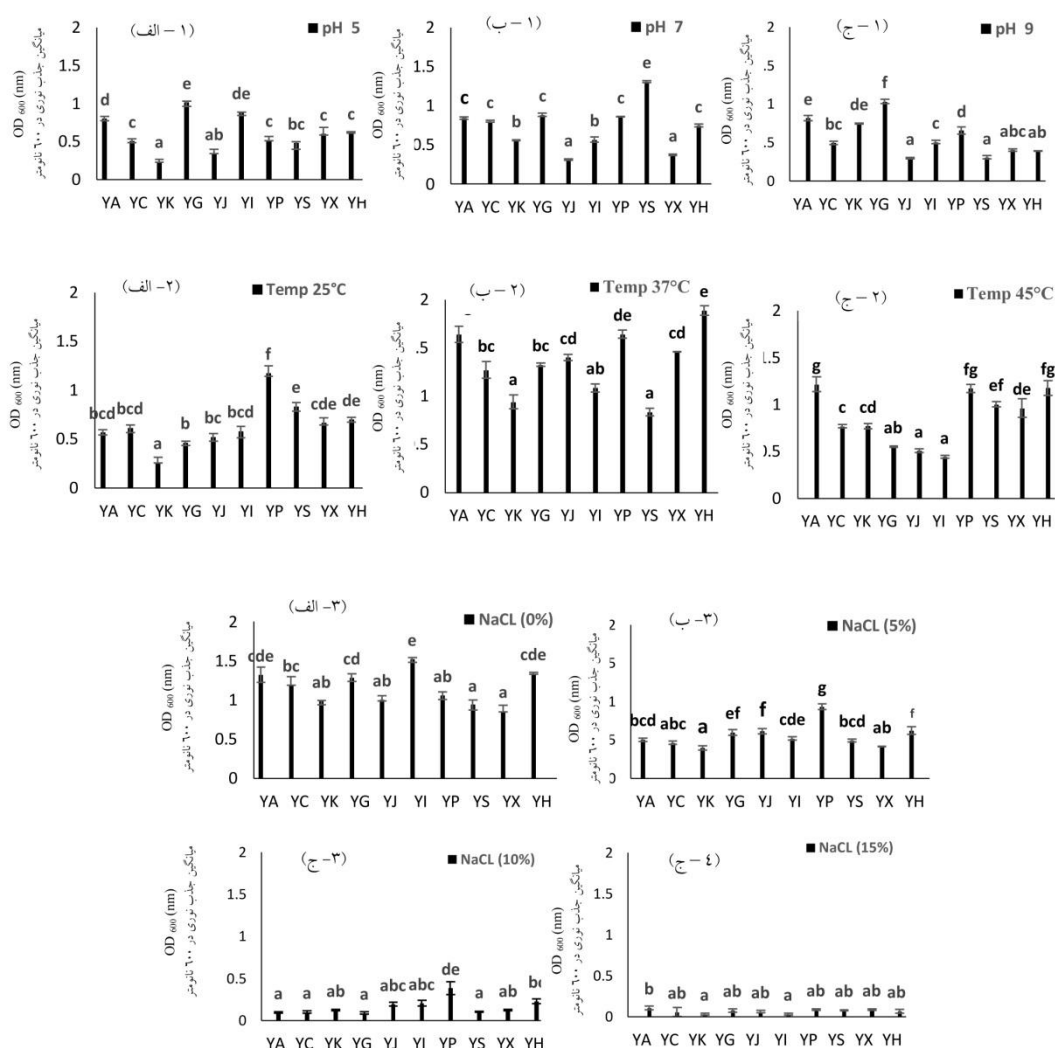
جدول ۶- تجزیه واریانس میزان رشد جدایه‌ها در غلظت نمک ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵٪.

Table 6. Analysis of variance of isolations' growth at 0, 5, 10, and 15% NaCl.

