Archive of SID

بررسی روش‌های انحلال فسفات‌های نامحلول توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات

علیرضا فلاح نصرت آباد[1]

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **Rezafayah@yahoo.com**

دریافت: **99/4/15** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

فسفر یکی از مهمترین عناصر اصلی مورد نیاز گیاهان بوده و نقش‌های بسیار متعددی از جمله تولید و انتقال انرژی، افزایش ریشه‌زایی، تولید دانه و افزایش کمی و کیفی در گیاهان دارد. متاسفانه بیش از 70 درصد فسفر ورودی از طریق کودهای شیمیایی فسفاته به خاک، تثبیت شده و از دسترس گیاهان خارج می‌گردد. لذا تثبیت فسفر باعث مصرف هر چه بیشتر کودهای شیمیایی شده و مقدار فسفر کل خاک افزایش و گاهاً ممکن است ورود عناصر همراه کود فسفاتی باعث آلودگی خاک گردد. جهت افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول موجود در خاک یا برای جلوگیری از تثبیت فسفر می‌توان از ریزجانداران حل کننده فسفات دوستدار محیط زیست و اقتصادی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها استفاده کرد. این ریزجانداران با روش‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای معدنی، آلی، تولید پروتون، ترشح سیدروفور، کلاته‌کردن و تولید آنزیم فسفاتاز، قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند. در خاک‌های معدنی حاوی مقادیر زیاد فسفات‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیم، عمدتاً تولید اسیدهای معدنی و آلی و در خاک‌های آلی بیشتر آنزیم فسفاتاز مؤثر هستند. ژن‌های کدکننده حلالیت فسفات عمدتاً از باکتری‌های *Erwinia herbicola, Esherichia coli* و *Morgonella morgani* جداسازی شده‌اند. برخی از این ژن ها شامل **ushA, agp, cpdB, napA , هستند. برخلاف مشکلات موجود خوشبختانه پیشرفت‌های خوبی در زمینه مهندسی ژنتیک ریزجانداران حل‌کننده فسفات حاصل شده است به طوری که ژنهای حل‌کننده فسفات قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشند. با توجه به اینکه خاک‌ها حاوی هم ترکیبات معدنی و هم آلی هستند لذا پیشنهاد می‌شود از یک ریزجاندار با قابلیت انحلال هر دو ترکیب آلی و معدنی یا مخلوط دو یا چند ریزجاندار استفاده شود.**

واژه‌های کلیدی: فسفاتاز، ژن، مکانیسم، انحلال فسفات، اسیدهای آلی و معدنی

[1]. نویسنده مسئول، آدرس :کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی، ص .پ. 311-31785

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فسفر یکی از عناصر ضروری و مهم گیاهان است که تأثیر بسیاری زیادی در رشد گیاهان (وانگ و همکاران، 2009) از طریق تأثیر در فرآیندهای متابولیکی مانند تقسیم سلولی و نمو، انتقال انرژی، بیوسنتز ماکرومولکول‌ها، فتوسنتز و تنفس گیاهان دارد (شنای و کالاگودی، 2005؛ آحماد و همکاران، 2009 و خان و همکاران، 2009). منابع فسفر شامل کانی‌های اولیه و ثانویه و یا ترکیبات آلی می‌باشند. غلظت فسفر در محلول خاک در مقایسه با سایر عناصر بسیار پایین و بین 0/001 تا یک میلی‌گرم در لیتر است (بردی و ویل، 2002).

به‌طور کلی ترکیبات فسفر در خاک در سه گروه ترکیبات معدنی، ترکیبات آلی هوموس و ترکیبات آلی و معدنی همراه با سلول‌های زنده قرار می‌گیرند. ترکیبات معدنی فسفر معمولا شامل آلومینیوم، آهن، منیزیم، منگنز و کلسیم بوده و از خاکی به خاک دیگر فرق می‌کند. به‌عنوان مثال در خاک‌های اسیدی به‌صورت فسفات‌های آهن، آلومینیوم و منگنز و در خاک‌های قلیایی بیشتر به‌صورت ترکیبات کلسیم و منیزیم می‌باشد. امّا به‌طورکلی نوع ترکیبات فسفاته در خاک را pH خاک، نوع و غلظت کانی‌های خاک تعیین می‌کنند. برخی از مهم‌ترین کانی‌های فسفاتی در جدول 1 آورده شده است. حدود پنج درصد فسفر کل خاک به‌صورت آلی (مائو و همکاران، 2017؛ ریچاردسون، 1994) است و محدودهٔ آن در خاک‌های مختلف بین 4 تا 90 درصد (یاداو و ورما، 2012) می‌باشد. رایج‌ترین شکل فسفر در خاک‌ها اینوسیتول (اینوسیتول هگزا فسفات) است که بیشتر در دانه گیاهان وجود دارد و به‌عمل جوانه زدن کمک می‌کند.

فیتین (یک نمک کلسیم یا منیزیم اسیدفیتیک) فراوان‌ترین ترکیب آلی فسفاته در خاک است. سایر ترکیبات آلی فسفاتی شامل فسفات‌های قندی (خان و همکاران، 2014)، نوکلئوتیدها (0/2 تا 2/5 درصد)، فسفوپروتئین (بسیار کم)، فسفونات‌ها (تات، 1984) و فسفولیپیدها (5-1 درصد) (یاداو و ورما، 2012) هستند. در میان اشکال مختلف فسفر گیاهان بیشتر اشکال $H_2O_4^-$ و $H_2O_4^{-2}$ را جذب می‌کنند. مقدار فسفر قابل استفاده خاک نسبت به فسفر کل بسیار کم است. مقدار بیشتری از فسفر در خاک ثبیت می‌شود و مقادیر کمی از آن قابل دسترس گیاهان است (یاداو و ورما، 2012).

کمبود فسفر در گیاهان باعث کاهش رشد، برگ‌های تیره، کاهش گلدهی و کاهش نمو سیستم ریشه گیاه می‌شود. در بیشتر گیاهان این علائم زمانی که غلظت فسفر در برگ‌ها به کمتر از 0/2 درصد ظاهر می‌شوند و در بیشتر موارد کودهای شیمیایی فسفاتی یا کودهای آلی دارای فسفر جهت برطرف کردن کمبود فسفر استفاده می‌شود. اشکال نامحلول و غیرقابل دسترس فسفر از طریق فرآیندهای حلالیت (فسفر معدنی) و معدنی شدن (فسفر آلی) به اشکال فسفات محلول تبدیل می‌شوند. در طی ایموبیلیزاسیون، ریزجانداران شکل معدنی فسفر را به فسفر آلی تبدیل کرده و جزیی از سلول‌های زندهٔ آنها محسوب می‌شود. معدنی شدن و آلی شدن به‌طور همزمان انجام می‌شود و عوامل مختلفی مانند ساختار و ترکیب میکروب‌ها، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌ها و ترشحات ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی در آن مؤثر هستند.

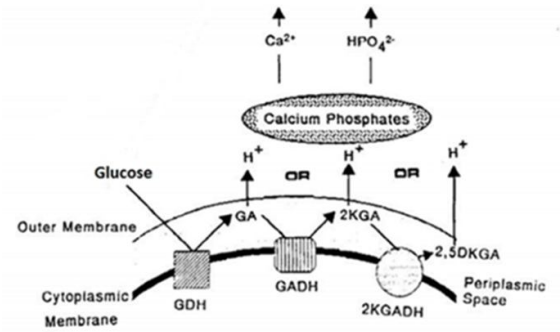
خاک یک محیط پایه و طبیعی برای رشد میکروبی است، به طوری که یک گرم از آن حدود 10^1 تا 10^{10} باکتری دارد که وزنی حدود دو تن در هکتار می‌باشد (خان و همکاران،2009). ریزجانداران حل‌کننده فسفات گروهی از ریزجانداران مفید هستند که قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند و به رده، جنس و گونه خاصی اطلاق نمی‌گردند. آنها به دو گروه عمده باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات تقسیم می‌شوند که باکتری‌ها 50-1 درصد جمعیت میکروبی و قارچ‌ها 0/01 تا 0/5 درصد از آنرا تشکیل می‌دهند (والپولا و یون،2012؛ خان و همکاران، 2009 و چن و همکاران، 2006).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- انواع کانی‌های فسفاتی در خاک‌های اسیدی، خنثی و قلیایی(ریچاردسون، 1994)

