

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات معادن فسفاتی و بررسی پتانسیل آن‌ها در انحلال فسفات خاک

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

چکیده

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از دو معدن فسفاتی و بررسی توانایی انحلال فسفات خاک توسط آنها بود. با به‌کارگیری محیط اسپریر مایع غنی‌شده با فسفات خاک اسفوردی و سری رقت‌سازی در محیط اسپریر جامد غنی‌شده با این فسفات خاک، ۸۵ کلنی با مورفولوژی‌های متفاوت، جداسازی و خالص‌سازی شدند. چهار جدایه از ۸۵ جدایه (Rpy از معدن اسفوردی، Ggd/4 و Rpd/4، Tkd/4 از معدن جیروود) با بالاترین مقدار فسفر حل‌شده در محیط کشت اسپریر مایع به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب گردیدند. با استفاده از توالی یابی ژن *16S rRNA* جدایه‌های Rpd/4، Tkd/4، Rpy و Ggd/4 با ۹۹ درصد مشابهت با شماره دسترسی‌های به‌ترتیب MW646604، MW646605، MW646606 و MW646607 به‌ترتیب، *Bacillus pumilus*، *Curtobacterium flaccumfaciens*، *Sphingobium yanoikuyae* و *Pantoea agglomerans* تشخیص داده شدند. آزاد سازی چندین برابری فسفر توسط این جدایه‌ها نسبت به‌شاهد، از سه منبع فسفاتی (تری کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و فسفات خاک) نشان داد، که این باکتری‌ها توانایی انحلال منابع فسفاتی دیگری را نیز دارند.

واژه‌های کلیدی: تری کلسیم فسفات، فسفات خاک، فیتات کلسیم، معدن فسفات اسفوردی یزد، معدن فسفات جیروود شمشک

- ۱- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران و مربی پژوهشی بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- ۲- استاد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(نویسنده مسئول: a.samadi@urmia.ac.ir)
- ۳- دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- ۴- دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۵- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مقدمه

مقدار فسفر (P) کل خاک عموماً در حدود ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک است و تنها بخش کوچکی از آن (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و یا کمتر) برای رشد گیاه، در دسترس قرار دارد. بخش بسیار بزرگتری از فسفر نیز به شکل خاک‌های فسفات و سایر رسوبات است که توسط گیاهان قابل جذب نیستند (Goldstein, 1994). خوشبختانه ریزجانداران خاک به‌ویژه ریزجانداران حل‌کننده فسفات، این ترکیبات غیرمحلول فسفر را تحت تأثیر قرار داده و به‌طور مؤثر فسفر را از این ترکیبات آزاد (Rodriguez & Fraga, 1999) و به اشکال محلول در اختیار گیاهان قرار می‌دهند. بر اساس گزارش‌های موجود، در این فرآیند برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای نقش ویژه و منحصر به‌فردی هستند (Babana & Antoun, 2006). در سیستم کشاورزی پایدار، انحلال میکروبی فسفر مورد توجه بیشتری قرار می‌گیرد (Singh & Reddy, 2011) و همچنین، مشخص شده است که افزایش کارایی فسفات‌خاک با به‌کارگیری مستقیم باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان کود، می‌تواند به کاهش تقاضای کودهای فسفوری در کشورهای در حال توسعه کمک نماید. گزارش‌های متعددی در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از زیستگاه‌های مختلف همچون خاک (Mendoza-Arroyo et al., 2020; Liu, 2019); ریشه‌سپهر (رایزوسفر) (Zhang et al., 2019; Pérez-Rodríguez et al., 2020; Teng et al., 2018; Babu et al., 2017); کمپوست (Haouas et al., 2020) و معادن فسفات‌خاک (Yadav et al., 2015; Azaroual et al., 2020) در سایر نقاط جهان در دسترس می‌باشند.

بر اساس نتایج آزمایشی در چین، جدایه YC (*Stenotrophomonas maltophilia*) جداسازی‌شده از معدن فسفاتی هوبی چین توانست تری‌کلسیم‌فسفات را حل و فسفر محلول را در محیط کشت (National Botanical Research Institute's phosphate آزاد کند (Xiao et al., 2009). نتایج مطالعاتی در اندونزی نشان داد که باکتری *Serratia* ایزوله QC3.a.2 جداسازی شده از یک معدن، بالاترین توانایی حل فسفر در محیط مایع پیکوواسکایا را دارد (Mursyida et al., 2015). از ۱۱۰ باکتری حل‌کننده فسفات جداسازی شده از معادن فسفات‌خاک غنی از اکسیدهای آهن و آلومینیوم هندوستان، دو باکتری از جنس *Bacillus* و *Brevibacillus* بودند (Yadav et al., 2015).