میانگین مربعات Mean square				درجه آزادی DF	منابع Sources
رشد در غلظت ۱۵٪ نمک Culture at 15% NaCl	رشد در غلظت ۱۰٪ نمک Culture at 10% NaCl	رشد در غلظت ۵٪ نمک Culture at 5% NaCl	رشد در غلظت ۰٪ نمک Culture at 0% NaCl		
0.0011	0.0170*	0.0475*	0.0906*	9	جدایه‌ها Isolates
0.0002	0.0009	0.0022	0.0025	10	خطا Error

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

* Significant at 5% probability levels



شکل ۵- تأثیر شرایط مختلف محیطی بر رشد جدایه‌های منتخب. تأثیر pH: pH (۵، ۷ و ۹) به ترتیب (۱-الف، ۱-ب، ۱-ج)-تأثیر دما: دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب (۲-الف، ۲-ب، ۲-ج)- تأثیر غلظت نمک کلرید سدیم: نمک ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد به ترتیب (۳-الف، ۳-ب، ۳-ج، ۳-د). محیط کشت نوترینت براث، ۴۸ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد. میانگین‌هایی که دست‌کم یک حرف مشابه داشته باشند، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (آزمون توکی، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵).

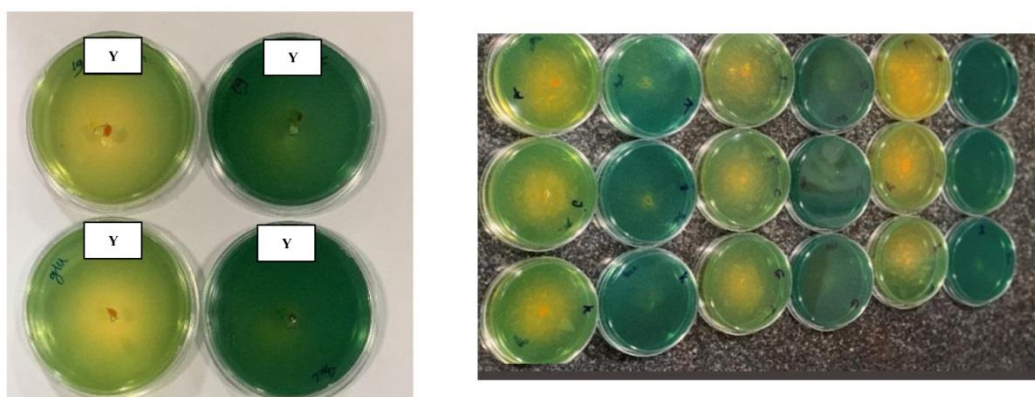
Figure 5. Effect of different environmental conditions on the selected isolates growth, pH effect (5 (1a), 7 (1b), 9(1c) - temperatures effect (25 °C (2a), 37 °C (2b), 45 °C (2c)- NaCl concentration effect (0% (3a), 5% (3b), 10% (3c), 15% (3c). Nutrient broth medium, 48h, 28 °C. In each column, the means with at least one similar letter have no significant difference (Tukey test, at the significance level of 0.05).

شدند. از میان جدایه‌ها، تمامی ۱۰ جدایه قادر به تثبیت نیتروژن در محیط کشت حاوی گلوکز بوده و همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است رنگ محیط کشت دارای معرف بروموتیمول بلو از سبز تیره به زرد تغییر کرده است. علاوه بر این، جدایه‌های YX

قابلیت تثبیت‌کنندگی نیتروژن توسط جدایه‌ها: بعد از کشت جدایه‌ها در محیط فاقد نیتروژن (NFB) و به‌طور مقایسه‌ای با استفاده از دو منبع کربن جداگانه گلوکز و ساکارز، هر کدام از پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری

محصول بیش تر با هزینه کم تر کمک شایانی می کند. ارتباط بین حل شونده فسفات و تثبیت نیتروژن در سال ۱۹۹۵ طی یک آزمایش بیش تر مشخص شد. ترکیب یک میکروارگانیسم تثبیت کننده نیتروژن (*Azospirillum lipoferum*) و یک باکتری حل کننده فسفات (*Agrobacterium radiobacter*) به طور چشمگیری میزان نیتروژن خاک را افزایش داد (۴۰). در سال ۲۰۰۷ نیز پژوهش گران اثر سینرژیک باکتری های حل کننده فسفات (*Bacillus* و *Pseudomonas*) و باکتری های تثبیت کننده نیتروژن *Mesorhizobium cicero* و *Azotobacter chroococcum* را تایید کردند (۴۱). بنابراین این اثرات مثبت، هم زمان با افزایش در دسترس بودن مواد مغذی مانند فسفر و نیتروژن و جذب بالا در خاک های بدون کود شیمیایی مشخص شد (۴۲).

و YC می توانند رنگ محیط کشت حاوی ساکارز را نیز تغییر داده و اندکی کم تر از محیط کشت حاوی گلوکز، نیتروژن را تثبیت کنند (شکل ۶، جدول ۲). نتایج این مطالعه با نتایج حاصل از تثبیت نیتروژن توسط باکتری های حل کننده فسفات گزارش شده مطابقت دارد (۱۰، ۳۹). حل شدن فسفات غیرمحلول توسط میکروارگانیسم ها به ویژگی تولید و ترشح اسیدهای آلی آن ها نسبت داده می شود و در نهایت باعث بهبود گیاه می شود. این ویژگی از طریق مکانیسم های متنوعی مانند آزادسازی سوبستراهای رشد گیاه، در دسترس قرار دادن مولکول های غذایی کوچک در خاک و البته تثبیت نیتروژن انجام می شود. بنابراین استفاده از این میکروب ها برای خاک های فقیر از نیتروژن، جایی که بخش عمده نیتروژن خارج از دسترس گیاه است، به کشاورزان برای تولید



شکل ۶- مقایسه میزان توانایی جدایه ها در تثبیت نیتروژن در محیط کشت های حاوی دو منبع جداگانه کربن (گلوکز و ساکارز) (راست)، جدایه هایی که با استفاده از هر دو نوع منبع کربنی می توانند نیتروژن را تثبیت کنند (محیط NFB، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و زمان گرماگذاری ۳-۵ روز).

Figure 6. Comparison of the isolate's ability in nitrogen fixation using two different carbon sources (glucose and sucrose) (Right), Isolates that can stabilize nitrogen using both types of carbon sources (Left). NFB medium, 28 °C, 3-5 days incubation.

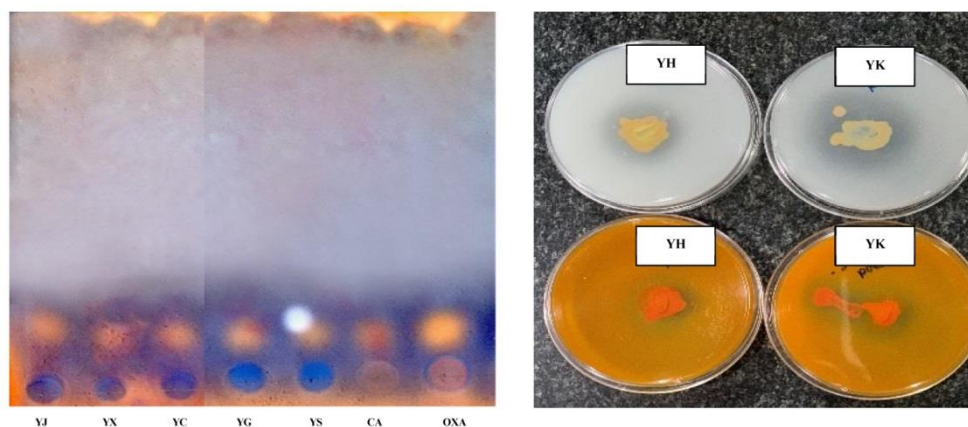
جدول ۷- مقایسه کیفی تغییر رنگ ایجاد شده در اثر تثبیت نیتروژن توسط جدایه‌ها بر روی محیط کشت NFB.