نوع خاک	نام کانی	ترکیب شیمیایی
خاک‌های اسیدی	استرنگایت	$FePO_4.2H_2O$
	وریسایت	$AlPO_4.2H_2O$
خاک های آهکی و خنثی	B-تری‌کلسیم فسفات	$Ca_3(PO4)_2$
	دی‌کلسیم فسفات	$CaHPO_4$
	دی‌کلسیم فسفات هیدراته	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
	فلوروآپاتیت	$Ca_5(PO4)_3\ F$
	هیدروکسی آپاتیت	$Ca_5(PO4)_3\ OH$
	اکتاکلسیم فسفات	$Ca_4H(PO_4)_3 \cdot 2–5\ H2O$



شکل 1- مسیر اکسیداسیون مستقیم در انحلال فسفر نامحلول (Goldstein, 1995)
(GDH: گلوکز دهیدروژناز، GADH: گلوکونیک اسید دهیدروژناز، 2KGADH: 2- کتوگلوکونیک اسید دهیدروژناز، 25DKGA: 5 و2 دیکوکتوگلوکونیک اسید، GA: گلوکونیک اسید، 2KGA: 2-کتوگلوکونیک اسید)

در میان آنها باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، و ریزوبیوم و قارچ‌های پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس و هم چنین قارچ‌های میکوریز بسیار قابل توجه و مهم هستند (والپولا و یون،2012). در واقع توانایی انحلال فسفات، مربوط به گروهی از ریزجانداران است که طی میلیون‌ها سال زندگی در محیط‌هایی با کمبود فسفر قابل دسترس، موفق به رشد و تکثیر در چنین شرایطی شده‌اند. ریزجانداران مذکور فسفر مورد نیاز خود را با تغییر مسیرهای متابولیسمی، تغییر نفوذ-پذیری غشای پلاسمایی و هم چنین سنتز آنزیم، بدست می‌آورند (گلدستاین[1]، 1995).

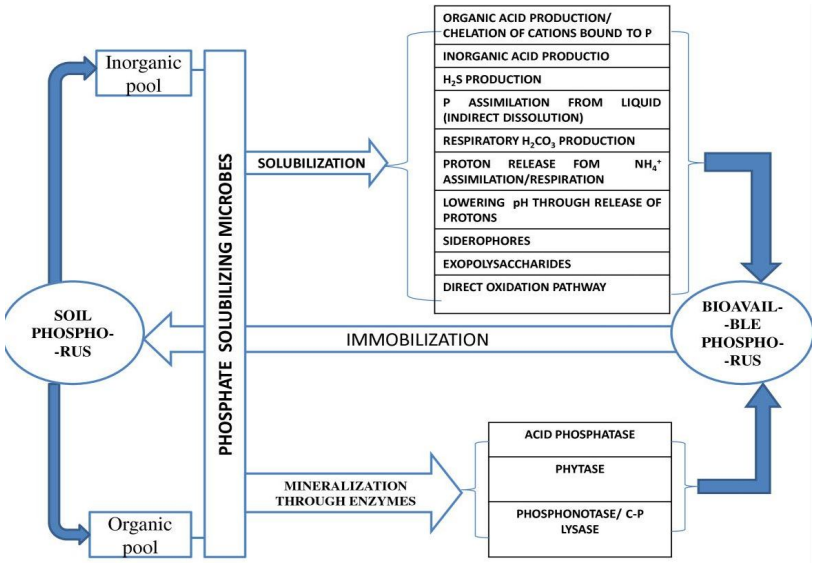
ریزجانداران حل‌کننده فسفات، با آزادکردن اسیدهای-آلی با وزن مولکولی کم[2] (وی و همکاران، 2018) و اسیدهای معدنی باعث انحلال ترکیبات معدنی نامحلول فسفات می‌شوند (گلدستاین،1987). روش عمده و اصلی انحلال فسفر معدنی در باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شکل 1 نشان داده شده است.

[1] Goldstein

[2] Low molecular organic acids

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2- روش‌های گوناگون انحلال فسفات در ریزجانداران حل‌کننده فسفات (شارما و همکاران، 2013)

آنزیم‌های مسیر اکسیداسیون مستقیم[1] باعث انتشار اسیدهای آلی به فضای پری‌پلاسمیک و سپس محیط خارج سلولی می‌شود. در واقع ابتدا گلوکز توسط یک آنزیم درون‌سلولی به نام کوینوپروتئین گلوکز دهیدروژناز[2] به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود. سپس بسته به جنس و گونه باکتری، اسید گلوکونیک ممکن است با یک یا دو الکترون یا پروتون اضافی اکسید شده و در نتیجه تبدیل به 2-کتوگلوکونیک اسید یا 5 و 2-دیکتوگلوکونیک اسید[3] تبدیل شود. مطالعات گوناگون نشان داده است که ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال کمپلکس‌های نامحلول فسفات، اسیدهای معدنی و آلی گوناگونی آزاد می‌کنند. انتشار این اسیدها موجب انحلال ترکیبات معدنی فسفات نامحلول، به‌ویژه ترکیبات فسفات کلسیم می‌شود(مینا و همکاران، 2015 ;آندرسون و همکاران، 1985 و آنتونی، 1988).

به‌علاوه، ریزجانداران حل‌کننده فسفات با ترشح آنزیم‌های گوناگونی سبب آزاد شدن فسفر به شکل محلول و قابل دسترس از ترکیبات آلی می‌شوند که قابل استفاده گیاهان می‌باشد (خو و همکاران، 2019). این روش در محیط‌ها و زیست‌بوم‌هایی که فسفر آلی، منبع مهم فسفر ذخیره شده محسوب می‌شود بسیار مهم و حیاتی است (گلدستاین، 1995).

علاوه بر ترشح اسیدهای آلی و معدنی و آنزیم، این ریزجانداران از سازوکارهای دیگری نیز نظیر آزاد کردن پروتون (H^+)، ترشح سیدروفور و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید سولفید هیدروژن و غیره برای انحلال ترکیبات گوناگون فسفر محلول بهره می‌گیرند. در ادامه این مقاله به مهم‌ترین روش‌های انحلال فسفات پرداخته خواهد شد (شکل 2).

1- تولید اسیدهای آلی

ترشح اسیدهای آلی یکی از مهم‌ترین راهکارهای ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات نامحلول فسفر است(وی و همکاران، 2018). اسیدهای آلی از طریق کاهش pH و همچنین کلاته‌کردن سبب افزایش قابلیت دسترسی فسفات می‌شوند. تنوع و میزان ترشح اسیدهای آلی به نوع سوبسترای کربن و ازت و دیگر پارامترهای محیطی وابسته است (آیدا و همکاران،

1. Direct oxidation pathway
2. Quinoprotein glucose dehydrogenase
3. Diketogluconic acid

www.SID.ir

Archive of SID

2017). به‌طورکلی انحلال فسفات نامحلول توسط اسیدهای آلی به نوع اسید آلی، غلظت اسید آلی و تولید هم‌زمان چند اسید آلی بستگی دارد (ابو عیسی و همکاران، 1991). این ریزجانداران، اسیدهای آلی گوناگونی تولید و آزاد می‌کنند که در جدول‌های (2 و 3) به آن‌ها اشاره شده است.