در بررسی توانایی انحلال فسفات ریزجانداران، از دو روش کیفی و کمی استفاده می‌شود. در روش کیفی قطر هاله و یا نسبت قطر هاله‌ی شفاف به قطر کلنی در محیط کشت جامد (Liu et al., 2015) و در روش کمی، مقدار فسفر رهاسده در بخش مایع محیط کشت، معیاری برای سنجش توانایی انحلال فسفات در ریزجانداران است (Paul & Sinha, 2013). گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، اگرچه در انحلال تری‌کلسیم‌فسفات بسیار مؤثر هستند، اما قادر به تولید هاله در پلیت آگارهای حاوی فسفات آهن و یا فسفات آلومینیوم (Puentes et al., 2004; Perez et al., 2007) و فسفات‌خاک

(Yadav et al., 2015) همچنین گزارش شده است که جدایه‌هایی که قادر به نشان‌دادن هیچ‌گونه هاله در محیط جامد آگار نیستند، قادر به انحلال اشکال مختلف فسفر در کشت مایع بودند (Gupta et al., 1994).

بر اساس سوابق ذکر شده احتمالاً معادن فسفاتی ایران نیز زیستگاه‌های ناشناخته‌ای برای تعداد زیادی از ریزجانداران به ویژه حل‌کننده‌های فسفات نامحلول هستند که به جداسازی آنها از این معادن کمتر توجه شده است. از طرفی در ایران در اغلب تحقیقات، فسفات‌خاک معدن اسفوردی یزد به‌عنوان یکی از منابع فسفوری نامحلول با خلوص بالا بکار رفته است (حیاتی و همکاران، ۱۳۹۰). معدن فسفاتی اسفوردی یزد مهم‌ترین معدن فسفات آذرین کشور است که با تولید سالانه حدود ۷۰ هزار تن کنستانتره فسفات، به‌عنوان باکیفیت‌ترین تولیدکننده فسفات در منطقه محسوب می‌شود. البته معادن دیگری نیز وجود دارند که رسوبی بوده و خلوص پایینی از فسفات را دارا هستند که معادن فسفات جیروود شمشک، لار و چادرمو از آن جمله هستند. با توجه به موارد ذکر شده، هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از دو معدن فسفات‌خاک جیروود شمشک و اسفوردی یزد با استفاده از محیط اسپربر (Sperber) مایع و جامد اصلاح شده با فسفات‌خاک اسفوردی یزد و ارزیابی توان انحلال فسفات آن‌ها با به‌کارگیری سه منبع مختلف کم‌محلول و نامحلول فسفاتی شامل تری‌کلسیم‌فسفات، فیتات کلسیم و فسفات‌خاک در محیط اسپربر مایع بود.

مواد و روش‌ها

محل و روش نمونه‌برداری

معدن فسفات منطقه جیروود از توابع شمشک در ۴۵ کیلومتری شمال تهران در بخش مرکزی رشته کوه‌های البرز (طول جغرافیایی $30^{\circ} 51'$ و عرض جغرافیایی $00^{\circ} 36'$) واقع شده است. افق فسفاتی معدن منطقه‌ی جیروود شمشک شامل چندین لایه ماسه فسفات‌خاکی است که در یک واحد شیلی متورق سیاه جای گرفته است. آپاتیت و کوارتز کانی‌های اصلی و کلسیت، پیریت، اکسیدهای آهن و کانی‌های رسی کانی‌های فرعی این سازند هستند (مقدسی، ۱۳۹۵).

معدن فسفات‌خاک اسفوردی یزد نیز در ۲۶ کیلومتری شمال شرق شهر بافق یزد در طول جغرافیایی $35^{\circ} 55'$ شرقی و عرض جغرافیایی $48^{\circ} 31'$ شمالی واقع شده است. افق اصلی این معدن نیز شامل مجموعه‌هایی از کانی‌های آهن و آپاتیت و همچنین ترمولیت و اکتینولیت است (پاکنژاد، ۱۳۷۰).

برای تهیه نمونه‌های خاک چهار نمونه از خاک اطراف و رایزوسفر دو گیاه (*Glaucium oxylobum*, *Rumex scutatus*) (L. معدن فسفات‌خاک منطقه جیروود و یک نمونه از خاک اطراف معدن فسفات‌خاک اسفوردی یزد در سه تکرار برداشته شد. مساحت مناطق نمونه‌برداری در هر تکرار (۲۵ متر × ۲۵ متر در منطقه با فاصله ۱۰ متری از منطقه نمونه برداری دیگر) بود.

نمونه‌های خاک از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری سطح خاک توسط کوور سمپلر (رینگ نمونه‌برداری) با دهانه‌ی ۴ سانتی‌متر پس از کنار زدن بقایای سطحی ۳ سانتی‌متر بالا و نمونه‌های رایزوسفری از محل رایزوسفر ریشه‌ی گیاهان (با جداسازی خاک اطراف ریشه با برس) تهیه شد (Hamdali *et al.*, 2012). نمونه‌ها چون در سه تکرار برداشته شده بودند پس از اختلاط نمونه‌های مشابه، چهار نمونه از معدن جیروود شمشک و یک نمونه از معدن اسفوردی یزد تهیه شد. نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی استریل قرار داده شدند و با یک باکس خنک فوراً به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

هر نمونه خاک به‌طور جداگانه به‌خوبی مخلوط و از الک دو میلی‌متری عبور داده‌شد. یک گرم از خاک هر نمونه به‌طور جداگانه به محیط اسپربر مایع (ترکیبی از ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر (Yeast extract)، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم (CaCl₂)، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزوم (MgSO₄.7H₂O) و ۲/۷ گرم فسفات خاک اسفوردی یزد به‌جای ۲/۵ گرم تری‌کلسیم‌فسفات در یک لیتر) اضافه گردید (Sperber, 1958). نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۲۷ درجه سلسیوس تکان داده شدند.