Table 7. Qualitative comparison of the color change caused by nitrogen fixing isolates on NFB medium.

شدت رنگ ایجاد شده				نام جدایه Isolates
Color intensity				
تغییر رنگ زیاد High color change	تغییر رنگ متوسط Medium color change	تغییر رنگ کم Low color change	بدون تغییر رنگ No color change	
		•		YC
		•		YG
	•			YK
	•			YS
•				YP
		•		YX
		•		YI
	•			YA
•				YH
	•			YJ
		•		YC
		•		YG

یافته‌های به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط تنگ و همکاران (۲۰۱۹) برای تشخیص تولید اسید اگزالیک، اسید مالئیک و اسید سیتریک توسط سویه‌های *Pseudomonas Leclercia adecarboxylata* و *putida* مطابقت دارد (۴۳). وانگ و همکاران (۲۰۲۰) تولید اسید سیتریک و اسید اگزالیک را در دو سویه از *Penicillium oxalicum* تأیید کردند (۱۱). هم‌چنین به کمک روش کروماتوگرافی لایه نازک وجود اسید اگزالیک به عنوان اسید آلی غالب در جدایه‌های حل‌کننده فسفات *Aeromonas sp.*، *Proteus mirabilis* و *Raoultella terrigena* تشخیص داده شد (۱۰). علاوه بر نوع اسید های آلی، برای دستیابی به مقدار اسید تولید شده می‌توان از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده کرد. اسید آلی به منظور ایجاد پروتون می‌تواند فسفات نامحلول را آزاد کند و به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی در فرآیند حل‌کنندگی نقش داشته باشد.

تولید اسیدهای آلی توسط جدایه‌های حل‌کننده فسفات: تاکنون تولید اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، اسید سیتریک، اسید اگزالیک، اسید فوماریک، اسید مالئیک، اسید گلیکولیک و اسید تارتاریک به‌وسیله باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک و به‌خصوص باکتری‌هایی که از رایزوسفر جدا شده‌اند گزارش شده است (۳۹، ۴۱، ۴۲). در این مطالعه به‌منظور بررسی تولید اسید آلی توسط جدایه‌ها، ابتدا از محیط کشت PVK برات حاوی رنگ معرف استفاده شده است. همان‌طور که در شکل (۷ راست) نشان داده شده، تمامی جدایه‌ها قادر به تغییر رنگ محیط به زرد تیره بوده که این امر نشان‌دهنده توانایی تولید اسیدهای آلی توسط جدایه‌ها می‌باشد. به منظور تأیید این نتایج از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شده است که بر اساس نتایج به دست آمده وجود اسید سیتریک و اسید اگزالیک برای جدایه‌های YC، YX، YJ و YS تأیید شده است (شکل ۷ چپ).



شکل ۷- توانایی تولید اسیدهای آلی توسط جدایه‌ها در محیط کشت PVK براث حاوی معرف پس از ۴ روز گرماگذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد (راست). تشخیص اسیدهای آلی توسط TLC در کنار دو استاندارد اسید آلی سیتریک و اگزالیک (چپ).

Figure 7. Organic acid production ability of the selected isolates in PVK medium containing reagent, after 4 days incubation at 28°C (Right). Organic acid determination by TLC compare with citric acid and oxalic acid as standard (Left).

شهر یزد توانسته‌اند به میزان قابل قبولی فسفات را آزاد کرده، نیتروژن را تثبیت کنند و هم‌چنین باعث تولید اسیدهای آلی هم‌چون اسید اگزالیک و اسید سیتریک شوند. به علاوه، این سویه‌های بومی فعال نسبت به برخی از تغییرات محیطی از جمله دما، pH و غلظت‌های مختلفی از نمک کلرید سدیم مقاوم بوده و توانستند رشد و فعالیت خود را حفظ می‌کنند.