جدول 2- برخی اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات (خان و همکاران، 2013)

نوع باکتری	اسید آلی تولید شده	منبع
Enterobacter sp. Fs-11	MA, GA	شهید و همکاران، 2012
Pseudomonas trivialis (BIHB 769)	GA, 2-KGA, LA, SA, FA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
P. poae (BIHB808)	GA, 2-KGA, SA, CA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
Pseudomonas spp. (BIHB 751)	OA, GA, 2-KGA, FA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
Enterobacter Hy-401	OA, GA, MA, LA, CA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Arthrobacter Hy-505	OA, GA, LA, CA	یی و همکاران، 2008
Azotobacter Hy-510	OA, GA, TA, LA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Enterobacter Hy-402	OA, GA, TA, CA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Rhodococcus erythropolis (CC-BC11)	GA	چن و همکاران، 2006
Bacillus megaterium (CC-BC10)	CA, LA, PA	چن و همکاران، 2006
Arthrobacter sp. (CC-BC03)	CA, LA	چن و همکاران، 2006
A. ureafaciens (CC-BC02)	CA	چن و همکاران، 2006
Serratia marcescens (CC-BC14)	CA, GA, SA, LA	چن و همکاران، 2006
Delftia (CC-BC21)	SA	چن و همکاران، 2006
Chryseobacterium (CC-BC05)	CA	چن و همکاران، 2006
Phyllobacterium myrsinacearum (CC-BC19)	GA	چن و همکاران، 2006

GA: اسید گلوکانیک؛ 2-KGA: 2α-کتوکلونیک اسید؛ LA: اسید لاکتیک؛ SA: اسید ساکسنیک؛FA : اسید فورمیک؛ MA: اسید مالیک؛ OA: اسید اگزالیک؛ CA: اسید سیتریک؛ FuA: اسید فوماریک؛ TA: اسید تارتاریک

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3- برخی اسیدهای آلی تولید شده توسط قارچ‌های حل‌کننده فسفات

ریزجانداران	اسید غالب	منبع
Aspergillus niger FS1, Penicillium canescens FS23, Eupenicillium ludwigii FS27, Penicillium islandicum FS30	سیتریک، گلوکنیک، اگزالیک	مندس و همکاران، 2013
Aspergillus awamori S19	اگزالیک، مالیک، سیتریک، ساکسنیک، فوماریک	جین و همکاران، 2012
T. flavus, T. helicus, P. purpurogenum, P. janthinellum	استیک، بوتریک، سیتریک، فوماریک، گلوکنیک، گلوکورنیک، لاکتیک، اگزالیک، پروپونیک، ساکسنیک، والریک	سروینو و همکاران، 2010
Aspergillus niger, Penicillium bilaiae, Penicillium sp	سیتریک، اگزالیک	آرویدسون و همکاران، 2010
Aspergillus flavus, A. candidus, A. niger, A. terreus, A. wentii, Fusarium oxysporum, Penicillium sp., Trichoderma isridae, Trichoderma sp.	لاکتیک، مالئیک، مالیک، استیک، تارتاریک، سیتریک، فوماریک، گلوکنیک	آکینتوکان، 2007
A. flavus, A. candidus, Penicillium oxalicum	گلوتاریک، مالیک، گلوکونیک، اگزالیک	شین و همکاران، 2006
Aspergillus flavus, A. niger, P. canescens	اگزالیک، سیتریک، گلوکنیک، ساکونیک	ملیحه و همکاران، 2004
Penicillium rugulosum	سیتریک، گلوکنیک	ریس و همکاران، 2001
A. niger	ساکونیک	وازکویس و همکاران، 2000

به‌علاوه اسیدهای آلی، دارای گروه‌های هیدروکسیلی و کربوکسیلی هستند که می‌توانند با مسدود کردن[1] جایگاه‌های فعال جذب و ترسیب[2] فسفر، حلالیت و قابلیت دسترسی زیستی فسفر را افزایش دهند (بیانکو و دفز،2010 و ظفر، 1993). توانایی اسیدهای آلی گوناگون در انحلال ترکیبات معدنی فسفات، متفاوت است. برای مثال، سویه‌های با قابلیت تولید اسید اگزالیک و اسید تارتاریک توانایی بیشتری در انحلال ترکیبات نامحلول فسفات دارند (باشان و همکاران، 2013).

2- کلات کردن[3]

اسیدهای آلی و معدنی تولید شده بوسیله ریزجانداران حل‌کننده فسفات قادرند فسفات‌های نامحلول را از طریق کلاته کردن کاتیون‌ها، آنها را حل‌کرده و در اختیار گیاه قرار دهند (پرادهان و سوکلا، 2005 و خان و همکاران، 2009). کلاته‌کردن فرآیندی است که طی آن یک ترکیب شیمیایی با یک یون فلزی ترکیب شده و آن را از دسترس خارج می‌کند. کلاته شدن شامل ترکیب دو یا چند پیوند بین یک مولکول (لیگاند و یک یون فلزی) بوده و بنابراین یک ساختار حلقوی ایجاد می‌کند. کلاته‌شدن با یک لیگاند اسید آلی از طریق اکسیژنی که در گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل وجود دارد، انجام می‌شود و فقط وقتی‌که پنج حلقه شرکت‌کننده یا کمتر از شش حلقه مشترک بتواند تشکیل شود، به وجود می‌آید (والپولا و یون،2012).

روش کلات‌های آلی در حلالیت فسفات‌های نامحلول و کانی‌های معدنی فسفاتی به تشکیل کمپلکس با کلسیم، آهن یا آلومینیوم نسبت داده می‌شود که در نتیجه آن باعث آزادسازی فسفات به‌شکل محلول می‌شوند. واکنش‌ها به شکل زیر هستند.

$CaX_2.3Ca(PO_4)_2$ + Chelate → محلول PO_4^{3-} + دار

کمپلکس کلاته کلسیم

(X = OH یا F)

[1] Blocking
[2] Percipitation
[3] Chelation

www.SID.ir

Archive of SID

$AL(Fe).(H_2O)_3(OH)_2H_2PO_4$ + chelate → محلول PO_4^{-3} + کمپلکس کلاته آهن یا آلومینیوم

قابلیت اسیدهای آلی در انحلال فسفر نسبت به اسیدهای معدنی بیشتر است. این تفاوت به تأثیر کلاته-کنندگی اسید آلی ترشح شده توسط ریزجانداران نسبت داده می‌شود (قره باغی،2010). در این راستا مطالعات نشان داده است توانایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در انحلال ترکیب نامحلولی نظیر هیدروکسی آپاتیت نسبت به استفاده از اسیدهای معدنی (در یک pH معین) در محیط مایع، بیشتر است (جدول 3).

ساختار مولکولی اسیدهای آلی در توانایی کلاته‌کردن یون‌های فلزی بسیار اثرگذار است. اگر تعداد گروه‌های هیدروکسیل (OH^-) در یک مولکول ثابت، افزایش یابد، توانایی آن برای ممانعت کردن از رسوب فسفر توسط Al^{3+} و Fe^{3+} و هم‌چنین توانایی آن‌ها در کلاته‌کردن Al^{3+} و Fe^{3+} بسیار افزایش می‌یابد؛ بنابراین عامل آزادسازی فسفر تنها کاهش pH نیست. این موضوع را پژوهشگران با اسیدی کردن محیط حاوی فسفات نامحلول انجام دادند. آن‌ها میزان آزادسازی فسفر را توسط جنس‌های *Pseudomonas sp.* و *Penicillium sp.* مقایسه کردند. نتایج نشان داد که باکتری و قارچ بیشتر از اسیدکلریدریک (HCl) باعث آزادسازی فسفر می‌شود (جدول 4).

جدول 4- مقایسه حلالیت هیدروکسی آپاتیت توسط باکتری، قارچ و اسیدکلریدریک

	شاهد	*Pseudomonas sp.*	*Penicillium sp.*	HCl
pH	6/79	3/45	6/44	3/80
فسفر (میلی‌گرم در لیتر)	24/2	51/7	46/7	24/2

به‌علاوه برخی از سویه‌های حل‌کننده فسفات بدون اینکه اسیدیته محیط را کاهش دهند بر حلالیت ترکیبات کلسیم فسفات اثرگذار هستند (ایلمر و شینر،1992). با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد مهم‌ترین دلیل این امر کلات کردن یون‌های کلسیم است(ریبادو و همکاران، 2020).

اسیدهای آلی مختلف توانایی گوناگونی در کلات کردن دارند که این امر به تعداد گروه‌های کربوکسیلی آن‌ها نسبت داده می‌شود. برای مثال، اسید سیتریک که دارای سه گروه کربوکسیلی است قدرت کلات‌کنندگی بسیار بالاتری نسبت به اسید مالیک که دارای دو گروه کربوکسیلی است، دارد. (جدول 5). اسیدهای آلی مونوبازیک نظیر اسید لاکتیک که گروه‌های هیدروکسیل نزدیکی به گروه‌های کربوکسیلی دارند، قدرت نسبتاً کمتری در کلاته‌کردن یون‌های کلسیم دارند(ماهیدی، 2011 و والپولا و یون، 2012).