برای تهیه کلنی‌ها یک میلی‌لیتر از هر نمونه، به‌صورت سری رقت در پتری‌دیش‌های حاوی محیط اسپربر جامد (محتویات ذکر شده در فوق به‌همراه ۱۵ گرم آگار در یک لیتر) پلیت شدند. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۷ شبانه‌روز در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس در گرم‌خانه نگهداری شدند. ۸۵ کلنی مختلف که مورفولوژی‌های متفاوتی را نشان دادند، به‌صورت جداگانه برداشته و خالص‌سازی شدند.

ارزیابی کمی انحلال فسفات خاک توسط جدایه‌ها

برای اندازه‌گیری توانایی کمی انحلال جدایه‌ها از محیط اسپربر مایع استفاده شد. بدین منظور ابتدا همه‌ی ۸۵ جدایه در محیط LB (Luria-Bertoni) کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه شیکردار با ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از هر محیط LB حاوی جدایه‌ها (با چگالی نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع به‌طور جداگانه مایه‌زنی شد و برای ۷ روز به گرم‌خانه شیکردار با ۱۲۰ rpm و دمای ۲۷ درجه سلسیوس منتقل گردید. سپس، ۲ میلی‌لیتر از هر محیط اسپربر برداشته و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm، سانتریفیوژ (UniCen, 15 DR, Herolab GmbH, Germany) شد، تا از محلول شفاف بدست آمده غلظت فسفر حل‌شده اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری غلظت فسفر با روش مولیبدات وانادات (Paul & Sinha 2013) انجام شد. چهار جدایه (Ggd/4, Rpd/4, Tkd/4) و Rpy) با بالاترین مقدار فسفر حل‌شده به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب گردیدند.

ارزیابی و مقایسه توانایی انحلال فسفات جدایه‌های برتر به صورت کمی با به کارگیری سه منبع مختلف فسفاتی

بر اساس گزارشات موجود جداسازی‌ها و آزمایش‌ها برای در نظر گرفتن سهم مستقیم گیاهان از فسفر، تنها بر اساس یک کانی غیر واقعی است، زیرا حداقل ۳۰ تا ۷۰ درصد از کل فسفر خاک‌های کشاورزی، فسفر آلی است (Rengel, 1999) و علاوه بر آن سایر اشکال معدنی فسفر مانند تری کلسیم فسفات، اکتاکلسیم فسفات، دی کلسیم فسفات، فسفات‌های آهن و آلومینیم و غیره نیز در خاک وجود دارند. بر این اساس با انجام آزمایشی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفر سه منبع مختلف فسفاتی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در چارچوب طرح آماری کاملاً تصادفی با دو فاکتور جدایه: Tkd/4, Rpy و Ggd/4, Rpd/4 و شاهد (بدون باکتری) و فاکتور منبع فسفاتی: تری کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و فسفات خاک، در محیط کشت اسپربر مایع در سه تکرار انجام شد.

بدین منظور چهار جدایه برتر حاصل از ارزیابی کمی انحلال فسفات خاک به مدت ۴۸ ساعت در محیط LB در گرم‌خانه رشد داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر محیط LB حاوی جدایه‌ها (با چگالی نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ارلن های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط اسپربر که در آن سه منبع فسفاتی (فسفات خاک یزد، فیتات کلسیم و تری کلسیم فسفات) به طور جداگانه استفاده شده بود مایه‌زنی و برای ۷ روز به گرم‌خانه‌ی شیکردار با ۱۲۰ rpm و دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس منتقل گردید. سپس، ۲ میلی‌لیتر از هر محیط اسپربر را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، تا از محلول شفاف به دست آمده غلظت فسفر حل‌شده اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری غلظت فسفر با روش مولیبدات وانادات (Paul, & Sinha, 2013) انجام شد. pH و EC هر نمونه نیز به ترتیب با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm مدل 691) و EC متر (JENWAY مدل 4510) قرائت شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات با استفاده از توالی یابی ژن 16S rRNA

به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید. برای تکثیر ژن مورد نظر یک میکرولیتر از آغازگرهای F27 و R1492 با غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر، ۴ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر، ۵ میکرولیتر منیزیم کلرید با غلظت ۵۰ میلی‌مول بر لیتر، یک میکرولیتر DNA تک پلی‌مرز (۵ واحد بر میکرولیتر) و دو میکرولیتر از DNA استخراج شده استفاده شد. مخلوط واکنش PCR (USA Biorad) ۵۰ میکرولیتر بود (Turan et al., 2006). شرایط انجام PCR به صورت زیر تنظیم گردید:

واسرشتت اولیه (denaturation Initial) در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه واسرشتت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۳ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و گسترش (Extension) در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۷ دقیقه.

محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد v/v در بافر TBE 1X با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت عبور داده شد. سپس ژل تحت نور UV نمایان شده و با استفاده از دستگاه ژل داک تصویر ژل ثبت گردید. مقایسه باند تکثیرشده با یک نشانگر DNA به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر بخش موردنظر ژنوم را نشان داد.

توالی‌یابی ژن 16S rRNA باکتری‌ها و آنالیز فیلوژنی

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA این جدایه‌ها با استفاده از کیت خالص‌سازی خالص شده و به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و یک توالی کانتیگ برای هر جدایه به دست آمد. سپس این توالی‌های کانتیگ در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند. تعداد مناسبی از توالی‌های ژن 16S rRNA برای هر کدام از سویه‌های باکتری از طریق این پایگاه انتخاب و سپس به کمک نرم‌افزار MEGA 5.1 بین این توالی‌ها و توالی‌های ۴ جدایه باکتری هم‌ردیفی انجام شد. با استفاده از این نرم‌افزار، درخت فیلوژنتیکی به وسیله روش neighbor joining ترسیم و میزان صحت آن با روش bootstrap تعیین شد (Stocklin, 1968). در پایان و پس از شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، توالی ژن 16S rRNA همه آنها در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ثبت و شماره دسترسی (Accession number) برای هر یک از آنها به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل آماری شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

مرحله خالص‌سازی جدایه‌ها نشان داد همه ۸۵ جدایه که قادر به رشد در محیط جامد اسپربر غنی شده با فسفات‌خاک اسفوردی یزد بودند در این محیط هاله ندادند. بر اساس گزارشات موجود، سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، قادر به تولید هاله شفاف در پلیت آگارهای حاوی فسفات‌خاک (Yadav *et al.*, 2015) نیستند. از طرفی گزارش شده است جدایه‌هایی که قادر به

ایجاد هیچ‌گونه هاله قابل مشاهده در محیط جامد آگار نیستند، قادر به انحلال اشکال مختلف فسفر در کشت مایع بودند (Gupta *et al.*, 1994). بر همین اساس جدایه‌های برتر بر اساس توانایی انحلال فسفات‌خاک در محیط مایع اسپربر غنی شده با فسفات-خاک اسفوردی یزد انتخاب و پس از آن این توانایی با استفاده از سه منبع فسفاتی با انجام یک آزمایش آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. هاله شفاف جدایه Rpy روی پلیت اسپربر با منبع فیتات کلسیم در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱: توانایی انحلال فسفات (ایجاد هاله) توسط جدایه Rpy در محیط اسپربر جامد اصلاح شده با فیتات کلسیم

نتایج تجزیه واریانس تاثیر جدایه‌ها بر انحلال فسفات در سه منبع فسفاتی در محیط کشت اسپربر مایع (جدول ۱) نشان دادند، اثر ساده سویه باکتری، منبع فسفاتی و برهمکنش آن‌ها بر ویژگی‌های فسفر حل‌شده، pH و EC معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$).

بر اساس مقایسه میانگین فسفر حل‌شده (جدول ۲) بیشترین انحلال فسفر توسط جدایه‌ها به ترتیب از منابع فسفاتی تری‌کلسیم‌فسفات، فیتات کلسیم و فسفات‌خاک اتفاق افتاد. به‌طوریکه بیشترین مقدار فسفر حل‌شده از کانی تری‌کلسیم‌فسفات توسط دو جدایه Rpy و Tkd/4 به ترتیب به مقدار ۳۷۲ و ۳۶۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. پس از آن دو جدایه Ggd/4 و Rpd/4 از منبع فیتات کلسیم بیشترین مقدار فسفر حل‌شده را به ترتیب به مقدار ۳۳۰ و ۳۱۵ میلی‌گرم بر لیتر آزاد نمودند. بدین ترتیب تواناترین جدایه در انحلال تری‌کلسیم‌فسفات دو جدایه Rpy و Tkd/4، فیتات کلسیم جدایه Ggd/4 و فسفات‌خاک جدایه Rpy با مقدار ۸۲/۶۷ میلی‌گرم در لیتر فسفر حل‌شده بودند. نتایج یک جداسازی از معادن فسفات‌خاک غنی از اکسیدهای آهن و آلومینیوم در هندوستان نشان داد که از ۱۱۰ جدایه حل‌کننده فسفات جداسازی شده از این معادن دو باکتری *Brevibacillus* و *Bacillus* بیشترین توانایی را در انحلال منابع فسفاتی به‌کار برده شده داشتند (Yadav *et al.*, 2015). بر اساس نتایج آزمایشی در چین جدایه *Stenotrophomonas maltophilia* YC جداسازی شده از معدن فسفاتی هوبی چین تری‌کلسیم‌فسفات را حل و باعث رهاسازی فسفر در محیط رشد NBRIP شد (Weisburg *et al.*, 1991). نتایج بررسی‌های خوشرو و ساریخانی (۱۳۹۶) نیز نشان داد انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم‌فسفات، در مقایسه با فسفات‌خاک بیشتر بود. سویه Rpy که از معدن اسفوردی یزد جداسازی شده بود با توجه به نوع فسفات‌خاک به‌کاررفته در محیط کشت (فسفات‌خاک اسفوردی یزد)، توانایی بیشتری در انحلال فسفات‌خاک نسبت به جدایه‌های منطقه‌ی جیرود شمشک نشان داد و این فرض را ایجاد نمود که ممکن است از نظر اکولوژیکی