سپاسگزاری

از سرکار خانم دکتر فائزه حسامی بابت جمع‌آوری نمونه‌های خاک جهت انجام این مطالعه، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نیاز ضروری موجودات زنده به فسفر، استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات اعم از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به عنوان یک راهکار مناسب برای تامین فسفر و غلبه بر کمبود آن در چرخه حیات در نظر گرفته می‌شود. به طور کلی، پژوهش‌گران به گونه‌های میکروبی فعال در زمینه تولید اسیدهای آلی، فسفات‌ها و فیتازها و هم‌چنین تثبیت‌کننده‌های نیتروژن توجه به خصوصی داشته‌اند که بتوانند با دستیابی به گونه‌های بومی مناسب از آن‌ها در کاربردهایی چون کودهای زیستی برای گیاهان و پروبیوتیک‌ها برای دام و طیور استفاده نمایند. در این مطالعه، چند باکتری حل‌کننده فسفات جدا شده از خاک مزرعه گندم واقع در اطراف

منابع

1. Hii, Y.S., Chan, Y.S.S., Lau, S.W., and Danquah, M.K. 2020. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 26: 1-6.
2. Sharma, S.B., Trivedi, S.R., and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2: 1-14.
3. Appl, M. 1982. The haber-bosch process and the development of chemical engineering. In: Furter, W.F. (ed.) *A century of chemical engineering*. New York. Plenum. pp. 29-54.
4. You, M., Fang, S., MacDonald, J., Xu, J., and Yuan, Z. 2020. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. *Microbiological Research*. 233: 1-26.
5. Parnell, J.J., Berka, R., Young, H.A., Sturino, J.M., Kang, Y., Barnhart, D.M., and DiLeo, M.V. 2016. From the Lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-12.
6. Zhang, J., Feng, L., Ouyang, Y., Hu, R., Xu, H., and Wang, J. 2020. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in relation to phosphorus availability under different land uses for some latosols from Guangdong, China. *Catena*. 195: 1-7.
7. Kumar, A., Kumar, A., and Patel, H. 2018. Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 7: 1344-1347.
8. Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 7: 1-8.
9. Karpagam, T., and Nagalakshmi, P.K. 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 3: 601-614.
10. Motamedi, H., Aalivand, S.H., Varzi H.N., and Mohammadi, M. 2016. Screening cabbage rhizosphere as a habitat for isolation of phosphate-solubilizing bacteria. *Environmental Experimental Biology*. 14: 173-181.
11. Wang, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., Wang, Y., and He, 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.
12. Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E.U.B., Sadhana, B., and Vani, S. 2017. Phosphorous and phosphate solubilizing bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 6: 2133-2144.
13. Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*. 17: 362-370.
14. Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265-270.
15. Jiang, H., Wang, T., Chi, X., Wang, M., Chen, N., and Chen, M. 2019. Isolation and characterization of halotolerant phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing the peanut rhizosphere in salt-affected soil. *Geomicrobiology Journal*. 37: 110-118.
16. Zheng, B.X., Zhang, D.P., Wang, Y., Hao, X., Wadaan, M.A.M., Hozzein, W.M., Zho, Y.G., and Yang, X.R. 2019. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Scientific Reports*. 9: 1-9.
17. Maheswar, N.U., and Sathiyavani, G. 2012. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachishypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4: 4007-4011.