جدول 5- مقایسه ثابت حلالیت (pKa) اسیدهای آلی گوناگون مؤثر در انحلال فسفات نامحلول

نوع اسید	تعداد گروه کربوکسیل	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
سیتریک	3	3/15	4/77	6/4
مالیک	2	3/40	5/13	-
اگزالیک	2	1/27	4/28	-
گلوکونیک	1	3/86	-	-

کلاته‌کردن فسفات‌های هیدروکسی توسط اسیدهای آلی دو ظرفیتی باعث تولید نمک‌های آهن و آلومینیوم هیدروکسید و آزاد شدن یون‌های فسفات می‌شود. در میان اسیدهای دی‌کربوکسیلیک، آن‌هایی که دارای گروه‌های هیدروکسی هستند ترکیبات قوی‌تری را تشکیل می‌دهند. ترکیبات آلفا هیدروکسی نسبت به بتاهیدروکسی قوی‌تر

www.SID.ir

Archive of SID

هستند (گروه‌های هیدروکسیلی که روی دومین اتم کربن از گروه کربوکسیلیک جای گرفته‌اند). افزایش قدرت اسیدی، اسیدهای آلفاهیدروکسی در مقایسه با اسیدهای غیرقابل جانشینی و در مقایسه با قدرت کلاته‌کردن Ca^{2+} توسط اسیدهای آلی با این‌گونه ساختار با قدرت آن‌ها در انحلال فسفات‌های کلسیم ارتباط دارد. توانایی اسیدهای آلی برای جلوگیری از جذب سطحی فسفر در خاک به این شکل کاهش می‌یابد(ماهیدی، 2011):

تری کربوکسیلیک اسید> دی کربوکسیلیک اسید> مونو کربوکسیلیک اسید

توانایی کلاته‌کردن Al^{3+} (ظرفیت حذف سمیت Al^{3+} توسط یک اسید آلی) با جایگاه نسبی گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل روی یون کربن اصلی آن ارتباط دارد. کلات‌کننده‌های مؤثر Al^{3+} ساختار آلفا هیدروکسی دارند که تشکیل ساختارهای حلقوی پنج ضلعی را با Al^{3+} افزایش می‌دهند. اسیدهای آلیفاتیک که دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلیک در جایگاه مناسب هستند برای تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی نسبت به سایر اسیدهای آلیفاتیک یا آروماتیک، در آزادسازی فسفر از فسفات معدنی موثرترند. اسید بتاکتوگلوکونیک توسط بسیاری از باکتری‌های حل‌کننده فسفات تولید می‌شود و یکی از قوی‌ترین اسیدهای کربوکسیلیک تک‌ظرفیتی با ثابت انحلال اسیدی کم (pK_a=2.66) است. توانایی اسید بتاکتوگلوکونیک در محلول کردن هیدروکسی آپاتیت، به توانایی آن در کاهش pH بستگی داشته و ارتباطی با کلاته‌کردن یون‌های کلسیم ندارد. ثابت تعادل اسید بتاگلوکونیک کلسیم (Log K Ca) بسیار ناچیز است؛ بنابراین دو جدایه‌ای که pH را یکسان کاهش می‌دهند، ممکن است توانایی گوناگونی در انحلال فسفات معدنی داشته باشند. انحلال میکروبی نه‌تنها به pH نهایی محیط کشت بستگی داشته بلکه به نوع اسیدهای آلی تولید شده نیز وابسته است (ماهیدی، 2011).

3- اسیدهای معدنی

از دیگر روش‌های انحلال ترکیبات نامحلول فسفر، تولید اسیدهای معدنی توسط ریزجانداران است. تولید اسیدهای معدنی، روشی غیرمستقیم در انحلال فسفر است. در واقع در این روش موادی نظیر دی‌اکسیدکربن و غیره توسط ریزجانداران تولید و در طی واکنش‌هایی باعث انحلال فسفر می‌شوند. برای مثال، ریزجانداران خاک و ریشه گیاهان به‌عنوان تولیدکننده‌های دی‌اکسید کربن در ریزوسفر شناخته می‌شوند (رودریگز و فراگا،1999). همان‌طور که در زیر نشان داده شده است دی‌اکسیدکربن باعث تبدیل فسفر نامحلول به فرم محلول می‌شود.

$Ca_3(PO_4)_2 + CO_2 + H_2O \leftrightarrow 2CaHPO_4 + CaCO_3$
$Ca_3(PO4)_2 + 2CO_2 + 2H_2O \leftrightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2CaCO_3$

آنیون‌های معدنی نظیر بی‌کربنات‌ها و کربنات‌ها (HCO_3^-، CO_3^{2-}) نیز می‌توانند باعث آزادسازی یا کاهش ته‌نشینی فسفر از طریق رقابت برای مکان‌های جذبی و تشکیل کمپلکس با یون‌های آلومینیوم، آهن و کلسیم شوند.

اسید نیتریک و اسید سولفوریکی که از طریق اکسیداسیون ترکیبات نیتروژنی یا گوگرد معدنی توسط باکتری‌های نیتریفیکاتور و *Thiobacillus spp.* تولید می‌شوند با ترکیبات نامحلول فسفر از جمله سنگ فسفات واکنش داده و فسفر را به شکل محلول در می‌آورند(خان و همکاران، 2007).

$NH_4NO_3 + 2O_2 \leftrightarrow 2HNO_3 + H_2O$
$(NH_4)_2SO_4 + 4O_2 \rightarrow 2HNO_3 + 2H_2O$
$2S + 3O_2 + H_2O \rightarrow 3H_2SO_4$
$Ca_3(PO_4)_2 + 2HNO_3 \rightarrow 2CaHPO_4 + Ca(NO_3)_2$
$Ca_3(PO_4)_2 + 4HNO_3 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2Ca(NO_3)_2$
$Ca_3(PO_4)_2 + H_2SO_4 \rightarrow CaHPO_4 + CaSO_4$
$Ca_3(PO_4)_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow Ca(H_2PO_4) + 2CaSO_4$

همچنین سولفید هیدروژن از طریق احیاء اسیدهای آمینه حاوی گوگرد و یا توسط ریزجانداران هتروتروف تولید می‌شود. سولفات توسط باکتری‌های احیاءکننده آن مانند *Desulfovibrio* مطابق واکنش زیر احیاء می‌شود.

$SO_4 + 10H + 8e^- \rightarrow H_2S + H_2O$

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طوری که در زیر نشان داده شده است سولفید هیدروژن تولید شده با فسفات آهن واکنش داده و باعث آزادسازی فسفات می‌شود. همان‌طور که در زیر نشان داده شده است:

$$FePO_4 + H_2S \rightarrow FeS + H_2PO_4$$

سولفید هیدروژن تحت شرایط بی‌هوازی، آهن موجود در سولفات آهن فریک نامحلول را به شکل محلول آهن (مانند سولفید آهن II) تبدیل کرده و باعث آزادسازی فسفات محلول می‌شود. لذا گوگرد می‌تواند برای انحلال ترکیبات نامحلول فسفر خاک مورد استفاده قرار گیرد (خان و همکاران، 2007).

4- خروج پروتون

به‌نظر می‌رسد ترکیبات نامحلول فسفر بدون تولید اسید و به‌واسطه آزادسازی پروتون‌های تولید شده از طریق تنفس یا احیای آمونیوم نیز انجام می‌شود (Kucery, 1983)؛ بنابراین فسفات‌های نامحلول به‌طور مستقیم در سطح سلول‌های میکروبی انحلال می‌یابند. پروتون‌های آزاد شده (+H) زیادی به‌عنوان محصول جانبی واکنش‌های درگیر در سازوکارهای باکتری‌های حل‌کننده فسفر (اسیدهای آلی و آنزیم) تولید می‌گردد. پروتون‌های آزاد شده (+H) با کربنات‌های معدنی از جمله کربنات کلسیم ($CaCO_3$) و همچنین ترکیبات Ca-P واکنش داده و نهایتاً میزان +Ca2 را در محیط افزایش داده است. تحت این شرایط می‌توان انتظار داشت که علاوه بر انحلال ترکیبات فسفری و افزایش فسفات آب، بخشی از آنیون‌های فسفات با کاتیون‌های +Ca2 واکنش داده و میزان Ca-P را افزایش می‌دهد (ماهیدی، 2011).

