مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

باکتری‌های حل‌کننده فسفات: جداسازی باکتری‌ها و ژن‌های رمزکننده حل‌کنندگی فسفات، مکانیسم و ژنتیک انحلال فسفات

محمدرضا ساریخانی*[1]، محمدعلی ملبوبی[2]، میترا ابراهیمی[3]

[1] استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2] دانشیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[3] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

تاریخ دریافت: 1390/07/16، تاریخ پذیرش: 1392/02/31

چکیده

فسفر یکی از عناصر غذایی مهم برای گیاهان می‌باشد که در خاک فراهمی کمی دارد. فسفر در خاک به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شود. باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه یا PGPR، باکتری‌های موجود در خاک و ریزوسفر گیاهان هستند که با سازوکارهای مختلف به رشد گیاه کمک می‌کنند. توانایی برخی ریزسازواره‌ها به منظور تبدیل فسفر نامحلول به شکل قابل استفاده مانند ارتوفسفات، ویژگی مهمی در PGPR می‌باشد که باعث افزایش عملکرد گیاهان می‌شود. گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Pantoea* و *Rhizobium* از قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات به شمار می‌آیند. سازوکار اصلی برای انحلال فسفات معدنی تولید اسیدهای آلی است و در انحلال اشکال فسفر آلی اسید فسفاتازها نقش اصلی را در خاک بازی می کنند. روش مرسوم در جداسازی این دسته از باکتری‌ها استفاده از منابع فسفاته معدنی و آلی کم محلول یا نامحلول در محیط کشت‌های مایع یا جامد می‌باشد، که از طریق پایش تولید فسفات آزاد شده و کاهش pH در محیط مایع یا مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها و تولید کلنی‌های رنگی (سبز ، آبی و زرد) در صورت استفاده از سوبستراهای رنگزا در محیط کشت جامد دنبال می‌شود. گر چه دانش ژنتیک انحلال فسفات هنوز اندک می‌باشد، چندین ژن رمزکنندهٔ فسفاتاز مشخص گردیده و همسانه‌سازی شده‌اند و تعدادی ژن درگیر در انحلال فسفات معدنی جداسازی شده است. روش‌های زیست‌شناسی مولکولی رویکردی مفید برای به دست آوردن و تشخیص سویه‌های PGPR کاآمد می‌باشد. انتقال و بیان ژن‌های درگیر در انحلال فسفات (فسفات آلی یا معدنی) در باکتری‌ها یا گیاهان یک راهکار جدید برای بهبود ظرفیت ریزسازواره‌ها به عنوان مایه تلقیح میکروبی است.

واژه‌های کلیدی: *باکتری‌های حل کننده فسفات، فسفاتاز، فیتاز، اسیدهای آلی*

*نویسنده مسئول: محمدرضا ساریخانی تلفن: 09173512394 Email: rsarikhani@yahoo.com

مقدمه

با افزایش روزافزون جمعیت، تامین غذا به عنوان یکی از مهمترین چالش‌های پیش رو خواهد بود. انقلاب سبز اگرچه توانست انسان را در تامین غذای مورد نیازش یاری دهد ولیکن با روند رو به رشد جمعیت و نیاز به مواد غذایی بیشتر، ضرورت نیاز به انقلاب سبز دیگری با تاکید بر رعایت اصول زیست محیطی و حفظ منابع و پایداری آنها بیشتر احساس می‌شود، به طوری که تا 20 سال آینده قادر به تامین افزایش 50 درصدی مواد غذایی باشد (Khan *et al.*, 2007). انقلاب سبز که با معرفی و عرضه کودهای شیمیایی شکل گرفت، در کنار افزایش تولید مخاطراتی را برای محیط زیست و بشر به دنبال داشت. لذا بشر را بر آن داشت که برای حفظ تولید و حفظ منابع پایه خود با پایه‌ریزی کشاورزی پایدار با تاکید بیشتری بر پتانسیل‌ها و توان‌های زیستی خاک از روش‌هایی استفاده نماید که با طبیعت سازگارتر باشد و تعادل زیست بومی خاک و محیط را حفظ نماید. در این رهگذر روی آوردن به کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی جایگزینی مناسب به نظر می‌رسد. در نیم قرن گذشته بیشترین توجه به باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت معطوف بوده است. اما در دو دهه اخیر استفاده از باکتری‌های مفید دیگر برای رفع نیازهای تغذیه‌ای و احیای فلور طبیعی خاک تحت عنوان مهندسی ریزوسفر نیز مورد علاقه پژوهشگران این رشته بوده است. کودهای زیستی فسفاته با توجه به اهمیت و نقش فسفر در تغذیه گیاه در این مقاله مورد بررسی قرار می‌گیرد. سعی می‌شود روش‌های جداسازی این دسته از باکتری‌ها و سازوکارهای درگیر در انحلال فسفات بیشتر مورد توجه قرار گیرد و در ادامه ژنتیک انحلال فسفات و ژن‌های درگیر در انحلال فسفات از دید زیست فناوری مورد بررسی قرار می‌گیرد.

1- فسفر در خاک و اهمیت آن برای گیاه

با وجود ترکیبات فسفاته فراوان در خاک، گیاهان فسفر مورد نیاز خود را به شکل آنیون فسفات ($H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{2-}) از محلول خاک جذب می‌کنند. بر خلاف نیتروژن که اتمسفر یکی از منابع عمده آن به شمار می‌رود این عنصر فاقد چنین منبعی می‌باشد (Ezawa *et al.*, 2002). این عنصر برخلاف عناصر پرمصرف دیگر دارای حداقل تحرک در خاک و گیاه است. توسعه ریشه، قوام ساقه، تشکیل گل و دانه، تشکیل میوه رسیدگی آن، تثبیت ازت در گیاهان لگوم، کیفیت محصول و مقاوم بودن به بیماری‌ها مواردی است که با تغذیه فسفر رابطه مستقیم دارند (Fageria, 2009). فسفر یکی از اجزاء ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای زیستی می‌باشد. فرایندهای اصلی بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز و تنفس به وسیله فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شود (Raghothama and Karthikeyan, 2005).

فسفر، تثبیت ازت را در گیاهان لگوم تحریک کرده و برای تولید قندها ضروری می‌باشد (Saber *et al*., 2005). تفاوت فاحشی بین میزان فسفر درون سلول‌های گیاهی (در حد میلی‌مولار، mM) و فسفر محلول در خاک (در حد میکرومولار، µM) وجود دارد. به طور میانگین اغلب عناصر معدنی موجود در محلول خاک در مقادیر میلی‌مولار موجودند، در حالی که فسفر در حد میکرومولار حضور دارد (Ozanne, 1980). البته فسفر در خاک‌ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان (Khan *et al*., 2007) و در محدوده $400–1200 mg\ kg^{-1}$ می‌باشد (Rodriguez and Fraga, 1999). غلظت فسفات محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است و مقدار آن $1\ mg\ kg^{-1}$ یا کمتر می‌باشد (Paul, 2007). سطوح بسیار پایین فسفات قابل جذب در ریزوسفر باعث می‌شود که این عنصر به عنوان یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای محدودکننده رشد در بسیاری از زیست بوم‌ها شناخته شود. تثبیت معدنی فسفات قابل استفاده در خاک و تشکیل کمپلکس‌های آلی از دلایل اولیه برای فراهمی کم این عنصر به شمار می‌رود (Raghothama and Karthikeyan, 2005). بزرگترین منابع فسفر در کره زمین، صخره‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دوران‌های زمین‌شناسی است (Rodriguez and Fraga, 1999; Paul, 2007). شکل غالب فسفات در شرایط قلیایی، تری‌کلسیم فسفات می‌باشد. سنگ‌های فسفات معدنی از قبیل فلوروآپاتیت[1] و فرانکولیت[2] از جمله منابع فسفات کلسیم می‌باشند که در خاک نامحلول بوده و تامین‌کننده نیاز گیاه نخواهند بود (Goldstein, 2000). پویایی فسفات در خاک تحت تاثیر فرایند فیزیکوشیمیایی (جذب[3] و واجذب[4]) و زیستی (غیرمتحرک شدن[5] و معدنی شدن[6]) است (Paul, 2007; Fageria, 2009). مقادیر عمده‌ای از فسفات که در قالب کود به خاک اضافه می‌شود تشکیل رسوب می‌دهد و از دسترس گیاه خارج می‌شود، این موضوع به واکنش‌پذیری بسیار بالای یون ارتوفسفات با کاتیون‌های فلزی از قبیل Al^{3+} و Fe^{3+} در شرایط خاک‌های اسیدی و با یون Ca^{2+} در خاک‌های خنثی تا آهکی مربوط می‌شود (Gyaneshwar *et al*., 2002; Hao *et al*., 2002 ; Norrish and Rosser, 1983; Lindsay *et al*., 1989). 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. در عمل بازدهی کودهای شیمیایی فسفاته بین 25–10 درصد می‌باشد (Isherword, 1998) و تقریباً 90–75 درصد آن در خاک در اثر واکنش با کاتیون‌های فلزی به صورت رسوب و غیرقابل استفاده گیاه تبدیل می‌شود (Stevenson, 2005)، از طرف دیگر انرژی لازم برای تولید سالانه

1- fluoroapatite
2- francolite
3- sorption
4- desorption
5- immobilization
6- mineralization

کودهای شیمیایی فسفاته چیزی بالغ بر 4 میلیارد دلار می‌باشد (Goldstein *et al*., 1993)، که با صرف هزینه بالایی همراه است. ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیشتر احساس می‌شود که بر این امر واقف گردیم که منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تامین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا 100 سال دارا می‌باشد (Goldstein *et al*., 1993)، و کافی است که این منبع عظیم فسفر را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. فراهمی زیستی[1] فسفر قابل جذب در خاک به نوع گیاه، شرایط و سطح تغذیه‌ای و فلور میکروبی خاک بستگی دارد (Khan *et al*., 2007). قسمت اعظم جمعیت میکروبی خاک در ریزوسفر می‌باشد و باکتری‌های حل‌کننده فسفات از نظر نوع و توزیع جمعیت در شرایط خاک‌های مختلف فرق می‌کند و جمعیت آن به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، میزان ماده آلی و مقدار فسفر آن و عملیات کشاورزی بستگی دارد.

2- PGPR[2] و باکتری‌های حل‌کننده فسفات

جامعه میکروبی خاک حاصلخیزی آن را از طرق تجزیه، معدنی کردن، ذخیره‌سازی و رهاسازی عناصر غذایی تحت تاثیر قرار می‌دهند. با توجه به آزادسازی حدود 40 درصد از مواد فتوسنتزی در ریزوسفر گیاه، این محیط شرایط مساعدی را برای حضور جمعیت میکروبی فراهم نموده است، باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه یا PGPRها شامل باکتری‌های احاطه‌کنندهٔ ریشه‌اند که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. امروزه PGPRها به عنوان زاد مایه[3] میکروبی به شکل کودهای زیستی و یا کنترل‌گرهای زیستی استفاده می‌شوند (Ping and Boland, 2004). سازوکارهایی که به وسیله آن PGPRها بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند به اثرات مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می‌شود. اثر غیرمستقیم بیشتر از طریق تولید متابولیت‌هایی میکروبی است که اثر منفی بر عوامل بیماریزا دارند از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، سایدروفورها[4] یا HCN و با ممانعت از رشد ریزسازواره‌های بیماریزا باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Rodriguez and Ramesh kumar *et al*., 2002; Fraga, 1999 Timmusk and Wagner, 1999;). اما اثر مستقیم آنها می‌تواند از راه‌های سنتز هورمون‌های گیاهی[5]، تسهیل جذب عناصر غذایی، تثبیت ازت، کاهش پتانسیل غشاء[6] ریشه‌ها، سنتز برخی آنزیم‌هایی (از قبیل ACC deaminase) که سطح هورمون‌های گیاهی را تعدیل می‌کنند (Rodriguez and Fraga, 1999) و همچنین انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی به شکل قابل استفاده برای گیاهان باشد (Rodriguez and Fraga, 1999; Timmusk and Wagner, 1999). مدارکی مبنی بر نقش ریزسازواره‌های ریزوسفری در انحلال فسفات معدنی در سال 1903 ارائه

1- bioavailibility
2- Plant Growth Promoting Rhizobacteria
3- inoculant
4- siderophore
5- phytohormones
6- membrane potential