سازگاری سویه‌ها در انحلال فسفات‌خاک زیست‌گاه خود بیشتر از فسفات‌خاک غیر زیست‌گاه خود باشد (Xiao *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2020)، هرچند این ادعا نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد. در گزارشی به اختلاف منشأ جداسازی سویه‌ها و تأثیر آن بر بروز تفاوت در انحلال منبع فسفاتی اشاره شده است (Yadav *et al.*, 2015)، ضمن اینکه گوپتا و همکاران (Gupta *et al.*, 2007) نیز ضمن تأکید بر تفاوت سویه‌ها در انحلال منابع فسفاتی با توجه به منشأ جداسازی سویه‌ها، بر تحمل ریزجاندار جداسازی شده از هر منشأ به نوع عناصر (فلز) موجود در زیست‌گاه خود اشاره کرده‌اند.

جدول ۱: تجزیه واریانس فسفر حل‌شده، pH و EC در محیط‌های کشت تحت تأثیر جدایه‌ها و منبع فسفاتی

منابع تغییر	درجه آزادی	فسفر حل‌شده	pH	EC
جدایه باکتری	۴	۴۳۳۱۶**	۸/۰۴**	۶۸۵۴۳**
منبع فسفاتی	۲	۱۷۷۹۷۴**	۰/۴۲**	۱۱۵۴۰۵**
جدایه‌ی باکتری* منبع فسفاتی	۸	۲۲۳۲۰**	۱/۹۶**	۴۰۵۶۶**
خطا	۲۸	۱۸	۰/۰۱	۹۶
ضریب تغییرات		۲/۳۴	۱/۳۷	۱/۳۵

* و **: به ترتیب وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های فسفر حل‌شده (میلی‌گرم بر لیتر) از سه منبع فسفاتی پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

منابع فسفات				
ردیف	جدایه	تری کلسیم فسفات	فیتات کلسیم	فسفات‌خاک
۱	شاهد	۱۰۹/۶۷f	۶۱/۶۷h	۴۱/۶۷i
۲	Ggd/4	۲۵۲e	۳۳۰b	۶۴/۳۳h
۳	Rpd/4	۲۶۲/۶۷e	۳۱۵/۳۳c	۶۵/۳۳h
۴	Rpy	۳۷۲a	۲۹۳/۶۷d	۸۲/۶۷g
۵	Tkd/4	۳۶۵a	۸۲g	۵۶/۳۳h

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

میانگین‌های داده‌های pH (جدول ۳) نشان داد که بیشترین کاهش pH به مقدار ۳/۳۰ واحد توسط جدایه Tkd/4 از منبع فسفات‌خاک و کمترین کاهش pH به مقدار ۶/۹۶ واحد توسط جدایه Ggd/4 از منبع فیتات کلسیم اتفاق افتاد. در آزمایشی مشابه بیشترین میزان کاهش pH از فسفات‌خاک توسط سویه‌های مورد استفاده به مقدار ۳/۰ واحد گزارش گردید (Kennedy & Smith, 1995). تواناترین جدایه در کاهش pH فسفات‌خاک و تری کلسیم فسفات، جدایه Tkd/4 و فیتات کلسیم جدایه Rpy بود. هرچند جدایه Tkd/4 با وجود کاهش pH فسفات‌خاک به مقدار ۳/۳ واحد نتوانست فسفر زیادی از این منبع نسبت به شاهد آزاد نماید، اما همین جدایه از منبع فسفاتی تری کلسیم فسفات ۳/۵ برابر شاهد فسفر آزاد نمود و یا هرچند تأثیر جدایه Rpy بر کاهش pH از منبع فیتات کلسیم بیشتر از جدایه Ggd/4 بود اما مقدار فسفر آزادشده توسط جدایه Ggd/4 ۳۰ درصد بیش از جدایه Rpy از این منبع بود. به نظر می‌رسد شاید بتوان این موارد را به تفاوت سازوکارهای انحلال و ماهیت منبع فسفاتی و