18. Olsen, S.R., and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. In: A.L. Page., R.H. Miller, and D.R. Keeney, (eds.) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbial Properties. 2nd Edition. American Society of Agronomy. Madison, WI. pp. 403-430.
19. Sudewi, S., Ala, A., Patandjengi, B., and Farid, M. 2020. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of local aromatic rice in Bada Valley Central Sulawesi, Indonesia. IOP Conference Series Earth and Environmental Science: 575: 1-10.
20. Gaur, A.C. 1990. Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers, Omega Scientific Publisher. New Delhi. 176p.
21. Buch, M.L., and Porter, W.L. 1952. Identification of organic acids on paper chromatograms. *Analytical Chemistry*. 24: 489-491.
22. Dobereiner, J., Day, J.M., and Dart, P.J. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum-Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology*. 71: 103-116.
23. Gupta, R., Kumari, A., Sharma, S.H., Alzahrani, O.M., Noureldeen, A., and Darwish, H. 2022. Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29: 35-42.
24. Lobo, C.B., Tomas, M.S.J., Viruel, E., Ferrero, M.A., and Lucca, M.E. 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*. pp. 12-25.
25. Blanco-Vargas, A., Rodriguez- Gacha, L.M., Sanchez- Castro, N.L., Jaramillo, R.G., Camacho, L.D.P., Pinales, R.A.P., Hoyos, C.M.R., Ariza, L.A.D., and Rodriguez, A.M.P. 2020. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 6: 1-12.
26. Behera, B.C., Yadav, H., Singh, S.K., Mishra, R.R., Sethi, B.K., Dutta, S.K., and Thatoi, H.N. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15: 169-178.
27. Chen, J., Zhao, G., Wei, Y., Dong, Y., Hou, L., and Jiao, R. 2021. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on Chinese fir seedlings. *Scientific Reports*. 11: 1-13.
28. Kour, D., Rana, K.L., Yadav, A.N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H.S., and Saxena, A.R. 2020. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 23: 1-11.
29. Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., AO, X., Liu, M., Yu, X., and Chen, Q. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*. 169: 76-82.
30. Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang, J., Gong, Y.X., and Yang, Y.F. 2010. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. *Aquaculture International*. 18: 1079-1091.
31. Islama, M.T., Deora, A., Hashidoko, Y., Rahman, A., Ito, T., and Tahara, S. 2007. Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR₂₉ of Bangladesh. *Z Naturforsch C Journal of Bioscience*. 62: 103-110.
32. White, C., Sayer, J.A., and Gadd, G.M. 1997. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiology Reviews*. 20: 503-516.
33. Reinhold, B., and Hurek, T. 1988. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. *Plant Soil*. 110: 259-268.

34. Rosado, A.S., Azevedo, F.S., Cruz, D.W., Elsas, V., and Seldin, L. 1998. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 216-226.
35. Janati, W., Benmrid, B., Elhaisoufi, W., Zeroual, Y., Nasielski, J., and Bargaz, A. 2021. Will Phosphate Bio-Solubilization Stimulate Biological Nitrogen Fixation in Grain Legumes? *Frontiers in Agronomy*. 3: 1-12.
36. Barrera, M.C., Schoenwandt, D.J., Gomez, M.I., Becker, M., Patel, A.V., and Ruppel, S. 2019. Salt stress and hydroxyectoine enhance phosphate solubilization and plant colonization capacity of *Kosakonia radicincitans*. *Journal of Advanced Research*. 19: 91-97.
37. Mahajan, S., Nandre, V.S., Salunkhe, R.C., Shouche, Y.S., and Kulkarni, M.V. 2020. Chemotaxis and physiological adaptation of an indigenous abiotic stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas stutzeri*: Amelioration of salt stress to *Cicer arietinum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 27: 1-9.
38. El Attar, I., Taha, K., El Bekkay, B., Khadie, M.E., Alami, I.T., and Aurag, J. 2019. Screening of stress tolerant bacterial strains possessing interesting multi-plant growth promoting traits isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 20: 1-9.
39. Emami, S., Alikhani, H.A., Pourbabaee, A., Etesamki, H., Motasharezadeh, B., and Sarmadian, F. 2020. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*. 14: 1-8.
40. Belimov, A.A., Kojemiakov, A.P., and Chuvarliyeva, C.V. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil*. 173: 29-37.
41. Wani, P.A., Khan, M.S., and Zaidi, A. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 170: 283-287.
42. Alori, E.T., Glick, B.R., and Babalola, O. 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-8.
43. Tang, A., Haruna, A.O., Majid, N.M., and Jalloh, M.B. 2020. Potential PGPR Properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*. 8: 1-22.