شده است (Illmer and Schinner, 1992). ریزسازواره‌ها از طریق معدنی کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب یافته، فراهم‌سازی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند (Chen *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2002; Pradhan and Sukla, 2005). این دسته از ریزسازواره‌ها 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. باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار موثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (Alam *et al.*, 2002)، به طوری که Fallah (2006) جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات را 88 درصد جامعه میکروبی در خاک‌های شمال ایران گزارش کرد. گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات را عنوان کردند. در بین باکتری‌هایی با این قابلیت، جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Rhizobium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Achromobacter* و *Flavobacterium* مشاهده می‌شود. جمعیت‌های قابل توجهی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک و در ریزوسفر گیاه وجود دارد که شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی با غالبیت گونه‌های هوازی است، همچنین جمعیت آنها در ریزوسفر در مقایسه با خاک غیرریزوسفری به مراتب بیشتر بوده است (Rodriguez and Fraga, 1999; Whitelaw, 2000). باکتریهای *B. megaterium*، *B. circulans*، *B. subtilis*، *B. polymixa*، *B. sircalmous*، *P. striata* و *Enterobacter* می‌توانند به عنوان مهمترین گونه‌های شناخته شده معرفی شوند (Subba Rao, 1988; Kucey *et al.*, 1989). باکتری‌های حل‌کننده فسفات به عنوان کود زیستی[1] از سال 1950 مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kudashev, 1956; Krasilinikov, 1957). رابطه بین گیاهان و باکتری‌های حل‌کننده فسفات به عنوان یک رابطه هم‌افزایی یا تشدید شونده[2] در طبیعت شناخته می‌شود. زیرا از یک سو باکتری فسفات محلول را برای گیاه فراهم می‌کند و از سوی دیگر، گیاه از طریق ترشحات ریشه خود ترکیبات کربنه مورد نیاز (عمدتاً قندها) را برای رشد باکتری آزاد می‌کند (Pérez *et al.*, 2007). استفاده همزمان باکتری‌های حل‌کننده فسفات با سایر میکروفلور مفید ریزوسفری از قبیل قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت رشد گیاهان را در مقایسه با زمانی که آنها به تنهایی استفاده می‌شوند بیشتر تحریک می‌کند (Zaidi *et al.*, 2003; Perveen *et al.*, 2002; Belimov *et al.*, 1995). همکاری ریزسازواره‌های موجود در ریزوسفر گیاهان می‌تواند موجب بهبود جذب فسفات‌های در دسترس و همچنین فراهم ساختن منابع فسفات تثبیت شده برای گیاه شود. میزان فراهم‌سازی فسفات توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات از منابع معدنی و آلی فسفات به ترتیب

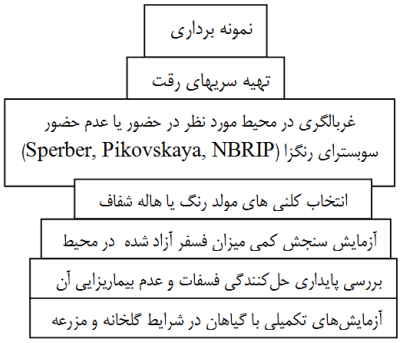
1- biofertilizer
2- synergistic

در محدوده 25-42 $\mu g\ ml^{-1}$ و 8-18 $\mu g\ ml^{-1}$ متغیر بوده است (Tao *et al.*, 2008). Ghaderi *et al* (2008) در بررسی اثر حل‌کنندگی و رهاسازی فسفات در سه باکتری *P. putida*، *P. fluorescens* Chao و *P. fluorescens* Tabriz مقادیر آزاد شده فسفر را از هیدروکسید آهن (III)، 51، 29 و 62 درصد گزارش دادند و بیشترین مقدار فسفر آزاد شده $14/8\ \mu g\ ml^{-1}$ بود. این در حالی است که *P. striata* و *B. polymixa* به ترتیب $156\ \mu g\ ml^{-1}$ و 116 فسفر را آزاد ساختند (Rodríguez and Fraga, 1999). *P. fluorescens* از منابع تری‌کلسیم فسفات، فسفات آلومنیم و فسفات آهن به ترتیب مقادیر $100\ \mu g\ ml^{-1}$، 92 و 51 آزاد ساخت (Khan *et al.*, 2009). اخیراً انحلال فسفات به میزان $120\ \mu g\ ml^{-1}$ و 150 برای دو باکتری *P. agglomerans* P5 و *P.putida* P13 نیز گزارش شده است (Malboobi *et al.*, 2009a). گرچه مقایسه کمّی درستی نمی‌توان از آزمایشات صورت گرفته در منابع مختلف انجام داد، اما اطلاعات نشان می‌دهد که گونه‌های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *ریزوبیوم* قویترین حل‌کنندگان فسفات هستند و تری‌کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با سنگ فسفات تجزیه‌پذیرتر می‌باشند (Rodriguez and Fraga, 1999).

3- روش شناسایی و جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

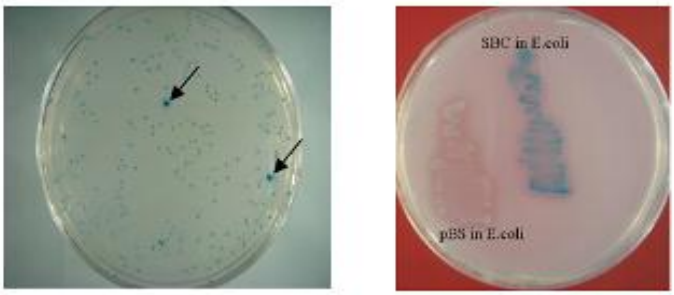
باکتری‌های حل‌کننده فسفات را می‌توان به طریق تهیه سری‌های رقت[1] یا روش‌های کشت‌های غنی شده[2] از نمونه‌های خاک ریزوسفری، غیر ریزوسفری و همچنین از مناطق رسوبات سنگ‌های فسفاته جداسازی نمود (Khan *et al.*, 2009). به خاطر عدم پایداری ویژگی حل‌کنندگی فسفات برخی از باکتری‌ها، دوام و پایداری توان حل‌کنندگی آنها با کشت‌های مجدد مورد آزمایش قرار می‌گیرد (Illmer and Schinner, 1992). معمولاً جداسازی اولیه در محیط جامد انجام گرفته و توانایی آن در انحلال فسفات در محیط مایع آزمایش شده و بعد از انتخاب باکتری حل‌کننده فسفات کارآمد، زادمایه آن تهیه می‌شود و در شرایط آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای آزمایش‌های تکمیلی بر روی آن در حضور گیاهان مختلف انجام می‌گیرد. این مراحل به صورت خلاصه در شکل 1 آورده شده‌اند.

1- serial dilution
2- enrichment culture techniques



شکل 1- مراحل نمونه‌برداری و غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات به همراه آزمایش‌های تکمیلی جهت انتخاب سویه‌های کارآمد (از بالا به پایین).

Figure 1- The steps of sampling and screening of PSB in order to determine the high efficeint strains.



شکل 2- تولید هاله شفاف و کلنی آبی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات در محیط غربالگری. در شکل سمت راست تولید هاله شفاف توسط باکتری *E. coli* و تولید هاله شفاف و کلنی رنگی (آبی) در یکی از همسانه‌های مثبت در همین میزبان مشاهده می‌شود. در شکل سمت چپ غربالگری کتابخانه ژنومی سویه‌ای با فعالیت فسفاتازی بالا (*P. putida* P13) به منظور پایش در حضور سوبسترای رنگی BCIP مشاهده می‌شود، این کتابخانه در سویه میزبان *E. coli* DH5α ساخته شده است (Sarikhani *et al.*, 2011).

Figure 2- Production of clear zone and blue colony by PSB in the screening medium. The production of clear zone in *E. coli* and blue phenotype of this bacterium which contatining a phosphatase gene (the right picture). Genomic library screening of a strain with high phosphatase activity (*P. putida* P13) was shown in presence of chromogenic substarte (BCIP). The library has been constructed in *E. coli* DH5α (the left picture) (Sarikhani *et al.*, 2011).

با توجه به این که سازوکار انحلال فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی و تولید آنزیم‌های فسفاتاز (مانند فیتاز) می‌باشد. محیط اختصاصی برای غربالگری فنوتیپی این باکتری‌ها با استفاده از این سازوکار طراحی شده‌اند به صورتی که با حذف هر گونه منبع فسفات قابل استفاده و محلول در محیط کشت از جایگزین‌های مناسب و نامحلول ترکیبات فسفات معدنی یا آلی (از قبیل تری‌کلسیم فسفات یا فیتات سدیم و فیتات کلسیم) استفاده کرده‌اند. در این رابطه به محیط کشت حداقل مانند Sperber و Pikovskaya می‌توان اشاره داشت (Pikovskaya, 1948).

تشخیص چشمی[1] و حتی برآورد نیمه کمی توانایی انحلال فسفات ریزسازواره‌ها به وسیله غربالگری در پلیت[2] امکان‌پذیر است که در آن تولید منطقه شفاف[3] در اطراف کلنی‌های میکروبی (شکل 2) در محیط کشت حاوی ترکیبات فسفات نامحلول (به عنوان تنها منبع فسفر) مورد بررسی قرار می‌گیرد. این روش به روش هالو[4] نیز معروف است. همچنین روش بهبود یافته‌ای با استفاده از محیط حاوی بروموفنل بلو[5] ارائه شده است که در این محیط، رنگ آبی در اطراف کلنی‌ها به دلیل کاهش pH در نتیجه آزادسازی اسیدهای آلی، بی‌رنگ می‌شود (Rodriguez and Fraga, 1999; Nautiyal 1999; Mehta and Nautiyal 2001; Oliveira *et al*., 2009). با توجه به ایراداتی که برای روش مشاهده منطقه شفاف در اطراف کلنی در محیط Pikovskaya (PKV) گرفته می‌شود (به عنوان نمونه برخی از باکتریهای فاقد هاله شفاف بعضاً حل‌کنندگان فسفات خوبی در محیط‌های مایع می‌باشند)، Nautiyal (1999) محیط جدیدی را به نام (NBRIP) ارائه داد، وی معتقد است که این روش سه برابر در مقایسه با PKV کارآمدتر است.

از آن جهت که فسفاتازها و فیتازها به عنوان آنزیم‌های درگیر در معدنی کردن فسفات آلی شناخته می‌شوند، یکی از راه‌های جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ارایه روش‌ها و راهکارهایی برای دست یافتن به باکتری‌هایی با فعالیت فسفاتازی و فیتازی بالاست (Gargova *et al*., 1997; Shieh and Ware, 1968; Chen, 1998; Bae *et al*., 1999; Senn and Wolosiuk, 2005). استفاده از روش‌های فوق یا حتی روش‌های تلفیقی از قبیل کشت باکتری در محیط جامد در حضور فسفات معدنی یا آلی نامحلول یا کم محلول و پایش تولید هاله شفاف در اطراف کلنی و همچنین استفاده از سوبستراهای رنگزا[6] از قبیل BCIP (5- برومو 4- کلرو 3- ایندولیل فسفات) و پایش تولید کلنی‌های آبی (شکل 2) به دلیل فعالیت فسفاتازی (Malboobi *et al*., 2009a; Gibson *et al*., 1988) و در نهایت بررسی توان حل کنندگی فسفات و میزان آزادسازی فسفات توسط باکتری

1- visual detection
2- plate screening method
3- clear zone
4- halo method
5- bromophenol blue
6- chromogenic

در محیط‌های مایع (Mehta and Nautiyal 2001; Malbooi *et al*, 2009a; Ghaderi *et al*, 2008) و انجام آزمایش‌های تکمیلی با گیاه در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای منجر به جداسازی نمونه‌های کارآمدی از این قبیل باکتری‌ها شده است (Malbooi *et al*, 2009b). Richardson and Hadobas (1997) در یک مطالعه اقدام به جداسازی باکتری‌های موجود در خاک نمودند که قادر به استفاده از اینوزیتول هگزافسفات[1] (IHP) یا فیتات به عنوان یک منبع فسفات آلی بودند. آنالیز 200 نمونه انتخابیِ تصادفی نشان داد که کمتر از 0/5 درصد جمعیت کشت شده از باکتری‌ها قادر به استفاده از IHP به عنوان منبع کربن و فسفر هستند. در ادامه مطالعه آنها منجر به شناسایی 4 ریزسازواره از سودوموناس‌های فلورسنت (*P. putida* CCAR53 و *P. putida* CCAR59) یا غیر فلورسنت (*P. mendocina* CCAR60 و *P. mendocina* CCAR31) شد. سودوموناس‌های فلورسنت فعالیت فیتازی قابل توجهی از خود نشان دادند و بیشتر از 81 درصد فسفات را از IHP در حضور یا عدم حضور آرابینوز به عنوان منبع کربنِ اضافی آزاد ساختند. این در حالی است که سویه‌های غیر فلورسنت تنها در حضور آرابینوز قادر به آزادسازی فسفر از IHP بودند.

بایستی در نظر داشت که حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری‌ها به عوامل مختلفی وابسته است مثلاً به نوع منبع نیتروژنی ارتباط دارد و زمانی که در محیط از نمک آمونیم استفاده می‌شود به دلیل تبادل پروتون و کاهش pH محیط در مقایسه با استفاده از نمک نیتراته، فسفر بیشتری آزاد می‌شود (Roos and Luckner, 1984)، در برخی موارد هم خلاف این امر گزارش شده است (Reyes *et al*., 1999) در مطالعات جداسازی باکتری حل‌کننده فسفات، مشاهده شده که باکتری در کشت‌های مجددی[2] که از آن تهیه می‌شود، فعالیت حل‌کنندگی فسفات را از دست می‌دهد، بر همین اساس در جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات تاکید زیادی بر تکرار آزمایش و مشاهده پایداری رفتار حل‌کنندگی آن می‌شود.

4- سازوکارهای انحلال فسفات

4-1- انحلال فسفات معدنی

فعالیت انحلال فسفات معدنی به توانایی ریزسازواره‌ها در آزاد کردن متابولیت‌هایی از قبیل ترشح یون هیدروژن یا پروتون (H^+) و اسیدهای آلی مربوط می‌شود (Surange *et al*., 1995; Nahas, 1996; Dutton and Evans, 1996). برخی معتقدند که اسیدهای آلی و معدنی با گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل خود کاتیون‌های همراه آنیون فسفات (Al^{3+}, Fe^{3+}, Ca^{2+}) را کلات نموده و به این طریق نیز به انحلال فسفات کمک می‌کنند (Kpomblekou and Tabatabai, 1994; Stevenson, 2005; Omar, 1998) همچنین برخی اعتقاد دارند که انحلال فسفات نتیجه تبادل آنیونی PO_4^{3-} با آنیون اسید آلی می‌باشد (Omar, 1998).

1- inositol hexaphosphate

2- sub-culture

مطالعه بـر روی تولیـد اسـیدهای آلـی اغلـب در محیط‌های مایع صورت پذیرفته و با روش‌هایی از قبیـل کروماتوگرافی کاغـذی[1] یـا لایـه نـازک کروماتوگرافی یـا بـه وسـیله HPLC[2] و برخـی روش‌های آنزیمی مشخص صورت گرفتـه اسـت (Gyaneshwar *et al*., 1998). در بـین اسـیدهای آلی مختلف به نظـر مـی‌رسـد اسـید گلوکونیـک غالـب‌تـرین و مهمتـرین اسـید تولیـدی در باکتری‌های گرم منفی باشـد (Goldstein *et al*., 1993; Kim *et al*., 1998). تولید این اسـید آلـی توسـط بـاکتری‌هـایی نظیـر *Pseudomonas sp*.، *Erwinia herbicola*، *P. cepacia*، *Azospirillum spp*، *R. leguminosarum*، *R. meliloti*، *B. firmus* و *Burkholderia cepacia* گـزارش شـده اسـت (Rodriguez *et al*., 2004; Rodriguez and Fraga, 1999). سویه‌هـایی از *B. liqueniformis* و *B. amyloliquefaciens* یافـت شـده‌انـد کـه مخلـوطی از اسـیدهای اسـتیک، لاکتیـک، ایزووالریک و ایزوبوتیریک را تولید می‌کنند. دیگر اسیدهای آلی از قبیل اسید سوکسینیک، مالونیـک، اکسـالیک و گلـی‌کولیـک همچنـین در بـین حـل‌کننـدگان فسـفات مشـخص شـده اسـت (Rodriguez and Fraga, 1999).

احتمال‌های جایگزین بـه غیـر از اسـیدهای آلی به منظور انحلال فسفات معدنی بـا توجـه بـه فقدان رابطه خطی بین pH و مقدار انحلال فسـفر پیشنهاد شده است (Subba Rao, 1982). توانـایی کلات‌کنندگی اسیدهای آلی مهم می‌باشد، چنان که افـزودن 0.05M EDTA بـه محـیط منجـر بـه آزادسازی فسفر در محـیط شـد (Kucey, 1988). سـازوکارهـای دیگـری از قبیـل تولیـد مـواد کلات‌کننده به وسیله ریزسازواره‌ها، همچنین تولید اسیدهای معدنی از قبیل اسید سولفیدریک، اسـید نیتریک، اسید کلریدریک و اسید کربنیک نیز ارائه شده است. به هر حال، تاثیر ایـن فراینـدها جـای سوال است و به نظر می‌رسـد کـه سـهم آنهـا در آزادسازی فسفرِ خاک قابل صرف نظر کردن باشد (Rodriguez and Fraga, 1999). اسـیدهای معدنی مانند اسید کلریدریک در مقایسه بـا اسـید های آلی در pH یکسان کارایی کمتری در انحلال فسفات از خـود نشـان مـی دهنـد (Kim *et al*., 1998). یکی دیگر از این سازوکارها، پایین آوردن pH ریزوسفر مـی‌باشـد کـه از راه تولیـد زیسـتی پروتون[3] و رهاسـازی بیکربنـات در تبـادل گـازی (O_2/CO_2) رخ می‌دهد.

انحلال فسفات معدنی نتیجه اثرات ترکیبـی کاهش pH خـاک و تولیـد اسـیدهای آلـی اسـت (Fankem *et al*., 2006). ریزسـازواره‌هـای حل‌کننده فسفات از طریـق تولیـد اسـیدهای آلـی متفاوت همانند اسیدهای کربوکسیلیک[4] (Deubel and Merbach, 2005) و سـازوکارهای کـاهش pH ریزوسفر (He and Zhu, 1988) فسفات‌هـای موجود در مواد فسفردار مختلف را آزاد می‌کننـد.

1- paper chromatography
2- High Performance Liquid Chromatography
3- biotical production of proton
4- carboxylic acid

با این وجود ظرفیت بافری[1] خاک کارایی حل‌کنندگان فسفات را در رهاسازی فسفات از فسفات کلسیم کاهش می‌دهد (Stephen and Jisha, 2009). اسیدهای کربوکسیلیک اساساً فسفات پیوند یافته با آهن و آلومینیم (Al-P و Fe-P) را از طریق تبادل آنیونی[2] یون فسفات با آنیون اسیدی رها می‌سازند یا از طریق کلات[3] نمودن یون‌های آهن و آلومینیم همراه فسفات (Omar, 1998) یا کاهش pH و یا رقابت آنیون اسید آلی با آنیون فسفات در جذب شدن در سطوح جذبی خاک (Nahas, 1996) به انحلال فسفات کمک می‌کنند.

قدرت اسیدهای آلی در کلات کنندگی کاتیون‌های فلزی شدیداً به ساختار مولکولی به ویژه به تعداد گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل آن برمی‌گردد. نوع و موقعیت لیگاند[4] علاوه بر قدرت اسید[5] توانایی و کارآیی آن را در فرایند انحلال فسفات تعیین می‌کند (Kpomblekou and Tabatabai, 1994). پتانسیل رهاشدن فسفر از آنیون‌های کربوکسیلیک با کاهش ثابت پایداری کمپلکس آنیون آلی- Al یا آنیون آلی- Fe به ترتیب زیر کم می‌شود (Ryan *et al.*, 2001).

citrate > oxalate > malonate / malate > tartrate >lactate > gluconate > acetate > formiate

با توجه به این که در انحلال فسفات علاوه بر اسیدهای آلی، آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز نیز دخالت دارند، برای مشخص نمودن عامل انحلال فسفات از تیمار با پپسین (یک نوع پروتئاز می‌باشد) یا استون (حذف پروتئین یا آنزیم) و باز NaOH (خنثی کننده اسید) استفاده می‌شود. در صورت تیمار با عوامل از بین برنده آنزیم اگر آزادسازی فسفر تغییری نیابد، نشان می‌دهد که فرایند درگیر در انحلال فسفات غیرآنزیمی بوده و به تولید اسیدهای آلی یا معدنی مربوط می‌شود. اگر انحلال فسفات در صورت تیمار با باز متوقف شود، نشان دهنده آن است که عامل انحلال فسفات، اسید آلی می‌باشد (Rodriguez and Fraga, 1999). براساس این یافته‌ها همسانه‌سازی[6] ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات معدنی دنبال شد. Goldstein (1994, 1995) پیشنهاد کرده است که اکسایش گلوگز به اسیدگلوکونیک و اغلب اسید2-کتوگلوکونیک پایه متابولیکی فنوتیپ‌های حل‌کننده فسفات معدنی در برخی از باکتری‌های گِرم منفی می‌باشد.

4-2- معدنی شدن فسفر آلی

ترکیبات فسفر آلی از قبیل اسیدفیتیک ممکن است 80-20 درصد فسفر خاک را به خود اختصاص دهد (Raghothama and Karthikeyan, 2005)، گرچه محدوده تغییر آن بین 90-4 درصد نیز گزارش شده است. تقریباً نیمی از ریزسازواره‌های موجود در خاک و ریشه گیاهان با فعالیت فسفاتازی خود فسفر آلی را معدنی می‌نمایند (Cosgrove, 1967; Tarafdar

1- buffering capacity
2- anion exchange
3- chelation
4- ligand
5- acid strength

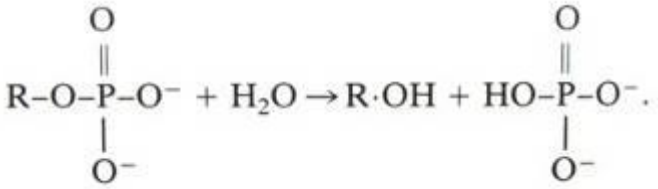
6 - cloning

et al., 1988). فسفاتازهای اسیدی و قلیایی فسفات آلی را به عنوان یک سوبسترا به شکل معدنی تبدیل می‌نمایند (Beech *et al.*, 2001). گرچه سازوکار اصلی در معدنی شدن فسفات آلی خاک تولید اسید فسفاتازهاست (Rodriguez *et al.*, 2000a). علاوه بر آن، رهاسازی آنیون آلی و تولید سایدروفورها (Yadaf and Tarafdar, 2001) می‌توانند فسفر آلی خاک را هیدرولیز نمایند. تجزیه‌پذیری فسفر آلی اساساً به خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکوشیمیایی مولکول‌ها وابسته است. به عنوان نمونه، اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و قندهای فسفاته به راحتی تجزیه می‌شوند، در حالی که اسید فیتیک، پلی‌فسفات‌ها به آرامی تجزیه می‌شوند (Rodriguez and Fraga, 1999). فسفر می‌تواند از ترکیبات آلی موجود در خاک به وسیله 3 گروه آنزیمی آزاد شود. 1- فسفاتازهای غیر اختصاصی، که دِفسفریلاسیون پیوندهای فسفو-استر یا فسفوانیدرید در مواد آلی را دنبال می‌کنند 2- فسفاتازهای اختصاصی مانند فیتازها که باعث آزاد شدن فسفر از فیتات می‌شوند 3- فسفوناتاز[1] و C-P لیازها. گرچه از نظر توالی ژنی و پروتئینی این تقسیم‌بندی صحیح نمی‌باشد، اما در عمل می‌توان گفت که فعالیت اصلی معدنی شدن فسفر آلی بر عهده دو گروه اول می‌باشد (Rodriguez *et al.*, 2006). واکنش‌های دِفسفریله شدن شامل هیدرولیز پیوندهای فسفواستر یا فسفوانیدرید می‌باشد (شکل 3). فسفوهیدرولازها به اسیدی و قلیایی تقسیم‌بندی می‌شوند. فسفوهیدرولازهای اسیدی بر خلاف فسفاتازهای قلیایی، در pHهای اسیدی تا خنثی فعالیت‌های کاتالیتیکی بهینه نشان می‌دهند. بعلاوه، آنها با توجه به اثرگذاری بر روی سوبسترای خاص می‌توانند به اسیدفسفاتازهای ویژه و غیرویژه تقسیم‌بندی شوند. فسفوهیدرولازهای ویژه با فعالیت‌های متفاوت شامل ´3-نوکلئوتیدازها و ´5-نوکلئوتیدازها، هگزوزفسفاتازها و فیتازها می‌باشد. یک گروه خاص از آنزیم‌های آزادکننده فسفات آن دسته‌ای هستند که قادر به شکستن پیوندهای C-P از ارگانوفسفات‌ها هستند. علاوه بر فسفاتازهای داخل سلولی، برخی از فسفوهیدرولازها به خارج از غشاء سلول ترشح می‌شوند و برخی هم متصل به غشاء باقی می‌مانند. این موقعیت قرارگیری به آنها اجازه می‌دهد که به عنوان آنزیم‌های پذیرندهٔ فسفواسترهای آلی عمل نمایند که دارای وزن مولکولی بالا بوده (مثل DNA و RNA) و قادر به عبور از غشاء سیتوپلاسم نمی‌باشند. این مواد ابتدا به ترکیبات با وزن مولکولی کم تبدیل می‌شوند و این فرایند ممکن است با تبدیل DNA و RNA به نوکلئوزید مونوفسفاتها به واسطه DNase و RNase همراه با آزاد ساختن فسفر و محصولات جانبی آلی از طریق فسفوهیدرولازها باشد (Rodriguez & Fraga, 1999). هر دو نوع آنزیم فسفاتاز اسیدی (با pH بهینه 6/5-4 برای فعالیت) و فسفاتاز قلیایی (با pH بهینه 10-9 برای فعالیت) در خاک شناسایی شده‌اند. براساس

1- 3-phosphonatase

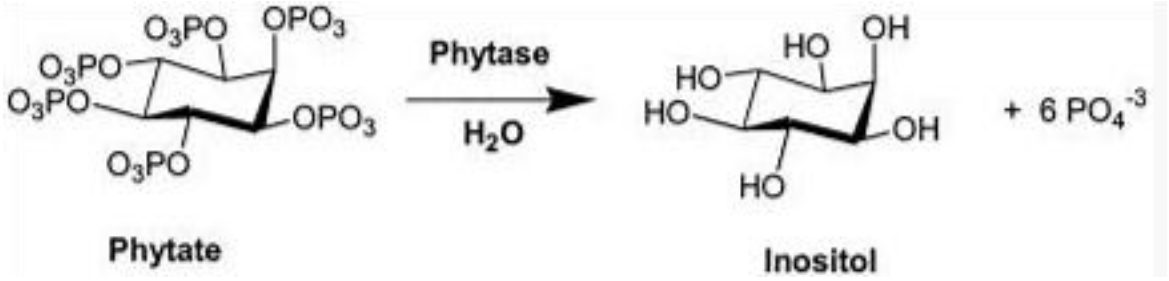
یافته‌ها فسفاتاز اسیدی در خاک‌های اسیدی و فسفاتاز قلیایی در خاک‌های قلیایی غالب است. دمای بهینه در محدودهٔ 60-40 درجه سلسیوس مشخص شده است، اگرچه اغلب اندازه‌گیری‌ها در دمای 37 درجه صورت پذیرفته است (Alef *et al*., 1995).

فیتازها (*myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolase) متعلق به گروه خاصی از فسفومونواسترازها هستند که قادر به رهاسازی فسفر از فیتات می‌باشند (Lei and Poress, 2003; Greiner *et al*., 2002). اسید فیتیک اولین بار در سال 1903 کشف شد و نمک‌های آن به نام فیتات مشهور می‌باشد (Mullaney and Ullah, 2005; Vohra and Satyanarayana, 2003)، فیتات‌ها از جمله اشکال فسفر آلی می‌باشند که در حدود 80-50 درصد فسفر موجود در بقایای گیاهی را به خود اختصاص می‌دهند (Vohra and Satyanarayana, 2003; Haefner *et al*., 2005). در شکل 4 رهاسازی فسفات از مولکول فیتات توسط آنزیم فیتاز نمایش داده شده است. سازوکارهای درگیر در انحلال فسفات معدنی و معدنی نمودن فسفات آلی در شکل 5 خلاصه شده است.



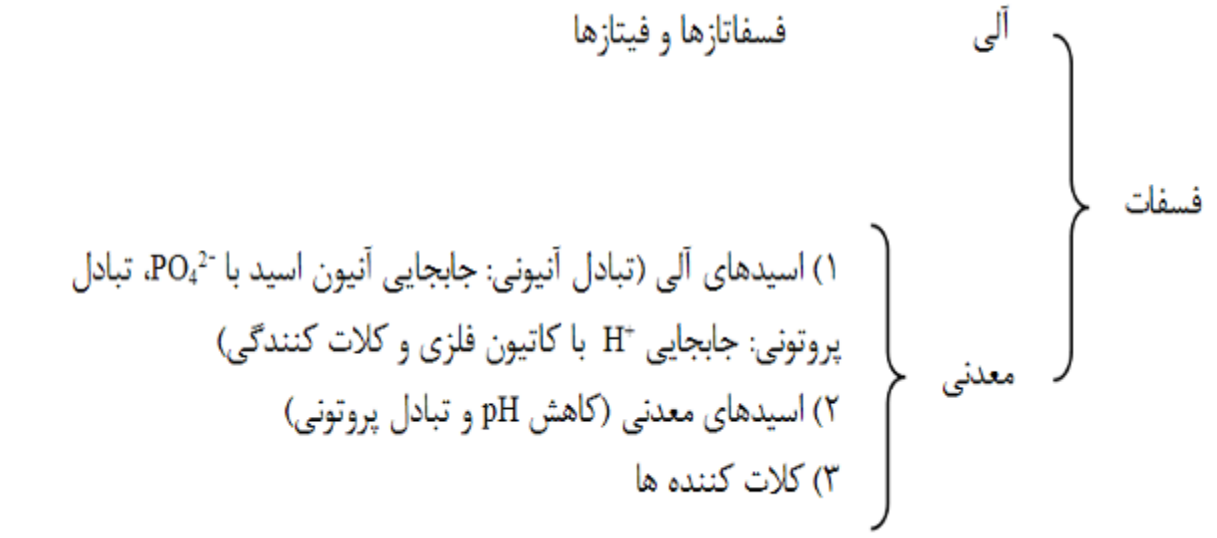
شکل 3- هیدرولیز سوبسترای فسفردار در حضور آنزیم فسفاتاز.

Figure 3- Hydrolysis of phosphorylated substrate in presence of phosphatase enzyme.



شکل 4- هیدرولیز فیتات در حضور آنزیم فیتاز.

Figure 4- Hydrolysis of phytate in presence of phytase enzyme.



شکل 5- سازوکارهای درگیر در انحلال فسفات معدنی و معدنی شدن فسفات آلی (استنتاج از Roderiquez and Fraga, 1999).

Figure 5- Different mechanisms in solubilizing inorganic phosphate and mineralization of organic phosphate (Roderiquez and Fraga, 1999).

5- ژنتیک باکتری‌های حل‌کننده فسفات

5-1- ژنتیک انحلال فسفات معدنی

پایه ژنتیک انحلال فسفات معدنی به عبارت دیگر فنوتیپ‌های (MPS^+)[1] به خوبی مشخص نشده است. زیرا تولید اسیدهای آلی سازوکار اصلی برای انحلال فسفات معدنی در نظر گرفته می‌شود، ولی می‌توان فرض نمود هر ژنی که در سنتز اسیدهای آلی درگیر است در این رفتار نقش داشته باشد. برخی از ژن‌های درگیر در گونه‌های مختلف شناسایی شده‌اند که در جدول 1 آورده شده است. اولین بار در سال 1987 ژنی از *Erwinia herbicola* که در انحلال فسفات معدنی درگیر است به کمک غربالگری نوترکیب های[2] مقاوم به آنتی‌بیوتیک از کتابخانه ژنومی[3] در محیطی حاوی هیدروکسی آپاتیت به عنوان تنها منبع فسفر، همسانه سازی شد. بیان این ژن منجر به تولید اسید گلوکونیک و فعالیت انحلال فسفات معدنی در *E. coli* HB101 شد. توالی‌یابی این ژن دخیل بودن احتمالی آن را در سنتز PQQ[4] مشخص ساخت که یک فاکتور ضروری برای تشکیل هالوآنزیم[5] گلوکز دهیدروژناز (GDH) می‌باشد. آنزیم GDH-PQQ تشکیل اسید گلوکونیک از مسیر اکسیداسیون مستقیم گلوکز را کاتالیز می کند. *E. coli* قادر به تولید GDH می‌باشد ولی نمی‌تواند PQQ را

1- Mineral phosphate solubilization

2- recombinants
3- Genomic library
4- Pyrroloquinoline quinine
5- holoenzyme

بسازد، بنابراین اسید گلوکونیک تولید نمی‌شود (Rodriguez and Fraga, 1999; Rodriguez *et al.*, 2006).

با اتخاذ رویکردی مشابه، ژن دیگری در ارتباط با انحلال فسفات معدنی از *P. cepacia* جداسازی شد. ابراز این ژن *gab*Y که منجر به ایجاد یک فنوتیپ حل‌کننده فسفات معدنی از طریق تولید اسیدگلوکونیک در باکتری *E. coli* JM109 شد، هیچ‌گونه مشابهت ظاهری با ژن همسانه شدهٔ سنتز کنندهٔ PQQ نداشت. ژن *gab*Y توانست یک نقش جایگزین در بیان و یا تنظیم مسیر اکسیداسیون مستقیم در *P. cepacia* بازی کند (Rodriguez and Fraga, 1999). به نظر می‌رسد سایر ژن‌های جداسازی شدهٔ مرتبط با فنوتیپ‌های MPS تنها محدود به pqqDNA و ژن‌های سنتزکننده *gab* نباشد. قطعه DNA ژنومی از باکتری *Enterobacter agglomerans* فعالیت MPS در *E. coli* JM109 نشان داد، اگر چه pH محیط تغییر نیافت. این نتایج نشان می‌دهد که تولید اسید روش مهمی است اما تنها سازوکار درگیر در انحلال فسفات به وسیله باکتری‌ها نمی‌باشد. جداسازی ژن رمز کننده فسفوانول پیرووات‌کربوکسیلاز *pcc* موجود در Synechococcus PCC7942، نشان می‌دهد که در MPS دخالت دارد (Rodriguez *et al.*, 2006).

در مطالعه دیگری که توسط Rodriguez *et al.* در سال 2000 انجام شد، ژن سنتزکننده PQQ را که در انحلال فسفات معدنی درگیر است، از باکتری *Erwinia herbicola* به دو گونه باکتری *Burkholderia cepacia* IS-16 و *Pseudomonas sp.* PSS انتقال یافت. در ادامه بیان و ابراز این ژن را در دو باکتری مذکور که به عنوان کودهای زیستی در کشور کوبا مورد استفاده قرار می‌گیرند، مطالعه کرده و ارتباط آنها را با افزایش قابلیت MPS بررسی نمودند (Rodriguez *et al.*, 2000b).

در پژوهشی Yong Kim *et al.* (1998) موفق به همسانه‌سازی ژن درگیر در انحلال فسفات معدنی از باکتری *Rahnella aquatilis* شدند. این باکتری از جمله باکتری‌های گِرم منفی بوده و تثبیت‌کنندهٔ ازت می‌باشد و علاوه بر آن دارای توانایی انحلال فسفات معدنی می‌باشد. آنها از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی[1] باکتری مذکور در باکتری *E. coli* HB101 اقدام به همسانه‌سازی ژن درگیر در انحلال فسفات معدنی نمودند. باکتری‌های دریافت کنندهٔ قطعه مذکور دارای قابلیت انحلال فسفات معدنی بالاتری (به میزان دو برابر) از طریق تولید اسید گلوکونیک بودند و دلیل این تفاوت را به سطوح بیان این ژن نسبت دادند، چرا که ژن های *mps* در پلاسمیدی با تعداد نسخه بالا همسانه‌سازی شده بود.

1- cosmid library

جدول 1- ژن‌های درگیر در انحلال فسفات معدنی در باکتری‌های مختلف (به نقل از *et al.*, 2006 Rodrıguez).

Table 1- Inorganic phosphate solubilizing genes from different bacteria (Rodrıguez *et al.*, 2006).

ریزسازواره Microorganism	ژن یا پلاسمید Gene or plasmid	مشخصات و ویژگی‌ها Characteristics
Erwinia herbicola	*Mps*	در *E. coli* HB101 تولید اسیدگلوکونیک کرده و فسفر معدنی را حل نموده، احتمالاً در سنتز PQQ درگیر باشد
Pseudomonas cepacia.	*gab* Y	در *E. coli* JM109 تولید اسیدگلوکونیک کرده و فسفر معدنی را حل نموده، تشابهی با ژن‌های PQQ ندارد
Enterobacter agglomerans	pKKY	در *E. coli* JM109 فسفر را حل نموده، بدون پایین آوردن pH
Ralnella aquatillis	KIM10	در *E. coli* DH5α تولید اسیدگلوکونیک کرده و فسفر معدنی را حل نموده، احتمالاً در سنتز PQQ درگیر باشد
Serratia marcoscens	pKG3791	اسید گلوکونیک تولید کرده و فسفر معدنی را حل می‌کند
Synechococcus PCC7942	*Pcc* gene	فسفواینول کربوکسیلاز تولید می‌کند

این مطالعات بر روی ریزوبیوم‌هایی است که قادر به سنتز PQQ نیستند ولی قادر به تولید آپوانزیم[1] (یعنی GDH) می‌باشند، هدف آن است که ازطریق انتقال کلاستر ژنی (PQQ) به گونه‌های ریزوبیوم، این قابلیت را به ریزوبیوم‌ها انتقال دهند و باکتری توانایی تولید اسید گلوکونیک را بیابد.

باکتری *Serratia marcescens* ER2 با توجه به فعالیت سطح بالایش در انحلال فسفات معدنی از طریق اکسیداسیون مستقیم و تولید اسید گلوکونیک توسط Krishnaraj and Goldstein (2001) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. آنها بعد از ساخت کتابخانه ژنومی این باکتری در باکتری *E. coli* سویه DH5α اقدام به غربالگری همسانه‌های مثبت نمودند. توالی‌یابی DH5α (pKG3791) نشان داد که قطعه DNA همسانه شده هیچ‌گونه تشابهی با ژن‌های شناخته شدهٔ PQQ یا PQQGDH ندارد. در واقع، شناخت خیلی کمی از تنظیم ژنتیکی حاکم بر ویژگی انحلال فسفات معدنی وجود دارد. اطلاعات در مورد ژنتیک و سازوکار بیوشیمیایی درگیر در سنتز هالوآنزیم GDH-PQQ نیز کامل نمی‌باشد و تفاوت‌ها بین فنوتیپ‌های دائمی و القایی در بین چندین گونه باکتریایی مشاهده می‌شود. گلوکز، گلوکونات، مانیتول و گلیسرول از جمله القاگرهای احتمالی فعالیت هالوآنزیم می‌باشند (Rodriguez and Fraga, 1999).

5-2- ژنتیک معدنی شدن فسفات آلی

5-2-1- فسفاتازها

الگوهای متفاوتی از فعالیت فسفاتاز در باکتری‌ها دیده شده است. تولید این آنزیم‌ها اغلب به واسطه سازوکارهای تنظیمی پیچیده کنترل می‌شود، بنابراین فعالیت آنزیم تنها تحت شرایط محیطی خاص مشخص می‌شود. در واقع، هنوز آگاهی کاملی از خصوصیات، تنظیم، بیان و نقش این آنزیم‌ها وجود ندارد. حتی در مورد *E. coli* و *Salmonella typhimurim* که بیشتر مطالعات بر روی آنها صورت گرفته است، تعداد معدودی از ژن‌های فسفاتاز همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده‌اند و مطالعات بر روی تنظیم آنها صورت پذیرفته است (Rodriguez and Fraga, 1999). احتمالاً سازوکار اصلی تنظیم بیان فسفاتازها، القاء به واسطه میزان فسفات معدنی (Pi) موجود در محیط است. این سازوکار در مورد فسفاتاز قلیایی (*pho* A) *E. coli* مطالعه شده است. زمانی که غلظت Pi به 0/16 mM کاهش می‌یابد، بیان این ژن القاء می‌شود. این سازوکار شامل یک اپرون انتقال Pi[2] به عنوان عنصر تنظیم‌گر، بعلاوه اپرون حسگر و فعال کننده[3] به عنوان حل‌کننده و فعال‌کننده است. ژن‌هایی که به وسیله میزان Pi کنترل می‌شوند، بیان آنها به وسیله PhoB فعال می‌شود که بخش اصلی رگولون[4] PHO را تشکیل می‌دهد

1- apoenzyme

2- Pi transport operon
3- sensor-activator operon
4 - regulon

(Rodriguez and Fraga, 1999). گروه‌بندی فسفاتازهای باکتریایی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی آنزیم از قبیل pH بهینه (اسیدی، خنثی یا بازی)، پروفیل سوبسترایی (اختصاصی یا غیر اختصاصی برای یک سوبسترای خاص) و وزن مولکولی (وزن مولکولی بالا در مقابل پایین) انجام شده است. با توجه به در دست بودن اطلاعات توالی این آنزیم‌ها، همانند بقیه پروتئین‌ها به گروه‌های مولکولی مختلف بر اساس تشابه ساختار اولیه و الگوهای خاص توالی‌های حفظ شده برای هر خانواده، قابل تفکیک و شناسایی‌اند (Rossolini *et al.*, 1998). فسفاتازهای اسیدی غیراختصاصی[1] (NSAP) باکتریایی در سه خانواده به نام گروه مولکولی A، B و C قرار داده می‌شوند (Thaller *et al.*, 1998; Rossolini *et al.*, 1998). توجه به گروه A این آنزیم‌ها به منظور زیست پالایی فلزات سنگین در دهه اخیر زیاد شده است. همچنین توجه به NSAPها به منظور انتقال و بیان این ژن‌ها در باکتری‌های PGPR برای رسیدن به سویه‌های حل‌کننده فسفات بهبود یافته با استفاده از فناوری DNA نوترکیب قابل ملاحظه است (Rodriguez *et al.*, 2006). مقایسه توالی‌های اسیدآمینه 6 آنزیم شناخته شده گروه A حضور دومین‌های حفاظت شده[2] را نشان می‌دهد و وجود نگاره[3] GSYPSGH[TA] مشخصه این خانواده می‌باشد (Rossolini *et al.*, 1998). مقایسه توالی‌های اسید آمینه در گروه B، حضور بخش‌های شدیداً حفاظت شده را در آن‌ها نشان می‌دهد. نگاره توالی FDIDDTVLFSSP به عنوان توالی امضاء[4] در این گروه پیشنهاد شده است (به نقل از Rossolini *et al.*,1998). گرچه گروه C از دو گروه دیگر مجزاست اما در سطح توالی با گروه B اسیدفسفاتازها و برخی اسیدفسفاتازهای گیاهی مشابهت دارد. اولین عضو شناسایی شده این گروه پروتئین OlpA-Cm می‌باشد که ژن رمزکننده آن از باکتری *Chryseobacterium meningosepticum* جداسازی شده است. مقایسه توالی اسید آمینه‌ای این گروه با سایر پروتئین‌ها این اجازه را داده است تا مناطق حفاظت شده و مشترک بین این توالی‌ها مشخص گردد. یافته‌ها نشان می‌دهد که گروه B و گروه C اسیدفسفاتازها به اتفاق برخی از اسیدفسفاتازهای گیاهی را می توان به خاطر وجود چهار اسید آمینه آسپارتات (D) در مناطق حفاظت شده در یک زیر خانواده به نام "زیرخانواده فسفوهیدرولاز DDDD" جای داد (به نقل از Rossolini *et al.*, 1998). چندین ژن فسفاتاز اسیدی از باکتری‌های گِرم منفی جداسازی و تعیین ویژگی شده‌اند. برای نمونه ژن A *acp* جداسازی شده از *Francisella tularensis* رمزکننده فسفاتاز اسیدی با بهینه فعالیت در pH:6 با یک محدوده وسیع از نظر عمل بر سوبستراهای خاص است. همچنین ژن‌های رمزکننده فسفاتاز

1- nonspecific acid phosphatase
2- conserved domain
3- motif
4- signature sequence pattern

اسیدی کلاس A (Pho C) و کلاس B (Nap A) از *Morganella morganii* جداسازی شدند. علاوه بر آن، این آنزیم‌ها از نوع سرکش یا غیر القاپذیر[1] بوده و فعالیت بالا در pH:6 و در دمای 30 درجه سلسیوس و عمل بر سوبسترای مختلف را نشان می‌دهند (Rodriguez *et al.*, 2006). در میان ریزوباکترها ژنی از *Burkholderia cepacia* جداسازی شده است که فعالیت فسفاتاز را تسهیل می‌کند. این ژن رمزکننده یک پروتئین متصل به غشاء خارجی است که در غیاب فسفر محلول بیان آن بالا می رود و می‌تواند در انتقال فسفر دخیل باشد (Rodriguez *et al.*, 2000a). علاوه بر این، همسانه‌سازی دو ژن فسفاتاز اسیدی پری‌پلاسمیکِ غیر ویژه (*nap* E و *nap* D) از *Sinorhizobium melilloti* به انجام رسیده است. همچنین همسانه سازی و انتقال ژن فسفاتاز *nap* A از باکتری *Morganella morganii* به باکتری *Burkholderia cepacia* IS-16 با استفاده از وکتور pRK293 با دامنه میزبانی بالا[2] انجام شده و افزایش در فعالیت فسفاتاز خارج سلولی سویه نوترکیب گزارش شده است (Rodriguez *et al.*, 2006). همسانه‌سازی و بیان ژن فسفوتری‌استر از (*hoc* A) از باکتری *Pseudomonas montiellii* C11 توسط Horn *et al.* (2002) صورت پذیرفت. دلیل نام‌گذاری آن به خاطر هیدرولیز کراکسن[3] به عنوان یک منبع فسفات آلی می‌باشد.

طول این ژن 501 bp بوده و یک پروتئین kD 19 را رمز می‌کند و باکتری مورد نظر را قادر می‌سازد تا از این منبع فسفات آلی به عنوان تنها منبع فسفر موجود در محیط استفاده نماید.

5-2-2- فیتازها

مطالعات ژنتیکی فیتازها در سال 1984 شروع شد و اولین فیتاز تجاری تولید شده به وسیله ریزسازواره‌های مهندسی شده در اواسط سال 1990 با نام Natuphos وارد بازار شد. اغلب مطالعات مهندسی ژنتیک بر تحقیقات فیتاز به منظور بهبود تغذیه حیوانات تک معده‌ای متمرکز شده است. کاربرد دیگر آن در انحلال فیتات خاک می‌باشد، زیرا مایه‌های تلقیح با تولید فیتاز بالا از موارد مورد علاقه برای بهبود تغذیه گیاهان و کاهش آلودگی فسفر در خاک می‌باشد. همچنین ژن‌های فیتاز از قارچ، گیاهان و باکتری‌ها همسانه‌سازی شده‌اند. ژن‌های پایدار در برابر گرما (*phy*) از *Bacillus sp.* DS11 و از *B.subtilis* VTT E-68013 همسانه‌سازی شده‌اند (Rodriguez *et al.*, 2006; Konietzny and Greiner, 2004 و Pandy *et al.*, 2001). تا کنون چهار گروه مجزا بر اساس توالی ژن‌ها و مناطق حفاظت شده آنها، ساختمان سه بعدی، سازوکارهای واکنش و ویژگی‌های آنزیمی برای فیتازها گزارش شده است که آنها را به اختصار HAP[4]، PAP[5]، CP[6] و BPP[7] نامگذاری می‌کنند

1- P-irrepressible
2- broad-host range vector
3- hydrolysis of coroxon

4- Histidine acid phosphatase
5- Purple acid phosphatase
6- Cysteine phosphates
7- β-Propeller phytase

Mullaney and Ullah, 2005; Tang *et al.*, 2006; Cheng and Lim, 2006; Sarikhani, 2012). فیتازها را بر اساس pH بهینه فعالیت نیز به دو گروه کلی فیتازهای اسیدی و قلیایی تقسیم‌بندی می‌کنند که از گروه اول می‌توان به فیتازهای قارچی و گروه باکتری‌های گِرَم منفی اشاره کرد و باکتری‌های جنس *Bacillus* از گروه فیتازهای قلیایی‌اند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Oh *et al.*, 2004). در یک تقسیم‌بندی دیگر، فیتازها را براساس این که کدام گروه از فسفات ابتدا توسط آنزیم از فیتات برداشته می‌شود نامگذاری می‌کنند. به طور مثال 3- فیتاز یا 6- فیتاز که به ترتیب بیانگر آن است که فسفات شماره 3 و فسفات شماره 6 اولین فسفات‌های برداشته شده از مولکول فیتات می‌باشند. فیتاز *E. coli* از نوع 6-فیتاز بوده در حالی که فیتازهای قارچی و باسیلوس‌ها از نوع 3-فیتاز می‌باشند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Oh *et al.*, 2004; Vats and Banerjee, 2004). فیتازهای طبیعی را از نظر الگوی بیان به فیتازهای دایمی[1] و القایی[2] تفکیک می‌کنند (Vohra and Satyanaryana, 2003). Shieh and Ware (1968) مشاهده کردند که تولید فیتاز برون سلولی قارچی در غلظت‌های پایین فسفات معدنی[3] در محیط رشد القاء می‌شود، برخلاف فیتاز قارچی، فیتاز *B. subtilis* در حضور فیتات القاء می‌شود همچنین این آنزیم در حضور عصاره آرد گندم نیز که حاوی فیتات می‌باشد، القا می‌گردد (Kerovuo, 2000). باکتری‌ها و قارچ‌های تولید کننده فیتاز به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و از جمله باکتری‌های گرم منفی می‌توان به *E. coli*، *Pseudomonas* sp.، *Klebsiella* sp. و از باکتری‌های گرم مثبت به *Bacillus* sp. اشاره داشت (Oh *et al.*,2004; Haefner *et al.*, 2005; Konietzny and Greiner, 2004; Pandy *et al.*, 2001; Vats and Banerjee, 2004). همچنین Rodriguez and Fraga (1999) اقدام به همسانه سازی، توالی‌یابی و بیان ژن فسفاتاز اسیدی/ فیتاز (*app* A2/ *app* A) از بدن خوک نمودند. دو وظیفه‌ای بودن این آنزیم‌ها آن‌ها را برای انحلال فسفر آلی خاک جذاب نموده است. گرچه قبلاً جداسازی ژن‌های فیتاز از *Aspergillus niger*، *Emericella nidulans* و چند گونه دیگر گزارش شده بود. ژن‌های فیتازِ قلیایی تا خنثی نیز از باکتری‌های *B. subtilis* و *B. licheniformis* همسانه‌سازی شده‌اند (Kerovuo, 2000). با توجه به اهمیت آنزیم فیتاز در انحلال فسفات آلی و نیاز حیوانات تک معده‌ای برای استفاده از این منابع غذایی تولید فیتاز و افزودن آن به عنوان یک ماده غذایی اضافه شده به جیره غذایی[4] مورد توجه می‌باشد (Pandy *et al.*, Konietzny and Greiner, 2004; Zinin *et al.* 2001). با توجه به این مساله (2004) جداسازی و توالی‌یابی ژن *phy*A را ازکتابخانه ژنومی *Obesumbacterium proteus* گزارش کرده و اقدام به همسانه‌سازی و بیان این ژن در باکتری *E. coli* نمودند و در ادامه مطالعات

1- constitutive
2- inducible
3- Pi starvation
4- feed additive

خود را بر روی خصوصیات و ویژگی آنزیم فیتاز تولیدی تکمیل کردند. Malboobi *et al.* (2012) موفق به جداسازی دو ژن مرتبط با معدنی نمودن فسفات آلی به نام‌های PPP1 و PPP2 شدند. آن‌ها بعد از تشکیل کتابخانه ژنومی سویه P13 باکتری *P. putida* در باکتری *E.coli* سویه DH5α اقدام به غربالگری در محیط حداقل Sperber در حضور BCIP نمودند. بررسی ویژگی‌های آنزیمی ژن‌های نام برده نشان داد که PPP1 دارای ویژگی بارز فیتازی می‌باشد در حالی که PPP2 بیشتر خاصیت فسفاتاز قندی از خود نشان می‌دهد (Sarikhani *et al.*, 2011; Sarikhani *et al.*, 2012).

به منظور جلوگیری از طولانی شدن بحث آنزیم‌های درگیر در انحلال فسفات معدنی و ژن‌های مرتبط با آن‌ها، به جدول 2 که مروری است بر مطالعات انجام یافته بر روی فیتازهای طبیعی یا بومی[1] و بیان فیتازهای نوترکیب[2] در باکتری های میزبان دیگر (اغلب *E. coli*)، اکتفا می‌شود. مطالعه منبع (Sarikhani and Malboobi, 1389) نیز برای خوانندگان پیشنهاد می‌شود.

به صورت خلاصه می توان تقسیم‌بندی از ژن‌های مرتبط در انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی ارائه نمود که در شکل 6 قابل مشاهده است.

6- روش‌های جداسازی ژن‌های فسفاتاز و فیتاز از باکتری‌های حل‌کننده فسفات

با توجه به اهمیت ژن‌های فسفاتاز و فیتاز در انحلال منابع فسفات آلی و در نظر گرفتن تنوع بسیار بالای توالی آن‌ها، مروری بر روش‌های مختلف جداسازی این ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

آنزیم‌های فسفاتاز که فیتازها نیز زیرمجموعه‌ای از آن‌ها را تشکیل می‌دهند، توسط گروه متنوعی از ژن‌ها رمز می‌شوند. به طوری که Thaller *et al.* (1998) فسفاتازهای پروکاریوتی را بر اساس نگاره توالی حفاظت شده[3] موجود در توالی آنها در 3 گروه مجزای A، B و C قرار دادند. تنوع در بین فسفاتازهای یوکاریوتی بیش از این می‌باشد به طوری که فیضی و ملبوبی (اطلاعات منتشر نشده) فسفاتازهای یوکاریوتی را بر اساس تشابه توالی در 5 گروه مجزا تقسیم‌بندی نمودند. روش‌های مختلفی تا کنون برای همسانه‌سازی این قبیل از ژن‌ها به کار گرفته شده است. برای نمونه PCR و RT-PCR به ترتیب ساده‌ترین روش برای جداسازی و همسانه‌سازی ژن‌ها از ژنوم[4] یا نسخه‌های رونوشت[5] یک موجود بر اساس اطلاعات ژن‌های همسانه‌سازی شده در گذشته می‌باشد. استفاده از RT-PCR در مورد پروکاریوت‌ها به دلیل طول عمر پایین mRNA، فقدان ساختار اینترونی و عدم وجود دنباله A[6] استفاده نشده است (Saleh-Lakha *et al.*, 2005) گرچه استفاده از این روش در مورد فسفاتازهای یوکاریوتی قابل استفاده

1- native phytase
2- recombinant phytase

3- conserved sequence motif
4- genome
5- transcriptomes
6- poly(A) tail

می‌باشد (Celler *et al*., 1998; Bei and Xiang-Ning, 2008).

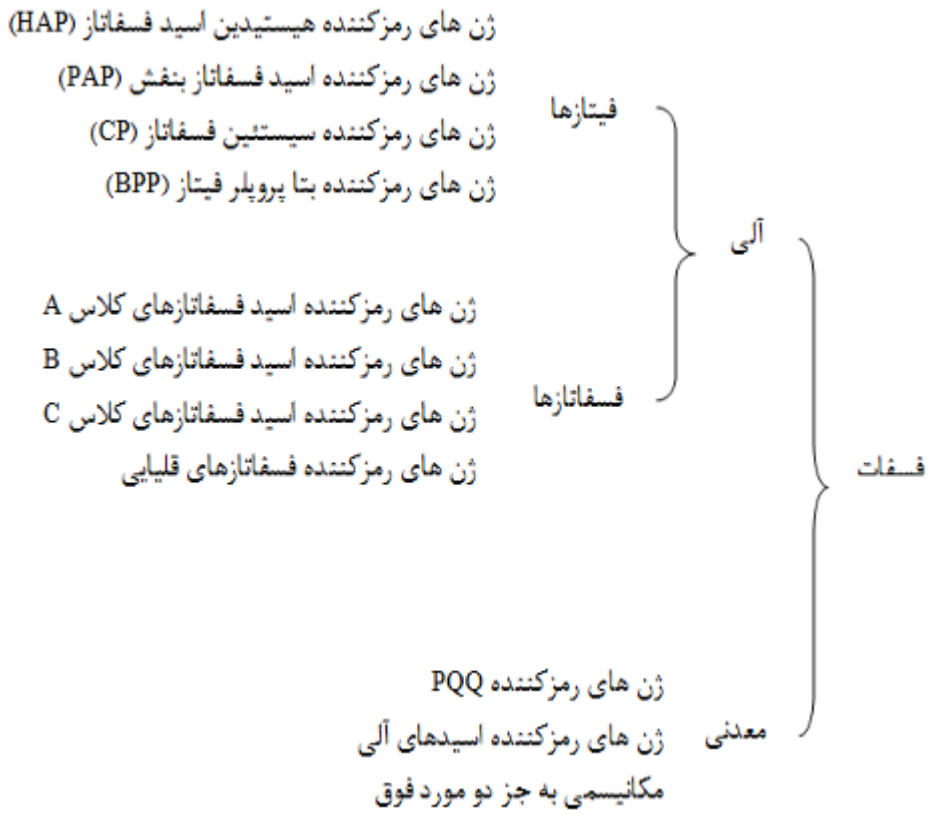
مشکلات روش‌های فوق زمانی بیشتر می‌شود که اطلاعات ژنوم موجودی در دست نباشد و با یک ژن جدید روبرو باشیم. یکی دیگر از روش‌های قابل استفاده در جداسازی این گروه از ژن‌ها، تهیه کتابخانه ژنومی و غربالگری[1] همسانه‌ها با استفاده از هاله شفاف در اطراف همسانه می‌باشد. البته باید در نظر داشت که تولید هاله شفاف می‌تواند ناشی از رهاسازی آنزیم یا اسیدهای آلی باشد (Gargova *et al*., 1997; Malboobi *et al*., 2009a; Mehta and Nautiyal, 2001; Bae *et al*., 1999).

همچنین دست‌یابی به ژن‌های مورد نظر می‌تواند از طریق طراحی آغازگرهای مختلط[2] بر اساس مناطق حفاظت شده (Cho *et al*., 2005; Huang *et al*., 2006) یا بعد از خالص‌سازی آنزیم و توالی‌یابی قسمتی از توالی اسید آمینه‌ای آن برای رسیدن به ژن رمزکننده در ژنوم موجود هدف (Kerovuo *et al*., 1998; Cho *et al*., 2005) امکان‌پذیر باشد. به هر حال رسیدن به ژن رمزکننده از طریق خالص‌سازی آنزیم و طراحی آغازگر برای آن نیاز به داشتن اطلاعات لازم و کافی از رفتار آنزیم در شرایط مختلف دارد که تشخیص و خالص‌سازی آن کار ساده‌ای نمی‌باشد.

در طول زمان برخی از روش‌ها برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات (Mehta and Nautiyal, 2001; Van Ommen Kloeke *et al*., 1999) و برخی روش‌ها برای پایش فعالیت فسفاتازی سویه‌ای خاص یا حتی جداسازی ژن استفاده شده است. برای نمونه Gibson *et al*. (1988) استفاده از BCIP را در مورد قارچ آسپرژیلوس و سوسپانسیون کشت سویا و تشخیص فعالیت فسفاتازی آن گزارش داد. دیگران نیز برای غربالگری فعالیت فسفاتازی همسانه‌های حاصل از تشکیل کتابخانه ژنومی از سوبستراهای رنگزا از قبیل pNPP (Pradel and Boquet, 1988) و فنل فتالئین دی فسفات/ متیل گرین[3] (Riccio *et al*., 1997) که به ترتیب موجب تشکیل رنگ زرد و سبز همسانه‌های با فعالیت فسفاتازی بالا می‌شود، استفاده کرده‌اند.

علاوه بر آن در زمان‌های مختلف با توجه به اهمیت موضوع کار، ارائه روش‌های کارآمدتر و سریع‌تر در برنامه تحقیقاتی پژوهشگران بوده است. به طور مثال، استفاده از رسوب رنگ فلئورسنت[4] برای تشخیص فعالیت فسفاتازی کلنی باکتری گزارش شده است (Van Ommen Kloeke *et al*., 1999). همچنین Senn and Wolosiuk (2005) روشی شیمیایی بر اساس آزاد شدن فسفر به عنوان محصول ناشی از فعالیت فیتازی همسانه‌های حاصل از کتابخانه ژنومی برای غربالگری عرضه کردند.

1- screening
2- degenerate primers
3- phenolphthalein diphosphate/methyl green
4- precipitating fluorescent dye



شکل 6- ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات معدنی و آلی (استنتاج از Sarikhani *et al*. 2010; Roderiquez and Fraga, 1999; Thaller *et al*. 1998).

Figure 6- Genes related to soilubilization of organic and inorganic phophsate (Sarikhani *et al*. 2010; Roderiquez and Fraga, 1999; Thaller *et al*. 1998).

جدول **2**- **فیتازهای باکتریایی مختلف شناخته شده به همراه ویژگی‌های مهم آنزیمی آنهـا** (Sarikhani and Malboobi, 1389).

Table 2- The known bacterial phyatses and their biochemical characteristics (Sarikhani and Malboobi, 1389).

ریزسازواره Bacteria	مکان آنزیم Local of enzyme	وزن مولکولی (kDa) Molecular Weight	pH بهینه Optimum pH	دمای بهینه (°C) Optimum temperature
Pantoea agglomerans	Periplasmic	42	4.5	60
Aerobacter aerogenes	nd	nd	4-5	70
Bacillus subtilis	Extracellular	42	7	55
Bacillus subtilis	nd	36.5	7	55
Bacillus subtilis (natto)	Extracellular	38	6.5	60
B.laevolacticus	nd	41 و 45	7	70
B.amyloliquefaciens	nd	44	7.5	70
B.subtilis 168	Extracellular	44	5.5–6	55
B.licheniformis	Extracellular	47	5-7	65
Bacillus sp. PH01	Extracellular	30	6	65
Kelbsiella sp.	Bind to the cell wall	42	5	50
K.terrigena	Intracellular	40	5	58
K.oxytoca	Bind to the cell wall	40	5 و 6	55
K.aerogenes	nd	700	4.5–5.2	60
Pseudomonas syringae	Intracellular	45	5.5	40
Pseudomonas sp.	Extracellular	nd	5	40
Pseudomonas sp	nd	nd	nd	nd
Yersinia intermedia	nd	45	4.5	55
Obesambacterium proteus	nd	45	4.9	45
Citrobacter brakii	nd	47	4	50
Lactobacillus sanfrancesis	nd	50	4	45
Escherichia coli	Periplasmic	42	4.5	55
Selemonas ruminantium	nd	46	4-5.5	55
P.putida P13 (PPP1)*	nd	27	5	60
P.putida P13 (PPP2)*	nd	50	4.5-5	60

در پژوهشی Sarikhani *et al.* (2010) با ارایه روشی برای غربالگری عملکردی[1] کتابخانه ژنومی سویه P13 باکتری *P. putida* با استفاده از BCIP در محیط حداقل Sperber، جداسازی دو ژن جدید فسفاتازقندی و فیتازی را گزارش دادند. آن‌ها در کار خود با مشاهده رفتار فسفاتازی القایی در محیط Sperber حاوی BCIP اقدام به همسانه‌سازی ژن‌های فوق نمودند (شکل 2). در شکل 7 روش‌های مرسوم برای دست‌یابی به ژن‌های رمزکننده فسفاتاز/ فیتاز و یا ژن‌های درگیر در انحلال فسفات معدنی به شکلی کلی و خلاصه مشخص می‌باشد.

7- گام آخر

بعد از کسب آگاهی نسبت به نقش باکتری‌های حل‌کننده فسفات، نگاهی به استفاده از آنها در دنیا صحبت پایانی خواهد بود. تولید کود زیستی حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات شامل 3 مرحله می‌باشد. اولین گام: انتخاب و آزمایش سویه‌های حل‌کننده فسفات، دومین گام: تهیه زادمایه که خود شامل انتخاب حامل مناسب و تولید انبوه باکتری حل‌کننده فسفات می‌باشد و سومین گام: روش‌های کنترل کیفی و توزیع کود زیستی. در هندوستان کود زیستی فسفاته با نام IARI microphos که داری دو باکتری به نام‌های *P. striata* و *B. polymyxa* و سه گونه قارچی حل‌کننده فسفات به نام‌های *Aspergillus awamori*، *A. niger* و *Penicillium digitatum* می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Khan *et al.*, 2007). در اتحاد جماهیر شوروی سابق اولین کود زیستی فسفاته به نام Phosphobacterin مورد استفاده قرار گرفت که به ترتیب بعداً در کشورهای اروپای شرقی و هند نیز مورد استفاده قرار گرفت، در این کود زیستی از باکتری حل کننده فسفات به نام *B. megaterium* var. *phosphaticum* بهره گرفته می‌شد (Khan *et al.*, 2007). دو گونه باکتری *Burkholderia cepacia* IS-16 و *Pseudomonas sp.* PSS به عنوان کودهای زیستی حل‌کننده فسفات در کشور کوبا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rodriguez *et al.*, 2000b). کود زیستی بارور2 که شامل دو باکتری *P.putida* و *Pantoea agglomerans* می‌باشد نیز در ایران مورد استفاده قرار گرفته است (Malboobi *et al.*, 2009a,b).

زادمایه باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند به تنهایی و مجزا[2] یا همراه با سایر زادمایه‌ها و مختلط[3] استفاده شود که در این حالت به آن تلقیح همزمان[4] هم اطلاق می‌شود. استفاده به صورت بذرمال، استفاده مستقیم در خاک یا در آب آبیاری از روش‌های پیش‌رو برای استفاده این دسته از کودهای زیستی است که هر کدام با محاسن و معایبی همراه است و تصمیم گیری در مورد نحوه به کارگیری آنها به شرایط حاکم بستگی دارد، به عنوان نمونه زمانی که بذر مورد

1- functional screening

2- single
3- mixed
4- co-inoculation

تیمار یک آفت کش قرار گرفته که با باکتری سازگاری ندارد بایستی از روش بذرمال صرف‌نظر کرد (Khan *et al*., 2007; Khan *et al*., 2009).

رقابت باکتری تلقیح شده با سایر باکتری‌های بومی خاک، بقا و تکثیر آن در محیط، موفقیت باکتری در شرایط محیطی جدید را تضمین می‌کند. معمولاً جمعیت و تراکم باکتری تلقیح شده با گیاه یا خاک سریعاً کاهش می‌یابد (Ho and Ko, 1985). بقاء باکتری به عوامل مختلفی از قبیل ترکیب خاک، دما، رطوبت، pH خاک (Van Elsas *et al*., 1991) و عوامل زیستی از قبیل رقابت، شکار و نوع گیاه و ترشحات ریشه بستگی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نیاز ضروری سلول‌های زنده به فسفر، ریزسازواره‌های حل‌کننده فسفات اعم از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به عنوان یک راهکار برای تامین و فراهمی آن و غلبه بر کمبود آن در چرخه حیات نقش ایفا کرده‌اند. در این میان، توجه بیشتر پژوهشگران به گونه‌های میکروبی فعال در زمینه تولید اسیدهای آلی، تولید کننده فسفاتازها و فیتازها معطوف بوده است که با دست‌یابی به یک گونه مناسب بتوان از آن درحیطه‌هایی چون کودهای زیستی برای گیاهان و پروبیوتیک‌ها برای دام وطیور استفاده نمود. در این میان باکتری‌های حل‌کننده از جنس *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Enterobacter* برای افزایش فراهمی فسفر مورد نیاز گیاه و همچنین رشد و عملکرد، کارآمدتر به نظر می‌رسند. در مرحله نخست رسیدن به یک ریزسازواره با توان حل‌کنندگی فسفات بالا و در ادامه دستیابی به ژن رمزکننده آن، راه را برای به خدمت گرفتن هر چه بیشتر این توانهای زیستی برای پیشبرد اهداف هموار می‌سازد. نگاهی به پژوهش‌های کلاسیک گذشته و استفاده از روش‌های مولکولی نوین، آینده‌ای روشن را پیش روی ما ترسیم می‌نماید تا بتوان با در کنار هم قرار دادن این دو، روشی کارآمد برای غلبه بر مشکل کمبود فسفات محلول در خاک و یا مواد مغذی از یک سو و آلودگی‌های زیست محیطی حاصل از کاربرد کودهای فسفاته شیمیایی از سوی دیگر یافت. برای رسیدن به این مهم تلاش میکروب شناسان، خاکشناسان و زیست‌فناوران ضروری به نظر می‌رسد.

شکل 7- روش‌های مرسوم در جداسازی ژن‌های فسفاتاز و فیتاز (استنتاج از Cho *et al*. 2005, Sarikhani *et al*. 2010).

Figure 7- Conventional methods in isolation of phosphatase and phytase genes (Sarikhani *et al*., 2010; Cho *et al*., 2005).

منابع

Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 4: 454-458.

Alef K, Nannipier P, Trazar-Cepeda T (1995). Phosphatase activity. In:K Alef and P.nannipier (Eds). Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Academi press Inc.San Diego, CA 92101.pp.335-342.

Bae HD, Yanke LJ, Cheng KJ, Selinger LB (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. Journal of Microbiological Methods 39: 17–22.

Beech IB, Paiva M, Caus M, Coutinho C (2001). Enzymatic activity and within biofilms of sulphate-reducing bacteria. In: P. G. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran and J. Walker (Eds.), Biofilm Community Interactions: chance or necessity? BioLine, Cardiff, UK. pp. 231-239.

Bei G, Xiang-ning J (2008). Cloning of Trehalose-6-Phosphate Phosphatase and Transformation to Tobacco. The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering 441 – 444, Shanghai, China.

Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant and Soil 173: 29-37.

Celler JW, Luo X, Böhmer FD (1998). Protein tyrosine APase gene expression analysis in Swiss 3T3 fibroblasts. Molecular and Cellular Biochemistry 178: 157-162.

Chen JC (1998). Novel screening method for exteracellular phytase-producing microorganisms. Biotechnology Techniques 12(10): 759-761.

Chen YP, Rekha PD, Arunshen AB, Lai WA, Young CC (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33-41.

Cheng C, Lim BL (2006). Beta-propeller phytases in the aquatic environment. Archives of Microbiology 185: 1–13.

Cho JS, Lee CW, Kang SH, Lee JC, Bok JD, Moon YS,Lee HG,Woo J, Choi YJ (2005). Molecular cloning of a phytase gene (*phy M*) from *Pseudomonas syringae* MOK1. Current Microbiology 47: 290–294.

Cosgrove DJ (1967). Metabolism of organic phosphates in soil. In: AD Mclaren and GH Peterson (Eds.), Soil Biochemistry, Vol. I. Marcel & Dekker, New York pp. 216-228.

Deubel A, Merbach W (2005). Influence of Microorganisms on Phosphorus Bioavailability in Soils. In: F Buscot and A Varma (Eds.), Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. p. 62.

Dutton VM, Evans CS (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. Canadian Journal of Microbiology 42: 881-895.

Ezawa T, Smith SE, Smith FA (2002). P metabolism and transport in AM fungi. Plant and Soil 244: 221-230.

Fageria NK (2009). The use of nutrients in crop plants. Taylor and Francis Group, LLC. New York.

Fallah A (2006). Abundance and distribution of phosphate solubilizing bacteria and fungi in some soil samples from north of Iran. 18th World Congress of Soil Science, July 9-15, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Fankem H, Nwaga D, Deubel A, Dieng L, Merbach W, Etoa FX (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. African Journal of Biotechnology 5: 2450-2460.

Gargova S, Roshkova Z, Vancheva G (1997). Screening of fungi for phytase production. Biotechnology Techniques 11: 221–224.

Ghaderi A, Aliasgharzad N, Oustan S, Olsson PA (2008). Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). Soil Environment 27: 71-76.

Gibson DM, AA Christen, Mullaney EJ (1988). Direct screening for acid phosphatase production on BCIP-Agar plates. Biotechnology Techniques 2: 63-68.

Goldstein AH (2000). Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. Proc. 4th Int. Fert. Assoc. Tech. Conf. IFA, Paris. p. 220.

Goldstein AH (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. Biological Agriculture and Horticulture 12: 185-193.

Goldstein AH (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenises in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: A. Torriani Gorini, E. Yagil and S. Silver (Eds.), Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, D. C. pp. 197-203.

Goldstein AH, Rogers RD, Mead G (1993). Mining by microbe, Nature Biotechnology 11: 1250–1254.

Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245: 83-93.

Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Podle PS, Collins MD, Hutson RA, Naresh KG (1999). Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. FEMS Microbiology Letters 171: 223-229.

Gyaneshwar P, Naresh KG, Parekh LJ (1998). Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms, World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 669–673.

Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005). Biotechnological production and applications of phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 68: 588–597.

Hao X, Cho CM, Racz GJ, Chang C (2002). Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. Nutrient Cycling in Agroecosystems 64: 213-224.

He ZL, Zhu J (1988). Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charged minerals. Soil Biology and Biochemistry 30: 917-923.

Ho WC, Ko WH (1985). Effect of environmental edaphic factors, Soil Biology and Biochemistry 17: 167–170.

Horne I, Sutherland TD, Oakeshott JG, Russell RJ (2002). Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilii* C11. Microbiology 148: 2687–2695.

Huang H, Luo H, Yang P, Meng K, Wang Y, Yuan T, Bai Y, Yao B (2006). A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. Biochemical and Biophysical Research Communications 350: 884-889.

Illmer P, Schinner F (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biology and Biochemistry 24: 389–395.

Isherword KF (1998). Fertilizer use and environment. In: N. Ahmed and A. Hamid (eds.), Proc. Symp. Plant Nutrition Management for Sustainable Agricultural Growth. NFDC, Islamabad. pp. 57-76.

Kerovuo J (2000). A novel phytase from *Bacillus* Characterization and production of the enzyme. Ph.D Thesis.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. Applied Environmental Microbiology 64: 2079-2085.

Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Saqlan Naqvi SM, Rasheed M (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. Journal of Agricultural and Biological Science 1(1): 48-58.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review.Agronomy for sustainable development. Agronomy for Sustainable Development 27: 29-43.

Kim KY, Jordan D, McDonald GA (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biology and Fertility of Soils 26: 79-87.

Konietzny U, Greiner R (2004). Bacterial phytase: Potential application ,in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology 35: 11-18.

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

Krishnaraj PU, Goldstein AH (2001). Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. FEMS Microbiology Letters 205: 215-220.

Kpomblekou K, MA Tabatabai (1994). Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. Soil Science 158: 442-453.

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

Kucey RMN (1988). Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. Canadian Journal of Soil Science 68: 261–270.

Kucey RMN, Janzen HH, Legget ME (1989). Microbial mediated increases in plant available phosphorus. Adv. Agron. 42:199-228.

Lindsay WL, Vlek PLG, Chien SH (1989). Phosphate minerals, in: Dixon J.B., Weed S.B., Soil environment, 2nd ed., Soil Sci. Soc. America, Madison, pp. 1089–1130.

Malboobi MA, Owlia P, Behbahani M, Sarokhani E, Moradi S, Yakhchali B, Deljou A, Morabbi Heravi K (2009a). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1471–1477.

Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H (2009b). Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1479-1484.

Malboobi MA, Sarikhani MR, Greiner R (2012). Recombinant APase Nucleic Acid Sequences. US Patent. 20120128825A1.

Mehta S, Nautiyal CS (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology 43: 51-56.

Mullaney EJ, Ullah A (2005). Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. In Proceedings of the Bouyoucos Conference: Inositol Phosphates in the Soil–Plant–Animal System, Sun Valley, Idaho, USA, 21–24 August 2005. Edited by B. L. Turner, A. E. Richardson, and E. J. Mullaney. pp. 17–18

Nahas E (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12: 18-23.

Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270.

Norrish K, Rosser H (1983). Mineral phosphate, in: Soils, an Australian viewpoint, Academic press, Melbourne, CSIRO/London, UK, Australia, pp. 335–361.

Oh BC, Choi WC, Park S, Kim Yo, Oh TK (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 362–372.

Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimaraes CT, Schaffert RE, Sa NMH (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biology and Biotechnology 41: 1782-1787.

Omar SA (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 211-218.

Ozanne PG (1980). Phosphate nutrition of plants – general treatise. The role of phosphorus in agriculture, in: Khasawneh F.E., sample E.C., Kamprath E.J. (Eds.), American Soc. Agron. Crop Sci. Soc. America, Soil Sci. Soc. America, Madison, WI, USA, pp. 559–589.

Pandy A, Szakacs G, Soccol CR, Rodriguez-leon JA, Soccol VT (2001). Production,purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technology 77: 203-214.

Paul EA (2007). Soil Microbiology and Biochemistry. Third edithion. Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP, UK.

Pérez E, Sulbarán M, Ball MM, Yarzabál LA (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. Soil Biology and Biochemistry 39: 2905-2914.

Perveen S, Khan MS, Zaidi A (2002). Effect of rhizospheric microorganisms on growth and yield of green gram (*Phaseolus radiatus*). Indian Journal of Agriculture Science 72: 421-423.

Pikovskaya RI (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiology 17: 362– 370.

Ping L, Boland W (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Trends in plant science 9(6): 263-266.

Pradel E, Boquet PL (1988). Acid phosphatases of *Escherichia coli*: molecular cloning and analysis of agp, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphatase. Journal of Bacteriology 170: 4916-23.

Pradhan N, Sukla LB (2005). Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology 5: 850-854.

Raghothama KG, Karthikeyan AS (2005). Phosphate acquisition. Plant and Soil 274: 37–49.

Ramesh kumar N, Thirumalai Arasu V, Gunasekaran P (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. Current Science 82(12): 1463-1466.

Reyes I, Bernier L, Simard RR, Antoun H (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV induced mutants, FEMS Microbiology Ecology 28: 281–290.

Riccio ML, Rossolini GM, Lombardi G, Chiesurin A, Satta G (1997). Expression cloning of different bacterial phosphatse-encoding by histochemical screening of genomic libraries onto an indicator medium containing phenolphthalein diphosphate and methyl green. Journal of Applied Microbiology 82: 177-185.

Richardson AE, Hadobas PA (1997). Soil isolates of *Pseudomonas spp*. That utilize inositol phosphates. Canadian Journal of Microbiology 43(6): 509-516.

Rodriguez E, Han Y, Lei XG (1999). Cloning, Sequencing, and Expression of an *Escherichia coli* Acid Phosphatase/Phytase Gene (*appA2*) Isolated from Pig Colon. Biochemical and Biophysical Research Communications 257: 117–123.

Rodrıguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil 287: 15–21.

Rodrıguez H, Gonzalez T, Goire I (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp* . Naturwissenschaften 91: 552–555.

Rodrıguez H, Rossolini GM, Gonzalez T, li J, Glick BR (2000a). Isolation of a Gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 Encoding a Protein That Facilitates Phosphatase Activity. Current Microbiology 40: 362–366.

Rodrıguez H, Gonzalez T, Selman G (2000b). Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. Journal of Biotechnology 84: 155–161.

Rodrıguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17: 319–339.

Roos W, Luckner M (1984). Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acid in *Penicillium cyclopium*. J. Gen. Microbiol., 130:1007–1014.

Rossolini GM, Schippa S, Riccio, ML, Berlutti F, Macaskie LE, Thaller MC (1998). Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. Cell Mol Life Science 54: 833–850.

Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Annl. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 52:527-560.

Saber K, Nahla L, Ahmed D, Chedly A (2005). Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agronomy for Sustainable Development 25: 389–393.

Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM, Trevors JT (2005). Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. Journal of Microbiological Methods 63: 1–19.

Sarikhani MR (2012). Phytases and its application in agriculture. 4th International Congress of the European Confederation of Soil Science Societies (ECSSS-EUROSOIL), 2-6 July 2012, Bari, Italy.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Bambai B (2012). Isolation, cloning and characterisation of a novel phytase gene from *Pseudomonas putida* strain P13. 4th International Congress Eurosoil, Soil science for the benefit of mankind and environment, 2-6 July, Bari, Italy.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Bambai B (2011). Cloning and characterization of a new phosphatase gene from *Pseudomonas putida* strain P13. 4th International Conference on Environmental Industerial and Applied Microbiology, 14-16 September, Malaga, Spain.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Yakhchali B (2010). Functional screening of phosphatase-encoding genes from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology 8: 275-279.

Sarikhani MR, Malboobi MA (1389). Phytases: enzymology, molecular and biochemical characteristic and applications. Journal of Agricultural Biotechnology. 2(2): 13-39. (In Persian language)

Senn AM, Wolosiuk RA (2005). A high-throughout screening for phosphatases using specific substrates. Analytical Biochemistry 339: 150-156.

Shieh TR, Ware JH (1968). Survey of microorganisms for the production of the production of extracellular phytase. Applied Microbiology 16: 1348-1351.

Stephen J, Jisha MS (2009). Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. World Journal of Agriculture Science 5: 135-137.

Stevenson FJ (2005). Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley and Sons, New York.

Subba Rao NS (1988). Phosphate solubilizing micro-organism. In: Biofertilizer in agriculture and forestry. Regional Biofertilizer Development Centres, India. pp. 133-142.

Subba Rao NS (1982). Advances in Agricultural Microbiology, in: Subha Rao N.S. (Ed.), Oxford and IBH Publ. Co., pp. 229–305.

Surange S, Wollum AG, Kumar N, Nautiyal CS (1995). Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. Candian Journal of Microbiology 43: 891- 894.

Tang J, Leung A, Leung C, Lim BL (2006). Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytase. Soil Biology and Biochemistry 38: 1316-1324.

Tao G, Tian S, Cai M, Xie G (2008). Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. Pedosphere 18: 515-523.

Tarafdar JC, Rao AV, Bala K (1988). Production of phosphatases by fungi isolated from desert soils. Folia Microbiology 33: 453- 457.

Thaller MC, Schippa S, Rossolini GM (1998). Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. Protein Science 7: 1647–1652.

Timmusk S, Wagner EGH (1999). The Plant growth-promoting rhizobacterium *paenibacillus polymxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and a biotic stress responses. Molecular Plant Microbe Interactions 12(11): 951-959.

Van Elsas JD, Van Overbeek LS, Fouchier R (1991). A specific marker pat for studying the fate of introduced bacteria and their DNA in soil using a combination of detection techniques. Plant and Soil 138: 49–60.

Van Ommen Kloeke F, Baty AM, Eastburn CC, Diwu Z, Geesey GG (1999). Novel method for screening bacterial clonies for phosphatase activity. Journal of Microbiolgical Methods 38: 25-31.

Vats P, Banerjee UC (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) an overview. Enzyme and Mmicrobiology Technology 23: 3-14.

Vohra A, Satyanarayana T (2003). Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. Critical Reviews in Biotechnology 23(1): 29–60.

Whitelaw MA (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advanced Agronomy 69: 99–151.

Yadaf RS, Tarafdar JC (2001). Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. Biology and Fertility of Soils 34: 140-143.

Yong Kim K, Jordan D, Krishnan HB (1998). Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli.* FEMS Microbiology Letters 159: 121-127.

Zaidi A, Khan MS, Amil M (2003). Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Europian Journal of Agronomy 19: 15–21.

Zinin NV, Serkina AV, Gelfand MS, Shevelev AB, Sineoky SP (2004). Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. FEMS Microbiology Letter 236: 283-290.

Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization

Sarikhani M.R.[1*], Malboobi M.A.[2], Ebrahimi M.[3]

[1]Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[3] PhD Student, Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, Iran.

Abstract:

Phosphorus is one of the major plant nutrients that is least available in the soil. There are two components of P in soil, organic and inorganic phosphate. Plant growth-promoting bacteria (PGPR) are soil and rhizosphere bacteria that can benefit plant growth by different mechanisms. The ability of some microorganisms to convert insoluble P to an accessible form, like orthophosphate, is an important trait in a PGPR for increasing plant yields. The use of phosphate solubilizing bacteria as inoculants simultaneously increases P uptake by the plant and crop yield. Strains from the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Rhizobium* are among the most powerful phosphate solubilizers. The principal mechanism for mineral phosphate solubilization is the production of organic acids, and acid phosphatases play a major role in the mineralization of organic phosphorous in soil. The main method for isolation PSB is carrying out by using insoluble organic and inorganic phosphate source in solid or liquid media with monitoring of production of free orthophosphate and decreasing pH in liquid media or production halo zone around colonies or production green, blue and yellow colonies in presence of chromogenic substrates in solid media. Although knowledge of the genetics of phosphate solubilization is still scanty, several phosphatase-encoding genes have been cloned and characterized and a few genes involved in mineral phosphate solubilization have been isolated. Molecular biology methods are a benefit approach to access and characterization of improved PGPR. Transfer and expression of phosphate (organic and inorganic phosphate) solvent encoding genes in bacteria or plants, is a new way for improving of microorganism capacitance as an inoculant.

Key words: *phosphate solubilizing bacteria, phosphatase, phytase, organic acids*.

* Corresponding Author: Sarikhani M.R. Tel: 09173512394 Email: rsarikhani@yahoo.com