توانایی موجودات درگیر در فرآیند انحلال نسبت داد (Oliveira *et al.*, 2009). به عقیده کائو و همکاران (Cao *et al.*, 2018)، این تفاوت علاوه بر تفاوت توان انحلال فسفر نامحلول سوپه‌ها ممکن است به تفاوت مقدار مصرف فسفر این باکتری‌ها نیز بستگی داشته باشد. ایشان همچنین این تفاوت را به تفاوت پتانسیل جذب فسفر باکتری‌ها از محیط نسبت دادند و نتیجه گرفتند، مصرف زیاد فسفر و سنتز بیولوژیکی آن، باعث کاهش فسفر محلول در محیط مایع خواهد شد. مقایسه میانگین‌های EC (جدول ۴) نشان داد که بیشترین EC از کانی تری کلسیم فسفات به مقدار ۰/۹۷۳ دسی‌زیمنس بر متر توسط جدایه Rpy تولید شد که ۱/۴ برابر شاهد بود. دو جدایه Rpy و Rpd/4، EC فیتات کلسیم را به یک اندازه بالا بردند و بالاترین EC را از این کانی تولید نمودند. همه جدایه‌ها نسبت به شاهد‌های خود باعث افزایش معنی‌دار EC از منابع تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم شدند، اما هیچکدام از جدایه‌ها از نظر EC تولیدی از کانی فسفات خاک، تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. به‌طور کلی با کاهش pH مقدار EC افزایش یافت، که نشان دهنده‌ی انحلال بیشتر فسفر بود. گرچه این افزایش در مواردی از روند خاصی تبعیت نمود که می‌توان آن را به ماهیت انحلال پذیری منبع فسفاتی و سازوکار متفاوت باکتری‌های به‌کار گرفته شده در انحلال فسفات، نسبت داد (Oliveira *et al.*, 2009). در آزمایشی، تلقیح با باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات باعث کاهش pH محلول، فسفر و مقدار EC در محیط شد (Tomer *et al.*, 2017). اگرچه اسیدی شدن محیط، یکی از مکانیسم‌های شناخته‌شده در آزادسازی فسفر معدنی است که در بسیاری از مطالعات انجام شده با انواع ریزموجودات از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها، دیده شده است (Gothwal *et al.*, 2006; Singh & Reddy, 2011). اما با این وجود، کاهش PH حتماً به معنای توانایی بیشتر برای حل فسفر نیست (li *et al.*, 2019). در همین رابطه در حالی که مطالعات کیمی و همکاران (Qimei *et al.*, 2000) ارتباط معنی‌داری بین pH محیط کشت و توانایی حل شدن P را نشان داد، آسا و همکاران (Asea *et al.*, 1988) فقدان همبستگی یا فقط یک ارتباط ضعیف بین pH و انحلال فسفات را گزارش کردند.

جدول ۳: مقایسه میانگین تغییرات اسیدیته (pH) محیط‌های کشت پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

منابع فسفات			جدایه	ردیف
فسفات خاک	فیتات کلسیم	تری کلسیم فسفات		
۶/۱۳cd	۶/۶۹b	۵/۷۱e	شاهد	۱
۶/۲۶c	۶/۹۵a	۵/۹۵d	Ggd/4	۲
۶/۲۷c	۴/۳۱hi	۵/۵۹ef	Rpd/4	۳
۴/۱۲i	۴/۲۹i	۴/۷۲g	Rpy	۴
۳/۳۰j	۵/۴۴f	۴/۵۲gh	Tkd/4	۵

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

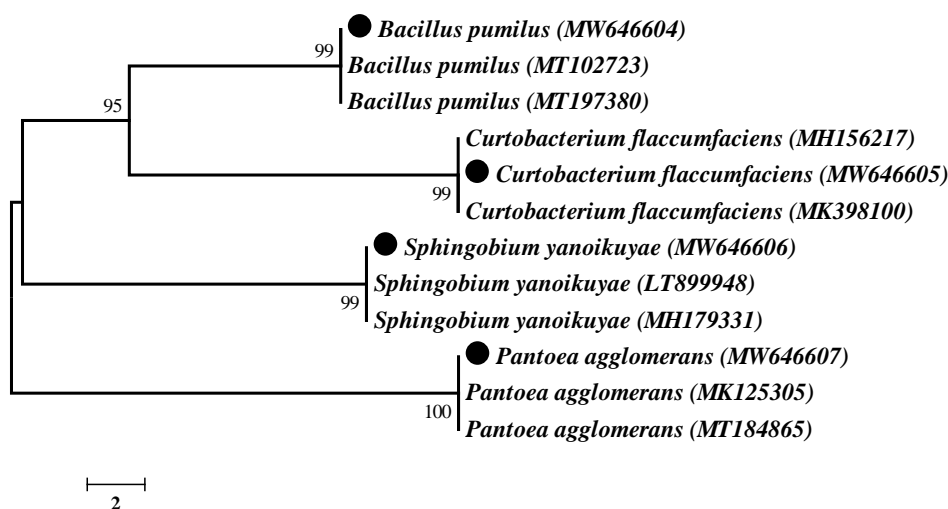
جدول ۴: مقایسه میانگین تغییرات هدایت الکتریکی (EC) محیط‌های کشت بر حسب دسی‌زیمنس بر متر پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

منابع فسفاتی			جدایه	ردیف
فسفات‌خاک	فیتات کلسیم	تری کلسیم فسفات		
۰/۶۴g	۰/۴۲h	۰/۷f	شاهد	۱
۰/۶۴g	۰/۷۸d	۰/۷۵de	Ggd/4	۲
۰/۶۲g	۰/۸۸bc	۰/۷۴e	Rpd/4	۳
۰/۶۴g	۰/۸۶c	۰/۹۷a	Rpy	۴
۰/۶۵g	۰/۶۵g	۰/۹۰b	Tkd/4	۵