5- تولید سیدروفور

در خاک‌های با تهویه خوب، آهن سه ظرفیتی شکل غالب آهن بوده که ممکن است با فسفر محلول واکنش داده و ترکیب فسفات آهن نامحلول ($FePO_4$) را تشکیل می‌دهد. این ترکیب بسیار پایدار بوده و تحت شرایط اکسیژنی خاصی آزاد می‌شود. همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد تعداد اندکی از ریزجانداران حل‌کننده فسفات دارای توانایی انحلال ترکیب مذکور از طریق ترشح اسیدهای آلی هستند. با این وجود برخی از ریزجانداران از طریق تولید و ترشح ترکیبات خارج سلولی ویژه‌ای که برای تأمین آهن مورد نیاز خود بکار می‌گیرند، می‌توانند موجب آزاد شدن فسفر نیز شوند. این ترکیبات که میل ترکیبی بسیار زیادی با آهن دارند سیدروفور نامیده می‌شود (کومار و همکاران، 2018).

در واقع سیدروفورها به‌منظور مقابله با تنش کمبود آهن قابل جذب ترشح می‌شوند. به‌جز موارد استثنایی، تمام باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها دارای توانایی تولید سیدروفور هستند ولی مقدار تولید سیدروفور در گونه‌های گوناگون میکروبی و حتی در سویه‌های گوناگون مربوط به هرگونه نیز بسیار متفاوت است. بین میکروارگانیسم‌های گوناگون نه‌تنها از نظر مقدار تولید بلکه از لحاظ نوع سیدروفور تولید شده نیز تفاوت چشمگیری وجود دارد. برخی از میکروارگانیسم‌ها فقط یک نوع سیدروفور تولید می‌کنند، در حالی‌که برخی دیگر ممکن است چندین نوع سیدروفور ترشح نمایند(ساتیاپراکاش و همکاران، 2017). تاکنون بیش از پانصد نوع سیدروفور میکروبی گوناگون شناسایی شده است که تعدادی از آن‌ها در جدول (6) آورده شده است.

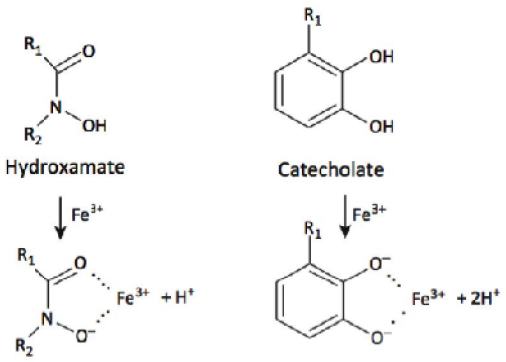
سیدروفورها به‌دلیل داشتن گروه‌های عاملی گوناگونی که دارند، آهن را به دام می‌اندازند. البته بیشتر سیدروفورها گروه‌های عاملی مشابهی دارند. رایج‌ترین و مهم‌ترین گروه‌های عاملی شامل هیدروکسامات، کاتکولات، هیدروکسی کربوکسیلات و اتیلن دی‌آمین دی کربوکسیل هستند (سلوی و همکاران، 2017).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 6-تولید سیدروفور توسط باکتری و قارچ‌های گوناگون

سیدروفور	ریزجانداران تولیدکننده
Hydroxamate	
Ferrichrome	*Ustilago sphaerogena*
Desferrioxamine B (deferoxamine)	*Streptomyces pilosus,* *Streptomyces coelicolor*
Desferrioxamine E	*Streptomyces coelicolor*
Fusarinine C	*Fusarium roseum*
Ornibactin	*Burkholderia cepacia*
Catecholate	
Enterobactin	*Escherichia coli*
Bacillibactin	*Bacillus subtilis, Bacillus anthracis*
Vibriobactin	*Vibrio cholera*
Mixed ligands	
Azotobactin	*Azotobacter vinelandii*
Pyoverdine	*Pseudomonas aeruginosa*
Yersiniabactin	*Yersinia pestis*



شکل 3- روش به دام انداختن آهن سه ظرفیتی توسط برخی سیدروفورها

به‌طورکلی سیدروفورها از دو روش می‌توانند باعث افزایش قابلیت دسترسی فسفر در محیط شوند. سیدروفورها در محیط با آهن پیوند محکمی می‌دهند و مانع از واکنش آهن با فسفر می‌شوند. همچنین سیدروفورها از طریق کلات‌کردن نیز باعث آزادسازی فسفات تثبیت شده در فسفات آهن ($FePO_4$) می‌شوند. بسیاری از ریزجانداران با این روش‌ها قادرند که حلالیت و جذب فسفر برای گیاهان را افزایش دهند. نقش سیدروفورها در حلالیت فسفر در خاک‌های اسیدی یعنی جایی که فسفات آهن سه ظرفیتی یکی از اشکال غالب است، به نظر حائز اهمیت است(دودور و طباطبایی، 2003).

6- ترشح آنزیم

ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات آلی، آنزیم‌های مختلفی شامل فسفاتازها، فیتازها و فسفوناتازها تولید و آزاد می‌کنند(دودور و طباطبایی، 2003).

فسفاتازها مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در انحلال فسفر آلی به‌شمار می‌روند که با هیدرولیز پیوندهای فسفو-استری[1] و یا فسفوآنیدریدی[1] سبب آزاد شدن فسفر به

[1] phospho-ester

www.SID.ir

Archive of SID

شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. فسفاتازها به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند. علت نام‌گذاری اسیدی یا قلیایی این آنزیم‌ها، فعالیت بهینه آن‌ها در این شرایط است (دیک و طباطبایی،1986؛ جورج و همکاران، 2008). این آنزیم‌ها بر ترکیبات آلی دارای فسفر مانند استرهای اینوزیتول فسفات، فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک اثر گذاشته و موجب آزاد شدن فسفات به شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. فسفات‌های اینوزیتول به مقدار زیاد در مواد آلی خاک مانند بافت‌های مرده گیاهی و حیوانی خاک یافت می‌شوند، بنابراین منبع بسیار مناسبی برای فعالیت ریزجانداران آزادکننده آنزیم‌های فسفاتاز هستند (یوان و همکاران، 2007). میزان ترشح فسفاتازها در ریزجانداران گوناگون بسیار متنوع است. برخی موجودات مطلقاً توان ترشح این آنزیم را ندارند. با توجه به اهمیت فسفاتازها در آزادسازی فسفات از فسفر آلی، مطالعات زیادی روی فسفاتازهای اسیدی و قلیایی انجام شده است (طباطبایی،1982). فسفاتاز در خاک ممکن است به‌وسیله ریشه گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها تولید شود (طرفدار و مارشنر،1994). البته مطالعات انجام شده نشان داده است فسفاتاز قلیایی تماماً به‌وسیله ریزجانداران تولید شده و گیاهان آن را ترشح نمی‌کنند در حالی که وجود فسفاتاز اسیدی در ریشه گیاهان اثبات شده است (ایلمر و شینر،1995؛ دودور و طباطبایی،2003).

همچنین فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها هستند که با اثر بر فیتات‌ها باعث آزادسازی تدریجی فسفات به شکل قابل دسترس می‌شوند. فیتات منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان است (هایفنر و همکاران، 2005). فسفوناتازها نیز توسط گروه‌های خاصی از ریزجانداران تولید و ترشح می‌شود که آن‌ها را قادر به زیستن در همه محیط‌ها کرده است، زیرا آنزیم فسفوناتاز با هیدرولیز پیوندهای کربن-فسفر (C-P) علاوه بر آزادشدن فسفات، موجب افزایش دسترسی کربن و ازت نیز می‌شود (دومورا و همکاران،1989؛ جورج و همکاران، 2008).

7- ژن‌های درگیر در انحلال فسفر

مطالعه نحوه بیان و توارث ژن‌های مرتبط با مواد مترشحه از این ریزجانداران که مسئول حلالیت فسفر هستند، در اصلاح ژنتیکی و بهبود کارآیی این ریزجانداران نقش اساسی ایفا می‌کند. بدین منظور روش‌های ژنتیک مولکولی برای فهم مبانی ژنتیکی تولید مواد حل‌کننده فسفات مثل اسید گلوکونیک، در باکتری‌های حل‌کننده فسفات بکار گرفته شده است. باکتری اشرشیاکولی (*E. coli*) به‌عنوان دارنده ژن آپوگلوکوز دِهیدروژناز (آنزیمی که مسئول تبدیل گلوکز به گلوکونات است) شناخته شده است، ولی کوفاکتور لازم برای این آنزیم، پیرولوکیلولین کوئینون (PQQ) را ندارد. موفقیت‌های اولیه در زمینه ژن های حل کننده فسفات توسط گلدستاین و لیو (1987) از باکتری گرم منفی *Erwinia herbicola* به دست آمده است. این ژن به کمک غربالگری نوترکیب‌های مقاوم به آنتی بیوتیک از مجموعه ژنومی محیط حاوی هیدروکسی آپاتیت جداسازی شد. بیان این ژن منجر به تولید اسید گلوکونیک و فعالیت انحلال فسفات معدنی در باکتری گردید. توالی یابی این ژن دخیل بودن احتمالی آنرا در سنتز پیرولوکیلولین کوئینون مشخص ساخت که یک فاکتور ضروری برای تشکیل آنزیم گلوگز دهیدروژناز است.

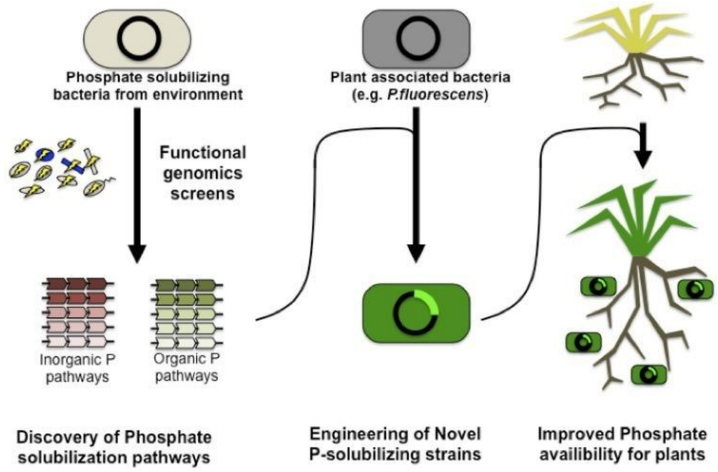
ژن مسئول در تولید PQQ در باکتری‌های *E. Herbicula* تکثیر می‌شود تا در باکتری‌های E. coli وارد شود و فنوتیپ‌های حل‌کننده فسفات معدنی جدا شوند (پانده و همکاران، 2017). به‌وسیله این روش دو ژن از باکتری *E.herbicula* بدست آمده است. یک ژن که تولید PQQ را کد می‌کند و دومی ژنی که وظیفه انتقال PQQ را به عهده دارد. ژن دیگر هم که در انتقال PQQ نقشی دارد، تکثیر می‌شود. ژن‌های ایجادکننده فنوتیپ حل‌کنندگان فسفات معدنی در E. coli تکثیر می‌شوند. ژن فسفات napA از باکتری خاکزی *Morgonella morgani*

1. phosphoanhydride bonds

www.SID.ir

Archive of SID

جدا و از طریق وکتور pRK293 به باکتری *Burkholderia cepacia* منتقل شده است (فراگا و همکاران، 2001). تعداد 14 ژن کد کننده اسید فسفاتاز غیر اختصاصی از گونه‌های مختلف باکتریایی جداسازی شده است (رسونولی و همکاران،1984). ژنهای کد کننده فسفاتاز به سه گروه A, B و C تقسیم می‌شوند (تالر و همکاران، 1997؛ کائو و همکاران، 2010). چندین ژن فسفاتاز دیگر از باکتری*Esherichia coli* جداسازی شده که شامل ushA, agP, cpdB هستند که به ترتیب 2- 3- فسفواستراز حلقوی، گلوکز- L- فسفاتاز و 5- نوکلوتیداز را کد می‌کنند (پرادل و همکاران، 1990؛ برنز و بیچام، 1986؛ بیچام و همکاران،1980). برخلاف مشکلات موجود خوشبختانه پیشرفت‌های خوبی در زمینه مهندسی ژنتیک ریزجانداران حل کننده فسفات حاصل شده است (آرمارگر،2002). این واقعیت که صفت حل‌کنندگی فسفات با ژن‌های ویژه ارتباط دارد می‌تواند با استفاده از ژن‌های حل‌کننده فسفات در باکتری‌های ریزوسفر مانند ریزوبیوم و *Pseudomonas* راهی را برای ایجاد ریزجانداران حل‌کننده فسفات دیگر باز کند (شکل 4). معرفی ژن حل کننده فسفات دریچه جدیدی جهت توسعه کودهای زیستی ایجاد کرده است. به‌علاوه یک ناقل فسفر بسیار کارآمد از قارچ میکوریزا *Glomus vermiformis* تکثیر شده است که بیان این ژن در محیط خارج هدف نیز دیده شده است. افزایش بیان این ژن‌های بسیار کارآمد می‌تواند به توسعه بیشتر سویه‌های حل‌کننده فسفات بیانجامد (لیندا و همکاران،2014).



شکل 4- ایجاد ریزجانداران حل‌کننده فسفات نوین با بکارگیری روش‌های مولکولی (لیندا و همکاران،2014)

در *E. Coli* تنش فسفر در بیان بیش از 400 پروتئین مؤثر است و این اثر عمومی به‌وسیله دو سیستم مجزای تنظیم‌کننده به نام‌های phoR و phoB کنترل می‌شود، که phoR نقش حسگر را در کمبود فسفر بازی می‌کند و phoB یک تنظیم‌کننده مثبت هم‌جنس است. تحت شرایط تنش فسفر، phoB، PhoR را فسفریلاته می‌کند که این عمل بر توالی خاصی از DNA که جعبه PHO گفته می‌شود، اثر می‌گذارد (لیندا و همکاران،2014). ژن‌های زیادی مانند gltB gltD که با کمبود فسفر تنظیم می‌شوند، ممکن است در تجمع یا تولید فسفر نقش نداشته باشند. اخیراً تحقیقات نشان داده است که در جنس *Entrobacter* کمبود فسفر باعث تحریک گلوکز دهیدروژناز (آنزیمی که در متابولیسم اکسیداتیو گلوکز نقش دارد) می‌شود. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که قابلیت حلالیت فسفر مربوط به ژن و ژن‌های خاصی است که حتی در باکتری‌های غیر حل‌کننده فسفات نیز وجود دارد، ولی بیان نمی‌شود (لیندا و همکاران،2014).

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

به‌دلیل جذب و ترسیب بسیار سریع فسفر توسط کلسیم، آهن و آلومینیوم درصد بسیار زیادی از فسفر از دسترس گیاهان خارج می‌شود. همچنین نیمی از فسفر کودهای فسفاته توسط کلسیم موجود در خود این کودها از دسترس خارج می‌گردد؛ بنابراین درصد بسیار اندکی از کود فسفر (حدود 10 درصد) بکار رفته موجب افزایش فسفات قابل دسترس می‌گردد و باقی‌مانده آن به‌سرعت در خاک به شکل کمپلکس‌های نامحلول تجمع می‌یابد. کمبود فسفر با استفاده از کودهای شیمیایی فسفاتی که در واقع گران و گاهاً خطرناک هستند تأمین می‌شود. از 200 میلیون تن کود شیمیایی مصرف شده در جهان حدود 46 میلیون تن مربوط به کودهای شیمیایی فسفاته می‌باشد که در ایران به حدود یک میلیون تن می‌رسد. گرچه فسفر آلی در برخی از خاک‌ها ممکن است بخش بزرگی از فسفر خاک را تشکیل می‌دهد اما به‌طور مستقیم از آن به‌عنوان ماده مغذی استفاده نمی‌شود مگر اینکه توسط آنزیم‌های خاک تجزیه و در دسترس قرار گیرد.

با توجه به هزینه بالای کودهای شیمیایی فسفاتی و تجمع فسفر در خاک، یافتن یک جایگزین ارزان و مناسب بسیار ضروری است. در این راستا، تهیه فرآورده‌های زیستی حاوی تعداد کافی از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات راه‌حلی برای مشکل فسفر ارائه شده است. هنگامی‌که این میکروارگانیسم‌ها روی بذر، سطوح گیاه یا خاک بکار می‌رود، در ریزوسفر یا اندوفیت‌ها استقرار می‌یابند و با فراهم آوردن فسفر، رشد گیاهان را تسهیل می‌کنند. میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات مختلفی نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها در خاک زندگی می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید اسیدهای معدنی و آلی و آنزیم‌های مختلف این کار را انجام می‌دهند. هنگامی که این میکروارگانیسم‌ها با بذور و خاک‌ها مخلوط شوند، آنها از طریق فراهمی مواد مغذی بخصوص فسفر، آزادسازی فیتوهورمون‌هایی نظیر ایندول اسیداستیک، جیبرلین و سیتوکینین، فراهم‌آوردن آهن از طریق آزادسازی سیدروفور، رهاسازی ترکیبات ضد میکروبی برای مقابله با عوامل بیماری‌زا، ایجاد مقاومت در برابر خشکی، شوری موجب رشد و توسعه گیاهان می‌گردند؛ بنابراین، استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در تولید محصولات زراعی به‌عنوان یک جایگزین سازگار با محیط‌زیست محسوب می‌شود. بااین‌حال، برای تولید آن‌ها، ریزجانداران دارای توانایی انحلال فسفات باید جداسازی و شناسایی شده و پس از آن در گلدان و یا مزرعه آزمایش شوند. این ریزجانداران با روش‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای معدنی، آلی، تولید پروتون، ترشح سیدروفور، کلاته‌کردن و تولید آنزیم فسفاتاز، قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند. در خاک‌های معدنی حاوی مقادیر زیاد فسفات‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیم، عمدتاً تولید اسیدهای معدنی و آلی و در خاک‌های آلی بیشتر آنزیم فسفاتاز مؤثر هستند.

از مهمترین اسیدهای معدنی می توان به اسید سولفوریک، اسید نیتریک، اسید کربنیک و از اسیدهای آلی اسید اگزالیک، مالیک، سیتریک اشاره کرد. اسیدهای آلی از طریق کاهش pH و همچنین کلاته‌کردن سبب افزایش قابلیت دسترسی فسفات می‌شوند. تنوع و میزان ترشح اسیدهای آلی به نوع سوبسترای کربن و ازت و دیگر پارامترهای محیطی وابسته است. به‌طورکلی انحلال فسفات نامحلول توسط اسیدهای آلی به نوع اسید آلی، غلظت اسید آلی و تولید هم‌زمان چند اسید آلی بستگی دارد. قابلیت اسیدهای آلی در انحلال فسفر نسبت به اسیدهای معدنی بیشتر است. اسیدهای آلی مختلف توانایی گوناگونی در کلات کردن دارند که این امر به تعداد گروه‌های کربوکسیلی آن‌ها نسبت داده می‌شود. برای مثال، اسید سیتریک که دارای سه گروه کربوکسیلی است قدرت کلات‌کنندگی بسیار بالاتری نسبت به اسید مالیک که دارای دو گروه کربوکسیلی است. میزان، نوع و تعداد سیدروفور تولیدی توسط ریزجانداران بسیار

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوت است و تاکنون بیش از 500 سیدروفور شناخته شده است که توسط آنها تولید می‌گردد. ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات آلی آنزیم‌های مختلفی شامل فسفاتازها، فیتازها و فسفوناتازها تولید و آزاد می‌کنند. فسفاتازها به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم شده و مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در انحلال فسفر آلی به‌شمار می‌روند که با هیدرولیز پیوندهای فسفو- استری و یا فسفوآنیدریدی سبب آزاد شدن فسفر به شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. برای انحلال بیشتر فسفات‌های نامحلول پیشنهاد می‌شود از ریزجاندارانی استفاده شود که به طور همزمان بتوانند اسید معدنی، آلی، سیدروفور و آنزیم فسفاتاز تولید نمایند.

فهرست منابع:

1. Abu-Eishah, S. I., El-Jallad, I. S., Muthaker,M., Touqan, M. and Sadeddin, W. 1991. Beneficiation of calcareous phosphate rocks using dilute acetic acid solutions: optimisation of operating conditions for Ruseifa (Jordan) phosphate, nternational Journal of Mineral Processing, 31:1-2, pp. 115–126,.
2. Ahemad, M., Khan, M.S. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing Pseudomonas putida isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. Chemosphere 86:945–950.
3. Akintokun A.K., Akande G.A., Akintokun, P.O., Popoola, T.O.S. and Babalola, A.O. 2007. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid producing fungi isolated from Nigerian soil. Int. J. Soil Sci. 2:301–307
4. Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., and Estell, D. 1985. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modffied erwinia herbicola. Science, 230 (47): 144-149.
5. Anthony, C. 1988. Quinoproteins and energy transduction. Bacterial Energy Transduction, 293-316. Academic Press; New York.
6. Armarger, N. 2002. Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie 84:1061–1072.
7. Arwidsson, Z. Johansson, E., Kronhelm, T.V., Allard, B. Van Hees, P. 2010. Remediation of metal contaminated soil by organic metabolites from fungi I—production of organic acids. Water Air Soil Pollut 205:215–226.
8. Bashan, Y. Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E. .2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biol Fertil Soils 49:465–479.
9. Beacham, I.R., and Garrett, S. 1980. Isolation of Escherichia colimutants (cpdB) deficient in periplasmic 2 –cyclic phosphodiesterase and genetic mapping of the cpdB locus. J Gen Microbiol; 119:31–34.
10. Bianco, C. and Defez, R. 2010. Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol 76:4626–4632
11. Brady, N.C., and Weil, R.R. 2002.The nature and properties of soils, 13th edn. Prentice Hall of India,New Delhi, 960
12. Burns, D.M., and Beacham, I.R. 1986. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the Escherichia coli ushAgene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the ushA gene, and thesignal sequence of its encoded protein product. Nucleic Acids Res;14:4325–42.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Cao, X., Song, C., Zhou, Y. 2010. Limitations of using extracellular alkaline phosphatase activities as a general indicator for describing P deficiency of phytoplankton in Chinese shallow lakes. Journal of Applied Phycology, 22(1): 33-41.
14. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol 34:33–41
15. Chen,Y. P., Rekha, P. D., Arun,A. B., Shen,F. T., Lai,W. A., and Young, C. C. 2006.Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities, Applied Soil *Ecology*, 34 (1):33–41.
16. Dick, R.P., Tabatabai, M.A. 1986. Hydrolysis of polyphosphate in soils. Soil Sci 142:132–140
17. Dodor, D. E. and Tabatabai, M. A. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 166(1) : 7–13.
18. Dumora, C., Lacoste, A. M. and Cassaigne, A. 1989. Phosphonoacetaldehyde hydrolase from Pseudornnnns aeruginnsci ; purification, properties, and comparison with Baci1lir.s cereus enzyme, Biochim. Biophys. Acta 997, 193-198.
19. Eida, A. A., Hirt, H., and Saad, M. M., (2017). Challenges Faced in Field Application of Phosphate-Solubilizing Bacteria. In Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation (pp. 125-143). Springer, Singapore.
20. Fraga, R., Rodriguez, H., Gonzalez, T. 2001. Transfer of the gene encoding the NapA acid phosphatase from Morganella morganii to a Burkholderia cepacia strain. Acta Biotechnol 21:359–369.
21. George T.S, Gregory P.J, Hocking P.J, Richardson A .E. 2008. Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilisation of organic P substrates in vitro, but does not effectively predict P-nutrition in different soils. Environ Exp Bot 64:239–249
22. Gharabaghi, M., Irannajad, M. and Noaparast, M. A. 2010. Review of the beneficiation of calcareous phosphate ores using organic acid leaching, Hydrometallurgy, 103(1–4) : 96–107.
23. Goldstein, A.H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. Biol Agric Hortic 12:185–193
24. Goldstein, A.H., Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from Erwinia herbicola. Biotechnology 5:72–74.
25. Gyaneshwar, P., Naresh, K.G., Parekh, L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. World J Microbiol Biotechnol 14:669–673.
26. Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, .2005. Biotechnological production and applications of phytases. Appl Microbiol Biotechnol 68, 588–597
27. Illmer, P. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol Biochem 24:389–395.
28. Illmer, P. and Schinner, F. 1995 Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol Biochem 24:389–395.
29. Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. 2012. Effect of phosphate solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. Folia Microbiol 57:533–541.
30. Khan, A., Jilani, V., Akhtari, M. S., Naqvi,S. M. S. and Rasheed, M. 2009. “Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production,” Journal of Agricultural and Biological Science, 1: 48–58.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Khan, M. S. Zaidi,A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review, Agronomy for Sustainable Development, 27(1): 29–43.
32. Khan, M.S., Ahmad, E., Zaidi, A., Oves, M. 2013. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In: Maheshwari DK et al (eds) Bacteria in agrobiology: crop productivity. Springer, Berlin, pp 237–265.
33. Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In Phosphate solubilizing microorganisms Springer, Cham. 31-62.
34. Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian Journal of Soil Science, 63 (4): 671-678.
35. Kumar,A., and Patel., H. 2018.Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants, nternational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(5) : 1344–1347.
36. Linda, R.,and Babyson, R. S. 2014. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, 1(7): 317-324.
37. Mahidi,S. S. Hassan, G. I., Hussain,A. and Faisul, U. R., 2011.Phosphorus availability issue-its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization-case study, Research Journal of Agriculture Science, 2: 174–179.
38. Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A., Farooq, L. 2004. Organic acid production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. Pak J Biol Sci 7:187–196
39. Mao, L., Lu, Q., Mo, W., Xin, X., Chen, X., He, Z. 2017. Phosphorus availability and release pattern from activated dolomite phosphate rock in Central Florida. J. Agric. Food Chem. 65: 4589–4596.
40. Meena, M. D., & Biswas, D. R. 2015. Effect of rock phosphate enriched compost and chemical fertilizers on microbial biomass phosphorus and phosphorus fractions. African Journal of Microbiology Research, 9(23), 1519-1526.
41. Mendes, G.O., Dias, C.S., Silva, I.R., Ju´nior, J.I.R., Pereira, O.L., Costa, M.D. 2013. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. World J Microbiol Biotechnol 29:43–50.
42. Mendes, G.O., Dias, C.S., Silva, I.R., Ju´nior, J.I.R., Pereira, O.L., Costa, M.D. 2013. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. World J Microbiol Biotechnol 29:43–50.
43. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(2), 379-391
44. Pradhanm, N. and Sukla,L. B. 2012.Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil, African Journal of Biotechnology, 5: 850–854.
45. Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., Antoun, H. 2001.Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV induced mutants of Penicillium rugulosum. Soil Biol Biochem 33:1741–1747
46. Ribaudo C, Zaballa J.I, and Golluscio R. 2020. Effect of the phosphorus-solubilizing bacterium *Enterobacter Ludwigii* on barley growth promotion. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS). Jan 26;63(1):144-57.
47. Richardson, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst C.E., Doube ,B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (eds) Management of the soil biota in sustainable farming systems. CSIRO Publishing, Melbourne, pp 50–62

www.SID.ir

Archive of SID

48. Rodrıguez, H. and Fraga,R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, iotechnology Advances, 17: 319–339.
49. Rossolini, G.M., Shippa, S., Riccio, M.L., Berlutti, F., Macaskie, L.E., Thaller, M.C. 1998. Bacterial nonspecific acid phos- phatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. Cell Mol Life Sci;54:833–50.
50. Satyaprakash, M., Nikitha, T. Reddi, E. U. B. Sadhana, B. and Vani, S. S. 2017. A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition," International Journal of Current Microbiology and Applied Scences, 6: 2133–2144.
51. Scervino, J.M., Mesa, M.P., Mo´nica, I.D., Recchi, M., Moreno, N.S., and Godeas, A. 2010a. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fertil Soil 46:755–763.
52. Scervino, J.M., Mesa, M.P., Mo´nica, I.D., Recchi, M., Moreno, N.S., Godeas, A. 2010b. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fertil Soils 46:755763
53. Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V. and Saraswathi, K. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques, Biochemistry and Molecular Biology Journal, 3: 1-12.
54. Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S., and Elsas, J.D. 2012. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing Enterobacter sp. Fs-11. World J Microbiol Biotechnol 28:2749–2758.
55. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2 (1): 58-67.
56. Shenoy, V.V., Kalagudi, G.M. 2005. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. Biotechnol Adv 23:501–513.
57. Shin, W., Ryu, J., Kim, Y., Yang, J., Madhaiyan, M., Sa, T. 2006. Phosphate solubilization and growth promotion of maize [Zea mays L.] by the rhizosphere soil fungus Penicillium oxalicum. In: 18th World congress of soil science. 9–15 July, Philadelphia, PA
58. Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. In: Page A.L, Miller, R.H., Keeney, D.R. (eds) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, 2nd edn. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 903–948.
59. Tarafdar, J.C., Marschner, H. 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. Soil Biol Biochem 26:387–395.
60. Tate, K. R .1984. The biological transformation of P in soil. Plant Soil 76:245–256
61. Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils 30:460–468.
62. Vyas, P., Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas. BMC Microbiol 9:174
63. Walpola, B. C. and Yoon,M. 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: a review, African Journal of Microbiology. 6 (37): 6600-6605.
64. Wang, X., Wang, Y., Tian, J., Lim, B.L., Yan, X., and Liao, H. 2009. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. Plant Physiol 151:233–240.
65. Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., Fan, Y. and Wei, Z. 2018. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of

www.SID.ir

Archive of SID

phosphorus solubilization during composting with enriched phosphatesolubilizing bacteria inoculation. Bioresour. Technol. 247: 190-199.

66. Xu, J. C., Huang, L. M., Chen, C., Wang, J., and Long, X. X. (2019). Effective lead immobilization by phosphate rock solubilization mediated by phosphate rock amendment and phosphate solubilizing bacteria. Chemosphere, 237, 124540.
67. Yadav, B.K., and Verma, A. 2012. Phosphate solubilization and mobilization in soil through soil microorganisms under arid ecosystems, the functioning of ecosystems. In: Ali, M. (ed) In Tech. ISBN:978-953-51-0573-2, Available from http://www.intechopen.com/books/the-functioning-of ecosystems/phosphate-solubilization-and-mobilization-in-soil-through-microorganismsunder-arid-ecosystems.
68. Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. 2008. Exo-polysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. World J Microbiol Biotechnol 24:1059–1065.
69. Yuan, B.C., Li, Z.Z., Liu, H, Gao, M., Zhang, Y.Y. 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Appl Soil Ecol 35:319–328.
70. Zafar,Z. I. 1993. Beneficiation of low grade carbonate-rich phosphate rocks using dilute acetic acid solution, Fertilizer Research, 34(2) : 173–180.

www.SID.ir

Archive of SID

Solubilization Mechanisms of Insoluble Phosphates by Phosphate Solubilizing Microorganisms

A. Fallah Nosratabad[1]
Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: Rezafayah@yahoo.com
Received: July, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Phosphorus is one of the most important elements required by plants and it has many different roles, including energy production and transfer, increasing rooting, grain production and improving the quantity and quality of agricultural products. Unfortunately, more than 70% of the phosphorus entering the soil through phosphate fertilizers is stabilized and removed from the accessibility of plants. Therefore, phosphorus stabilization has caused the use of more chemical fertilizers and the amount of total phosphorus in the soil has increased and sometimes the entry of elements along with phosphate fertilizer may cause soil pollution. In order to increase the solubility of insoluble phosphates in the soil or to prevent phosphorus stabilization, environmentally friendly phosphate-solubilizing microorganisms (PSM) such as bacteria, fungi, actinomycetes and algae can be employed. These microorganisms are able to convert insoluble inorganic and organic compounds of phosphorus into soluble compounds by various methods such as production of mineral and organic acids, proton production, and secretion of siderophore, chelation and production of phosphatase enzyme. In mineral soils containing large amounts of calcium, magnesium, iron and aluminum phosphates, the production of mineral and organic acids and in organic soils the phosphatase enzymes are mostly effective. Genes encoding phosphate solubility have been isolated mainly from *Erwiniaherbicola*, *Esherichia coli* and *Morgonellamorgani*. Some of these genes include *ushA*, *agp*, *cpdB* and n*apA*. Despite the existing problems, fortunately, good progress has been made in the field of genetic engineering of phosphate-solubilizing microorganisms so that phosphate-solubilizing genes can be transferred to other bacteria. Due to the fact that soils contain both inorganic and organic compounds, it is recommended to use a microorganism with the ability to dissolve both organic and mineral compounds and a mixture of some microorganisms.

Keywords: Phosphatase, Genes, Mechanism, Phosphate solubilization, Organic and Mineral Acids

[1]. Corresponding author: Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

www.SID.ir