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

توالی نوکلئوتید و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

استفاده از روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی 16S rRNA منجر به شناسایی دقیق‌تر جوامع باکتریایی می‌شود. در این پژوهش، از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA برای شناسایی چهار جدایه باکتری برتر در انحلال فسفات استفاده شد. برای مقایسه توالی‌های 16S rRNA سویه‌ها با توالی‌های موجود، از Blastn پایگاه NCBI استفاده شد و سطح بالایی از همانندی (≥۹۹) برای تعریف همه جدایه‌ها به دست آمد. در بسیاری از پژوهش‌ها از روش 16S rRNA برای تعریف باکتری‌های حل‌کننده فسفات استفاده شده است (Weisburg *et al.*, 1991). درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌های 16S rRNA جدایه‌ها نشان داد که ۴ باکتری برتر در ۴ گونه متفاوت متعلق به ۴ جنس دسته‌بندی شدند (شکل ۲). بر این اساس جدایه‌های Rpy، Tkd/4، Rpd/4 و Ggd/4 با بیش از ۹۹ درصد مشابهت به ترتیب، *Bacillus pumilus*، *Curtobacterium flaccumfaciens*، *Sphingobium* و *yanoikuyae* و *Pantoea agglomerans* با شماره دسترسی‌های به ترتیب MW646604، MW646605، MW646606 و MW646607 معرفی شدند.



شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA درخت فیلوژنتیکی به‌وسیله روش neighbor joining ترسیم شده است. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر bootstrap (درصد) را نشان می‌دهند که بر اساس ۱۰۰۰ تکرار است. شماره دسترسی GenBank برای هر باکتری در داخل پرانتز آورده شده است. علامت دایره تیره نشان‌دهنده جدایه‌های باکتریایی شناسایی شده، در این مطالعه است.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق چهار جدایه انتخاب شده از منابع فسفاتی به‌کار رفته، چندین برابر شاهد سفر آزاد نمودند. جدایه *Bacillus pumilus* Rpy جداسازی شده از معدن اسفوردی یزد، نسبت به جدایه‌های منطقه‌ی جیرود شمشک توانایی بیشتری در انحلال فسفات خاک اسفوردی یزد نشان داد و این فرض را ایجاد نمود که از نظر اکولوژیکی ممکن است سازگاری سویه‌ها در انحلال فسفات خاک زیستگاه خود بیشتر از فسفات خاک غیر زیستگاه خود باشد. هرچند این ادعا نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان دادند معادن فسفاتی ایران زیستگاه‌های خوبی برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات هستند که علاوه بر توانایی انحلال فسفات خاک، توانایی انحلال فسفات‌های دیگر نظیر فیتات کلسیم و تری‌کلسیم فسفات را نیز دارند.

منابع

- حیاتی، م.، قلی‌زاده، ع.، فلاح نصرت آباد، ع و رضوانی، م. ۱۳۹۰. تأثیر باکتری *coagulans Bacillus* و منابع مختلف سنگ فسفات بر گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). مجله دانش آب و خاک، ۲۱: ۱۲۷-۱۳۶.
- خوشرو، ب و ساریخانی، م (۱۳۹۶). جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاتی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). ۳۲: ۱۵۵-۱۶۷.

مقدسی، س.ج. (۱۳۹۵). کانی‌شناسی و زمین‌شیمی عناصر خاکی کمیاب نهشته فسفات جیروود در دره شمشک، شمال تهران.

فصلنامه علمی علوم زمین. ۲۶: ۳۱۳-۳۲۴.

پاکنژاد، ح. (۱۳۷۰). اکتشافات تکمیلی کانسار اسفوردی. نقشه‌برداری ایران. ۸۹ صفحه. تهران.

Asea, P.E.A., Kucey, R.M.N. and Stewart, J.W.B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20: 459-464.

Azaroual, S.E., Hazzoumi, Z., Mernissi, N.E., Aasfar, A., Kadmiri, M. and Bouizgarne, B. (2020). Role of inorganic phosphate solubilizing bacilli isolated from moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphorus uptake. *Current Microbiology*, 77: 2391–2404.

Babana, A.H. and Antoun, H. (2006). Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant soil*, 287: 51-58.

Babu, S.V., Triveni, S., Reddy, R.S. and Sathyanarayana, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from maize rhizospheric soils. *Bulletin of Environment Pharmacolgy and Life Science*, 6: 194–200.

Cao, Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G. and Hu, Z. (2018). Phosphorus solubilizing and releasing bacteria screening from the rhizosphere in a natural wetland. *Water*, 10: 2. 195.

Goldstein, A.H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. 197-203. ASM Press, Washington, DC.

Gothwal, R.K., Nigam, V.K., Mohan, M.K., Sasmal, D. and Ghosh, P. (2006). Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants. *Indian Journal of Microbiology*, 46: Pp355.

Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40: 255-260.

- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R. and Kerkatta, D. (2007). Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botanica Croatica*, 66: 2. 197-204.
- Hamdali, H., Moursalou, K., Tchangbedji, G., Ouhdouch, Y. and Hafidi, M. (2012). Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *African Journal of Biotechnology*, 11: 312-320.
- Haouas, A., El Modafar, C., Douira, A., Ibnsouda-Koraichi, S., Filali-Maltouf, A., Moukhli, A. and Amir, S. (2020). *Alcaligenes aquatilis* GTE53: Phosphate solubilising and bioremediation bacterium isolated from new biotope "phosphate sludge enriched-compost". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28: 371-379.
- Kennedy, A.C. and Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and soil*, 170: 75-86.
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. and Mou, Z. (2019). Characteristics of inorganic phosphate-solubilizing bacteria from the sediments of a eutrophic lake. *International journal of environmental research and public health*, 16: 2141.
- Liu, S. (2019). Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. *Frontiers in microbiology*, 10: 2171.
- Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S. and Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96: 217-224.
- Mendoza-Arroyo, G.E., Chan-Bacab, M.J., Aguila-Ramírez, R.N., Ortega-Morales, B.O., Canché Solís, R.E., Chab-Ruiz, A.O. and Camacho-Chab, J.C. (2020). Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. itcb-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*, 10: 383.
- Mursyida, E., Mubarik, N.R. and Tjahjoleksono, A. (2015). Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing bacteria from the area around the limestone mining in Cirebon quarry. *Research Journal of Microbiology*, 10: 270.
- Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E. and Sá, N.M.H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1782-1787.

- Paul, D. and Sinha, S.N. (2013). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Advances in Applied Science Research*, 4: 409-412.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M. and Yarzabal, L.A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2905-2914.
- Perez -Rodriguez, M.M., Piccoli, P., Anzuay, M.S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T. and Cohen, A.C. (2020). Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. *Scientific reports*, 10: 15642.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y. and Lebsky, V.K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock weathering desert plants. I. root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6: 629-642.
- Qimei, L.I.N., Xiaorong, Z., Yanxin, S.U.N. and Jun, Y. (2000). Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems. *Soil and Environmental Sciences*, 9: 34-37.
- Rengel, Z. (1999). *Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications*. CRC Press.
- Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17: 319-339.
- Singh, H. and Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47: 30-34.
- Sperber, J.I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 782-787.
- Stocklin, J. (1968). Structural history and tectonics of Iran: a review. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 52:1229-1258.

- Teng, Z., Chen, Z., Zhang, Q., Yao, Y., Song, M. and Li, M. (2019). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 33976-33987.
- Tomer, S., Suyal, D.C., Shukla, A., Rajwar, J., Yadav, A., Shouche, Y. and Goel, R. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from Western Indian Himalayan soils. *3 Biotech*, 7: 1-5.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Şahin, F. (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 28: 99-108.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173: 697-703.
- Xiao, C.Q., Wu, X.Y. and Chi, R.A. (2015). Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus Niger* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 2. 518-528.
- Xiao, C., Zhou, Y., Hu, J., Guo, S., Zhou, N. and Chi, R. (2020). Biosolubilization of low-grade rock phosphate by native microbial consortia from phosphate mines: effect of sampling sources and culture media. *Geomicrobiology Journal*, 37: 9. 859-866.
- Xiao, C.Q., Chi, R.A., He, H. and Zhang, W.X. (2009). Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. *Journal of Central South University of Technology*, 16: 581-587.
- Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S. and Ghosh, P. (2015). Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their rock phosphate solubilizing abilities. *Geomicrobiology Journal*, 32: 475-481.
- Zhang, T., Hu, F. and Ma, L. (2019). Phosphate-solubilizing bacteria from safflower rhizosphere and their effect on seedling growth. *Open Life Sciences*, 14: 246-254.

Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate mines and investigation on their soil phosphate solubilization potential

Y. Karami¹, A. Samadi^{2*}, A. Fallah Nosrat Abad³, E. Sepehr⁴, M. Barin⁵

Received:2020.6.12

Accepted:2021.3.10

Abstract

This study aimed to isolate and characterize phosphate-solubilizing bacteria from two phosphate mines and to investigate their soil phosphate solubility ability. Eighty-five colonies with different morphologies were isolated and purified using the liquid Sperber culture medium enriched with Yazd' Esphordi soil phosphate (YESP) and a form of diluents series in the Sparber solid culture medium enriched with YESP. Four out of 85 isolates (Rpy: from Esfordi mine and Tkd/4, Ggd/4 & Rpd/4 from Jiroud mine) with the highest amount of dissolved phosphorus in the Sperber liquid medium enriched with YESP as superior isolates were selected. With using 16S rRNA gene sequencing the isolates Tkd/4, Rpd/4, Rpy and Ggd/4 were recognized very closely (more than 99%) to *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Bacillus pumilus*, and *Pantoea agglomerans* genera with access numbers MW646604 ,MW646605 ,MW646606 and MW646607 respectively. The multifold release of phosphorus by these isolates compared to the control from three phosphate sources showed that these bacteria can dissolve other phosphate sources.

Keywords: *Calcium phytate, Jiroud phosphate mine, Phosphate soil, Tricalcium phosphate, Yazd Esfordi phosphate mine*

1- PhD Student, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran and research Coach of Soil and Water Research Dept, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran

2- Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*(Corresponding author: a.samadi@urmia.ac.ir)

3- Associate Professor in Soil and Water Research Institute, AREEO, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

5- Assistant Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran