



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Research article

Development and Validation of a Novel Rapid Three-Dimensional Assay for Phosphate Solubilization in Spore-Forming Gram-Positive Bacteria

Shakiba Reisi¹, Hossein Ali Alikhani¹, Alireza Fallah Nosrat Abad^{2*}, Bahman Khoshru^{2*} , and Ahmad Ali Pourbabaei¹

¹ Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

² Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Article Info

Extended Abstract

Received: 2026-06-03

Accepted: 2026-07-12

Keywords:

Bacillus,
Microbial screening,
Biofertilizer,
Semi-solid medium,
Solubilization halo

Corresponding author's email:

a.r.fallah1350@gmail.com
bahmankhoshru@yahoo.com

Doi:

10.22092/SBJ.2026.372945.2
94

Author Contributions:

Sh. Reisi:

Investigation, Data curation,
Formal analysis, Writing –
original draft.

H.A. Alikhani:

Conceptualization,
Supervision, Validation.

A. Fallah Nosrat-Abad:

Conceptualization,
Methodology, Resources,
Supervision, Writing –
review & editing.

Background and Objectives: Insoluble phosphates are among the major factors limiting phosphorus nutrition in calcareous soils, and the accurate selection of efficient phosphate solubilizing bacteria (PSB) is essential for the development of P biofertilizers. This study aimed to design and evaluate a new culture medium formulation (FKR), in combination with a semi solid three dimensional platform, for quantitative and qualitative screening of PSB, mainly belonging to the genus *Bacillus*.

Materials and Methods: A collection of 299 Gram positive bacterial isolates, predominantly *Bacillus* spp. obtained from the rhizosphere of maize plants under different field conditions and cultivars, was first grown on the FKR medium and on three standard media, Pikovskaya (PVK), NBRIP and Sperber (SP). The percentage of positive isolates, halo diameter and two dimensional solubilization index (SI) on plates were measured and evaluated using appropriate statistical tests (one way ANOVA and Duncan's multiple range test at 5% probability, as well as suitable tests for comparison of proportions such as chi square or Fisher's exact test). The performance of the same isolates was then assessed in semi solid three dimensional FKR tubes (with and without the BCP pH indicator), based on solubilization depth (SD) and solubilization volume (SV) indices, growth patterns along the oxygen gradient, and secondary metabolic traits (gas production, liquefaction, and medium alkalization).

Results: The FKR medium alone identified 164 isolates as PSB (55% of the 299 isolates), whereas the mean percentage of positive isolates on the three standard media PVK, NBRIP and SP was only 19.3% (20, 20 and 18%, respectively). This difference in the proportion of positive isolates was statistically significant ($P < 0.05$), indicating that the FKR formulation increased screening efficiency by approximately 2.95 fold compared with the average of the three standard media. At the same time, the proportion of false negative results on the standard media was about 80–82% (239–245 isolates without halos), whereas this proportion decreased to 45% (135 isolates) on FKR, revealing part of the hidden phosphate solubilizing potential under nutrient limited standard conditions. In terms of qualitative differentiation based on SI, the FKR medium detected eight isolates in the very strong class (class A; $SI \geq 2.5$), while the three standard media together detected only two isolates in this class and NBRIP did not detect any class A isolate, highlighting

B. Khoshru:

Conceptualization,
Methodology, Validation,
Formal analysis, Writing –
review & editing.

A.A. Pourbabaie:

Supervision, Validation.
All authors have read and
agreed to the published
version of the manuscript.

a systematic limitation of minimal formulations in detecting high performance strains. In the three dimensional evaluation, the semi solid FKR–BCP tube method exhibited a clear advantage over plate assays in terms of speed and clarity of response: within the first 24 h, more than 75% of the solubilizing isolates produced a distinct yellow zone along the semi solid column, whereas in the same period fewer than 5% of these isolates formed a reliable clear halo on solid FKR plates ($P \leq 0.05$). Three dimensional quantification based on SD showed that top performing isolates could generate solubilization depths exceeding 40 mm along the column, and calculation of the volumetric SV index (mm^3) provided a more comprehensive picture of the intensity and spatial extent of activity. Comparison of the ranking of the ten best isolates according to SI and SV revealed substantial changes in the relative position of some strains. For instance, isolate FKR S10, with the highest SI (3.50), ranked first in two dimensional assays but dropped to rank 61 in terms of SV ($2,031 \text{ mm}^3$), whereas isolate FKR S94, with a moderate SI (2.47; rank eight), showed the highest SV ($10,244 \text{ mm}^3$) and ranked first in three dimensional assays. Overall, about 15% of ranks were markedly shifted between the two approaches, indicating that two dimensional evaluation may underestimate the true potential of isolates with invasive and deep growth. From a metabolic perspective, the three dimensional system led to the discovery of phenomena that were not visible in plate assays. In total, six isolates ($\approx 3.8\%$ of the population evaluated in tubes) exhibited an alkalizing solubilization pattern and produced a dark purple halo in FKR–BCP due to local pH increase, likely associated with alkaline phosphatase activity or secretion of calcium chelating and other complexing agents. Moreover, about 7% of active isolates produced gas (fine bubbles along the diffusion path) and around 2% liquefied the semi solid matrix, indicating the production of extracellular hydrolytic enzymes. Finally, three main growth patterns along the oxygen gradient of the semi solid column surface (pellicle/ring), continuous vertical, and banded (layered) were recorded, providing valuable qualitative information on the ecophysiology and respiratory preferences of the isolates.

Conclusion: The results demonstrate that combining the FKR chemical formulation with a semi solid three dimensional system markedly increases the sensitivity and resolution of detection, quantification and functional differentiation of *Bacillus* PSB compared with classical plate based methods. By substantially reducing false negatives, enabling volumetric quantification (SV), revealing both acidic and non acidic solubilization mechanisms, and capturing secondary metabolic activities and growth patterns along oxygen gradients, this platform provides an efficient and exploratory tool for targeted selection of robust, high performance strains for the development of phosphate biofertilizers, particularly for calcareous and alkaline soils.

Cite this article: Reisi, Sh., Alikhani, H., Fallah Nosratabad, A., Khoshru, B., Pourbabaie, A.A., 2026. Development and validation of a novel rapid three-dimensional assay for phosphate solubilization in spore-forming gram-positive bacteria. *Journal of Soil Biology*, 14 (1),81- 103.



DOI: 10.22092/SBJ.2026.372945.294

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

توسعه و اعتبارسنجی یک روش نوین ارزیابی سریع و سه‌بعدی انحلال فسفات در باکتری‌های گرم‌مثبت اسپوردار

شکیبا رئیسی^۱، حسینعلی علیخانی^۱، علیرضا فلاح نصرت‌آباد^{۲*}، بهمن خوشرو^{۲*}  و احمدعلی پوربابائی^۱

^۱ گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

^۲ مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۱

چکیده

این پژوهش با هدف طراحی و ارزیابی یک محیط کشت جدید (FKR) همراه با یک بستر سه‌بعدی نیمه‌جامد برای غربالگری کمی و کیفی PSB، عمدتاً از جنس *Bacillus*، انجام شد. ۲۹۹ جدایه گرم‌مثبت، عمدتاً *Bacillus* از ریزوسفر ذرت، روی محیط‌های جامد FKR و سه محیط استاندارد (Pikovskaya (PVK)، NBRIP و Sperber (SP) کشت داده شدند. سپس جدایه‌ها در لوله‌های حاوی FKR-BCP نیمه‌جامد بر اساس شاخص عمق (SD) و حجم انحلال (SV)، الگوهای رشد در گرادیان اکسیژن و ویژگی‌های متابولیکی ثانویه بررسی شدند. محیط FKR به‌تنهایی ۵۵ درصد سویه‌ها را به عنوان PSB شناسایی کرد، در حالی که میانگین سه محیط استاندارد تنها ۱۹٫۳ درصد (۲۰، ۲۰ و ۱۸ درصد) بود ($P < 0.05$)، که بیانگر افزایش حدود ۲٫۹۵ برابری کارایی غربالگری است. سهم نتایج منفی کاذب در محیط‌های استاندارد حدود ۸۰-۸۲ درصد و در FKR فقط ۴۵ درصد بود. در سامانه سه‌بعدی، طی ۲۴ ساعت نخست، بیش از ۷۵ درصد سویه‌های فعال، ناحیه زرد مشخص در ستون نیمه‌جامد ایجاد کردند، در حالی که در همان بازه، کمتر از ۵ درصد روی پلیت FKR هاله قابل‌اعتماد داشتند ($P < 0.05$). سویه‌های برتر موفق به ایجاد عمق انحلالی بیش از ۴۰ میلی‌متر شدند. بررسی‌ها نشان داد که با تغییر رویکرد از ارزیابی دوبعدی (SI) به سه‌بعدی (SV)، جایگاه حدود ۱۵ درصد از سویه‌ها تغییر می‌کند. در مجموع، ۶ سویه (۳/۸ درصد) الگوی انحلال قلیایی، حدود ۷ درصد تولید گاز و حدود ۲ درصد مایع‌سازی محیط نیمه‌جامد را نشان دادند. ترکیب فرمولاسیون FKR با روش سه‌بعدی نیمه‌جامد و کمی‌سازی حجمی (SV)، ابزاری کارآمد برای انتخاب هدفمند سویه‌های مناسب توسعه کودهای زیستی فسفات در خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، غربالگری میکروبی، کود زیستی، محیط کشت نیمه‌جامد، هاله انحلال.

مقدمه

فسفر (P) به‌عنوان یکی از عناصر اصلی و درشت‌مغذی گیاه، نقشی بنیادی و غیرقابل جایگزین در فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کلیدی دارد. با وجود این اهمیت، بخش قابل توجهی از فسفر کل در اغلب خاک‌های زراعی جهان، به‌ویژه در خاک‌های آهکی و قلیایی که سهم بالایی از اراضی ایران را تشکیل می‌دهند، به‌صورت ترکیبات معدنی نامحلول یا در قالب ترکیبات آلی پیچیده تثبیت شده و برای ریشه گیاه غیرقابل دسترس باقی می‌ماند (Alori et al., 2017; Menezes-Blackburn et al., 2018). این وضعیت که به طور گسترده با عنوان «معضل فسفر» شناخته می‌شود، فراهمی فسفر را به طور چشمگیری محدود کرده و کشاورزان را به مصرف دوزهای بالای کودهای فسفاته شیمیایی وا می‌دارد. اتکای مداوم به این نهاده‌ها، علاوه بر تحمیل هزینه‌های اقتصادی، با پیامدهای نامطلوب زیست‌محیطی از جمله آلودگی منابع آب، بروز اوتروفیکاسیون و تشدید نگرانی‌ها درباره پایداری ذخایر محدود سنگ فسفات همراه است (Alewell et al., 2020).

در چارچوب گذار به نظام‌های کشاورزی پایدار، باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB^1) به عنوان یکی از اجزای کلیدی کودهای زیستی، توجه روزافزون پژوهشگران و صنعت را به خود جلب کرده‌اند. این ریزجانداران با بهره‌گیری از سازوکارهایی نظیر تولید اسیدهای آلی، ترشح آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی، رهاسازی شلات‌کننده‌های فلزی و تولید متابولیت‌های تنظیم‌کننده رشد، قادرند فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول را به فرم‌های قابل حل و قابل جذب برای گیاه ($H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-}) تبدیل کنند (Rawat et al., 2021; Bargaz et al., 2018). استفاده هدفمند از PSB نه تنها وضعیت تغذیه‌ای فسفر را در گیاه بهبود می‌بخشد، بلکه در ارتقای کیفیت زیستی و ساختاری خاک، افزایش کارایی

مصرف نهاده‌های شیمیایی و کاهش اثرات مخرب زیست‌محیطی نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (Castanheira et al., 2021; Khoshru et al., 2020). در این چارچوب، انتخاب و شناسایی سویه‌های PSB با کارایی بالا، نخستین گام حیاتی در توسعه کودهای زیستی مؤثر و پایدار به‌شمار می‌رود.

روش رایج برای غربالگری اولیه PSB، استفاده از محیط‌های کشت جامد نظیر پیکوفسکایا،^۲ NBRIP و اسپربر است که در آن توانایی انحلال فسفات از طریق تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی و بر اساس یک شاخص دوبعدی سطحی (SI^3) ارزیابی می‌شود (Nautiyal, 1999; Mendes et al., 2021). با وجود کاربرد گسترده، این رویکرد با محدودیت‌های متعددی همراه است. تشکیل هاله اغلب کند بوده و ممکن است چند روز تا بیش از یک هفته زمان نیاز داشته باشد؛ و ضوح هاله برای برخی سویه‌ها پایین است؛ و مهم‌تر آن‌که، ارتباط بین اندازه هاله در این محیط‌ها و توان واقعی انحلال فسفات در شرایط پیچیده و چندفازی خاک، ضعیف و در بسیاری موارد غیرخطی گزارش شده است (Rodríguez & Fraga, 2017; Behera et al., 1999). در نتیجه، عملکرد مطلوب یک سویه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی لزوماً تضمین‌کننده موفقیت آن در محیط ناهمگن و رقابتی خاک نیست. این شکاف عملکردی یکی از عوامل اصلی ناکامی برخی فرمولاسیون‌های کود زیستی در آزمایش‌های مزرعه‌ای محسوب می‌شود و نیاز به توسعه رویکردهای دقیق‌تر، سریع‌تر و واقع‌بینانه‌تر برای غربالگری PSB برجسته می‌سازد (Bashan et al., 2013; Malusá et al., 2017; Timmusk et al., 2016; Khosravi et al., 2024).

این محدودیت‌ها در مورد باکتری‌های گرم‌مثبت، به‌ویژه اعضای جنس *Bacillus*، شدیدتر بروز می‌کند و از منظر کاربردی نیز اهمیت بالایی دارد. بسیاری از محیط‌های استاندارد رایج، دارای فرمولاسیون حداقلی بوده

^۳ Solubilization Index^۱ Phosphate-Solubilizing Bacteria^۲ National Botanical Research Institute's phosphate growth medium

و فاقد منابع غنی نیتروژن آلی (مانند پپتون) و فاکتورهای رشد موجود در عصاره مخمر هستند؛ در نتیجه، تأمین نیازهای متابولیکی پیچیده‌تر و مسیرهای اسیدزایی در این گروه از ریزجانداران به طور کامل صورت نمی‌گیرد. پیامد این وضعیت، بروز درصد بالایی از نتایج منفی کاذب است؛ بدین معنا که سویه‌هایی با پتانسیل ژنتیکی و متابولیکی بالا برای انحلال فسفات، به دلیل شرایط فقیر محیط‌های استاندارد قادر به ایجاد هاله شفاف نیستند و در مراحل اولیه غربالگری حذف می‌شوند (Bashan et al., 2013; Sharma et al., 2013). این در حالی است که *Bacillus*‌های اسپوردار به دلیل مقاومت بالای اسپور در برابر خشکی، حرارت، فشار اسمزی و سایر تنش‌های فیزیکی و شیمیایی، از مناسب‌ترین گزینه‌ها برای کاربردهای صنعتی و تولید کودهای زیستی پایدار، به‌ویژه در قالب فرمولاسیون‌های گرانولی و محصولات تجاری بلندمدت، به‌شمار می‌روند (Schisler et al., 2004; Malusá & Vassilev, 2014; Rouphael et al., 2015). چنین ناهمخوانی‌ای نشان‌دهنده یک شکاف روش‌شناختی جدی بین نیاز صنعت به سویه‌های مقاوم و چندمنظوره و توان محدود روش‌های استاندارد در شناسایی مؤثر آن‌ها است.

در راستای کاهش این شکاف و بهبود پتانسیل حل‌کنندگی باکتری‌ها (Khoshru et al., 2023)، در یک مطالعه پیشین، یک محیط کشت نوین با عنوان FKR^۴ به طور ویژه برای غربالگری باکتری‌های گرم‌مثبت حل‌کننده فسفات، با تمرکز بر جنس *Bacillus*، طراحی و به صورت اولیه اعتبارسنجی شد (Reisi et al., 2025). در آن مطالعه، محیط FKR به طور میانگین حدود ۵۲ درصد از سویه‌ها را به عنوان PSB شناسایی کرد، در حالی که این نسبت برای مجموعه‌ای از محیط‌های استاندارد (NBRIP، پیکوفسکایا و اسپربر) در حدود ۱۹ درصد گزارش شد؛ به عبارت دیگر، کارایی شناسایی در FKR تقریباً ۲/۵ تا ۲/۷ برابر بالاتر بود. علاوه بر این، FKR مجموعاً ۹ سویه

را در کلاس بسیار قوی ($\geq 2/5$ SI) شناسایی نمود، در حالی که سه محیط استاندارد در مجموع تنها دو سویه را در این کلاس ثبت کردند. استفاده از نسخه حاوی شناساگر pH (FKR-BCP) نیز نشان داد که در صد قابل توجهی از سویه‌ها، علیرغم تولید اسید، در محیط‌های استاندارد، هاله انحلال شفاف ایجاد نمی‌کنند و در نتیجه به عنوان کاذب طبقه‌بندی می‌شوند. این یافته‌ها FKR را به عنوان یک بستر غربالگری حساس‌تر و دقیق‌تر برای انتخاب سویه‌های برتر معرفی کردند، اما ارزیابی انجام‌شده همچنان عمده‌تاً بر اساس یک شاخص دوبعدی سطحی (SI) و سامانه‌های مبتنی بر محیط کشت جامد^۵ صورت گرفته بود (Reisi et al., 2025; Bashan et al., 2013).

با این وجود، چندین جنبه کلیدی در ارزیابی عملکرد این محیط نوین و رفتار واقعی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شرایط شبه سه‌بعدی، هنوز به طور نظام‌مند بررسی نشده است. از جمله این جنبه‌ها می‌توان به دینامیک عمقی انحلال فسفات، اثر هندسه محیط کشت (مانند شعاع لوله آزمایش، ارتفاع ستون محیط و نسبت سطح به حجم) بر انتشار اسید و گرادیان pH، و نیز ارتباط کمی بین شاخص‌های دوبعدی (SI) و شاخص‌های حجمی جدید اشاره کرد؛ موضوعاتی که در سال‌های اخیر در قالب مدل‌سازی انتشار در محیط‌های متخلخل و ریزوسفر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Hinsinger et al., 2018; van der Bom et al., 2011). درک این ابعاد برای نزدیک‌تر کردن شرایط غربالگری آزمایشگاهی به وضعیت واقعی ریزوسفر و انتخاب دقیق‌تر سویه‌های کارآمد، ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعه حاضر با هدف پر کردن این خلأ، به توسعه و ارزیابی یک سامانه نیمه‌جامد لوله‌ای مبتنی بر محیط FKR می‌پردازد. در این سامانه، با کاهش تراکم آگار، فضای فیزیکی رشد باکتری و انتشار اسید از یک سطح دوبعدی (پلایت) به یک ماتریکس حجمی و سه‌بعدی (سیلندر نیمه‌جامد) تغییر می‌یابد و بر این اساس،

^۵ Plate-based^۴ Fallah-Khoshru-Reisi

یک شاخص سه‌بعدی انحلال (SV^۶) تعریف و محاسبه می‌شود و رابطه آن با SI، رفتار اسیدی/غیراسیدی سویه‌های گرم‌مثبت و هندسه سامانه کشت مورد تحلیل جامع قرار می‌گیرد. این رویکرد می‌تواند گامی در جهت طراحی پروتکل‌های غربالگری واقع‌بینانه‌تر برای انتخاب PSB، به‌ویژه در میان باکتری‌های اسپوردار جنس *Bacillus*، و در نهایت بهبود کارایی کودهای زیستی فسفات در شرایط مزرعه‌ای باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و آماده‌سازی مایه تلقیح

در این پژوهش از مجموعه‌ای شامل ۲۹۹ سویه باکتریایی گرم‌مثبت و مولد اندوسپور، عمدتاً متعلق به جنس *Bacillus*، استفاده شد. این سویه‌ها پیش‌تر مطابق پروتکل‌های استاندارد رقیق‌سازی سریالی و کشت سطحی از خاک ریزوسفر گیاه ذرت (*Zea mays* L.) در مناطق مختلف ایران جدا سازی، خالص سازی و شناسایی اولیه شده بودند (Reisi et al., 2025). این جدایه‌ها در مرحله خالص‌سازی، تحت تیمار شوک حرارتی (۸۰ درجه

سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) جهت انتخاب اختصاصی باکتری‌های اسپوردار قرار گرفته‌اند و هویت آن‌ها با رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های پایه بیوشیمیایی (نظیر کاتالاز) به عنوان *Bacillus* تأیید شده است. تمام باکتری‌ها با جمعیت مناسب (10^8 CFU/mL) تکثیر شدند و سوسپانسیون‌های تازه برای تمامی آزمون‌ها به عنوان مایه تلقیح استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و برای هر سویه و هر تیمار محیطی، تلقیح‌ها به صورت مستقل و با سه تکرار انجام شدند.

طراحی و آماده‌سازی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت استاندارد برای غربالگری PSB

به منظور ایجاد یک مبنای معتبر برای ارزیابی کارایی محیط کشت نوین، سه محیط کلاسیک و پرکاربرد از جمله Pikovskaya, Sperber و NBRIP در غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) انتخاب و به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات شیمیایی این سه محیط در (جدول ۱) ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی محیط‌های کشت استاندارد مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB).

Table 1. Chemical compositions of standard culture media used for screening phosphate-solubilizing bacteria (PSB).

Sperber's Medium (Sperber, 1958)	NBRIP (Nautiyal, 1999)	PVK (Pikovskaya, 1948)	Component (g L ⁻¹) / ترکیب
20.0	10.0	10.0	Glucose
2.0	5.0	5.0	Ca ₃ (PO ₄) ₂
—	0.1	0.5	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.5	—	—	NH ₄ Cl
0.5	0.25	0.1	MgSO ₄ ·7H ₂ O
—	5.0	—	MgCl ₂ ·6H ₂ O
—	0.2	0.2	KCl
—	0.2	—	NaCl
—	0.1	—	K ₂ SO ₄
0.002	—	0.002	MnSO ₄ ·H ₂ O
0.002	—	0.002	FeSO ₄ ·7H ₂ O
0.5	—	0.5	Yeast extract
15.0	15.0	15.0	Agar
7.0	7.0	7.0	pH

^۶ Solubilization Volume

فرمولاسیون شیمیایی محیط کشت نوین FKR

محیط کشت نوین FKR با هدف اصلی رفع محدودیت های تغذیه ای محیط های استاندارد برای باکتری های گرم مثبت، به ویژه گونه های جنس *Bacillus*، طراحی و فرموله شد.

این محیط در دو نسخه مورد استفاده قرار گرفت: الف) FKR به عنوان محیط پایه بهینه سازی شده، و ب) FKR-BCP، که همان فرمولاسیون پایه به همراه شناساگر pH بروموکروزول ارغوانی (BCP) است. ترکیبات کامل این دو نسخه محیط در (جدول ۲) آورده شده است.

جدول ۲- فرمولاسیون شیمیایی کامل محیط کشت نوین FKR و FKR-BCP.

Table 2. Complete chemical formulation of the novel FKR and FKR-BCP culture media.

FKR-BCP	FKR*	جزء ترکیبی / (g L ⁻¹) Component
منبع کربن / Carbon source		
10.0	10.0	Glucose (Dextrose)
منبع فسفات نامحلول / Insoluble phosphate source		
2.0	2.0	Tricalcium Phosphate (TCP)
منابع نیتروژن و فاکتورهای رشد / Nitrogen sources and growth factors		
1.0	1.0	Yeast Extract
0.2	0.2	Peptone
0.5	0.5	Ammonium Sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)
نمک های پایه و عناصر / Basal salts and elements		
0.2	0.2	Potassium Chloride (KCl)
0.25	0.25	Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)
—	—	Magnesium Chloride (MgCl ₂)
—	—	Calcium Chloride (CaCl ₂)
عناصر کمیاب (Trace Elements; TE)		
0.01	0.01	Manganese Sulfate (MnSO ₄)
0.01	0.01	Ferrous Sulfate (FeSO ₄)
0.01	0.01	Zinc Sulfate (ZnSO ₄)
0.01	0.01	Copper Sulfate (CuSO ₄)
اجزای دیگر / Other components		
15.0	15.0	Agar
0.02	—	pH Indicator (BCP)
~7.0	~7.0	pH

*فرمولاسیون پایه FKR پیش تر به صورت اولیه توسط Reisi و همکاران (۲۰۲۵) معرفی شده بود. در مطالعه حاضر، این فرمولاسیون با افزودن BCP تکمیل و در قالب سامانه لوله ای نیمه جامد برای غربالگری سه بعدی ارزیابی شد.

*The basal formulation of FKR was previously introduced preliminarily by Reisi et al. (2025). In the present study, this formulation was supplemented with BCP and evaluated in a semi-solid tube system for three-dimensional screening.

توسعه و پیاده سازی روش غربالگری سه بعدی

آماده سازی محیط نیمه جامد لوله ای

برای گذار از یک سیستم ارزیابی دوبعدی (سطحی) به یک سیستم سه بعدی (حجمی)، حالت فیزیکی محیط های FKR و FKR-BCP از حالت کاملاً جامد به نیمه جامد تغییر داده شد. بدین منظور، ترکیب شیمیایی هر دو محیط دقیقاً مطابق (جدول ۲) حفظ گردید، اما غلظت آگار از ۱/۵ درصد (w/v) که برای محیط جامد استاندارد به کار می رود، به ۰/۵ درصد (w/v) کاهش یافت. این کاهش غلظت آگار، بافتی ژل مانند و نیمه جامد ایجاد می کند که ضمن جلوگیری از جابجایی آزادانه

سلول ها، انتشار متابولیت ها (مانند اسیدهای آلی) را در یک ماتریکس سه بعدی امکان پذیر می سازد (Atlas, 2010). پس از حل کامل ترکیبات و تنظیم pH (تقریباً ۷)، محیط ها در فلاسک های شیشه ای اتوکلاو شدند. سپس، در شرایط استریل (هود میکروبیولوژی)، محیط های نیمه جامد مذاب به میزان ۱۰ میلی لیتر در لوله های آزمایش شیشه ای استریل با ابعاد ۱۳ × ۱۰۰ میلی متر (شعاع داخلی ۵/۵ میلی متر) توزیع شد.

تلقیح و شرایط انکوباسیون

برای اطمینان از یکسان بودن شرایط اولیه در مقایسه بین روش‌های دوبعدی (پلیت) و سه‌بعدی (لوله‌ای)، حجم مایه تلقیح در هر دو سیستم یکسان در نظر گرفته شد. با استفاده از سمپلر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد هر سویه ($OD_{600} = 0.5$) برداشت شد. در روش لوله‌ای نیمه‌جامد، نوک سرسمپلر مرکز ستون محیط فرو برده شده و حجم تلقیح دقیقاً کمی پایین‌تر از سطح محیط تزریق گردید. برای استانداردسازی عمق تلقیح در تمامی تکرارها، از سرسمپلرهای مدرج (دارای نشانگر خطی) استفاده شد و نوک سرسمپلر دقیقاً تا عمق ۵ میلی‌متری از سطح محیط نیمه‌جامد فرو برده شد.

به طور همزمان، برای روش پلیت جامد، همین حجم ۱۰ میکرولیتر در مرکز سطح محیط‌های جامد PVK، NBRIP، Sperber و FKR (با آگار ۵/۱ درصد) به صورت نقطه‌ای تلقیح شد. تمامی لوله‌ها و پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در تاریکی انکوبه شدند. مشاهدات و اندازه‌گیری‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح انجام گرفت. برای هر سویه و هر نوع محیط، حداقل سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد تا امکان تحلیل‌های آماری مناسب فراهم گردد. در طول اجرای آزمایش، لوله‌های شاهد تلقیح نشده برای پایش تغییرات خودبه‌خودی pH^۷ در تمامی انکوباتورها قرار داده بودند.

ارزیابی مقایسه‌ای و سنجش شاخص‌ها

اندازه‌گیری شاخص انحلال (SI) در روش پلیت جامد

برای ارزیابی کمی توان انحلال فسفات در روش استاندارد پلیت، از شاخص انحلال (SI^۸) استفاده شد. پس از تلقیح نقطه‌ای و انکوباسیون پلیت‌ها در شرایط ذکر شده، در زمان‌های ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت، قطر کلنی

باکتری (CD) و قطر کل ناحیه شفاف (شامل کلنی و هاله انحلال؛ HD) به‌وسیله کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. شاخص SI براساس رابطه زیر محاسبه گردید (Nautiyal, 1999; Mendes et al., 2021):

$$\text{قطر کلنی (CD)} / \text{قطر هاله شفاف (HD)} = \text{شاخص انحلال (SI)}$$
 برای حصول اطمینان از دقت اندازه‌گیری‌ها، برای هر سویه و هر محیط، حداقل سه کلنی نماینده در هر پلیت بررسی و میانگین آن‌ها به عنوان SI آن سویه در زمان مورد نظر ثبت شد. در تحلیل‌های مقایسه‌ای اصلی، SI مربوط به زمان ۷۲ ساعت به عنوان شاخص معیار در نظر گرفته شد، مگر آن‌که در نتایج خلاف آن ذکر شده باشد.

برای ارزیابی کیفی توان انحلال فسفات در روش دوبعدی، از شاخص انحلال فسفات ($SI = CD/HD$) استفاده شد و سویه‌ها براساس مقدار این شاخص در محیط‌های مختلف طبقه‌بندی شدند. نظام طبقه‌بندی به صورت زیر تعریف گردید:

- کلاس A: $SI \geq 2.5$ (سویه‌های بسیار قوی)
- کلاس B: $2.5 > SI \geq 2$
- کلاس C: $2 > SI \geq 1.5$
- کلاس D: $1.5 > SI > 1$ (سویه‌های ضعیف یا فاقد هاله قابل اتکا)

این طبقه‌بندی مبنای مقایسه کیفی عملکرد محیط‌های مختلف در شناسایی و تفکیک سویه‌های برتر قرار گرفت.

محاسبه شاخص تولید اسید (API^۹) در محیط FKR-BCP

به منظور ارزیابی توان تولید اسید جدایه‌ها، از محیط FKR حاوی شناساگر pH بروموکروزول ارغوانی (FKR-BCP) استفاده شد. در این محیط، تغییر رنگ شناساگر از بنفش به زرد نشان‌دهنده اسیدی شدن محیط اطراف کلنی است. برای هر جدایه‌ای که در اطراف کلنی

^۹ Acid Production Index^۷ Autohydrolysis^۸ Solubilization Index

اندازه‌گیری SD و محاسبه SV در همان فواصل زمانی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت انجام گرفت و به طور مشابه، برای هر سویه و هر تیمار، سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد. در تحلیل‌های مربوط به مقایسه حجمی، SV مربوط به ۷۲ ساعت به عنوان شاخص اصلی مورد استفاده قرار گرفت، مگر آن که در نتایج به طور جداگانه به تغییرات زمانی اشاره شده باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD^{۱۴}) و با سه تکرار مستقل برای هر سویه و هر تیمار محیطی اجرا شدند. داده‌های کمی حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های SI، SD و SV در ابتدا از نظر نرمال بودن توزیع با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk test) بررسی شدند. در مواردی که فرض نرمال بودن برقرار بود، برای ارزیابی وجود تفاوت‌های معنی‌دار بین محیط‌های کشت و بین سویه‌های باکتریایی، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۳) استفاده شد.

در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$)، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT^{۱۵}) انجام گرفت. برای مقایسه نسبت سویه‌های مثبت PSB در محیط‌های مختلف، آزمون کای‌دو^{۱۶} به کار گرفته شد. تمامی آزمون‌ها در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تفسیر و گزارش شدند (Malusá et al., 2016; Behera et al., 2017).

نتایج

اعتبارسنجی فرمولاسیون شیمیایی FKR در بستر استاندارد (روش دوبعدی)

نمونه‌ای از مقایسه مستقیم عملکرد محیط‌های FKR و FKR-BCP در غربالگری اولیه سویه‌ها در شکل

آن‌ها به زرد مشخص تشکیل شد، دو پارامتر قطر کلنی (CD) و قطر هاله اسیدی (AD^{۱۰}) زیر اندازه‌گیری گردید. سپس، شاخص تولید اسید (API) برای هر جدایه، با اقتباس از منطق ریاضی شاخص انحلال (Nautiyal, 1996; Edi-Premono et al., 1999)، به صورت نسبت قطر هاله رنگی اسیدی به قطر کلنی محاسبه گردید:

$$API = AD/CD$$

که در آن: AD قطر هاله زرد اسیدی (میلی‌متر) و CD قطر کلنی (میلی‌متر) است.

برای جلوگیری از تداخل بین شاخص انحلال فسفات و شاخص تولید اسید، در محیط FKR-BCP دو نوع هاله شفاف انحلال فسفات (HD) و هاله رنگی ناشی از تغییر pH (A^{۱۱}D) به طور مستقل ارزیابی شدند.

اندازه‌گیری عمق انحلال (SD) و حجم انحلال (SV) در روش لوله‌ای نیمه‌جامد

با توجه به ماهیت سه‌بعدی سیستم لوله‌ای، استفاده صرف از شاخص دوبعدی SI برای توصیف فعالیت باکتری‌ها کافی نبود. از این‌رو، دو شاخص جدید عمق انحلال (SD^{۱۲}) و حجم انحلال (SV^{۱۳}): برای ارزیابی عملکرد سویه‌ها در محیط نیمه‌جامد تعریف و از رابطه زیر محاسبه شد:

$$SV (mm^3) = \pi \times r^2 \times SD$$

که در آن، r شعاع داخلی لوله آزمایش (mm) و SD عمق انحلال اندازه‌گیری‌شده (mm) است. در این مطالعه، شعاع داخلی لوله‌ها ۵/۵ میلی‌متر در نظر گرفته شد و در تمامی محاسبات، مقدار ثابت $r = 5.5 \text{ mm}$ مورد استفاده قرار گرفت. (Crank, 1975; Berg et al., 2002). پیش‌فرض فرمول این است که ناحیه انحلال یک استوانه کامل است. لازم به توضیح است که این یک "ساده‌سازی هندسی" است، زیرا الگوی انحلال در واقعیت ممکن است مخروطی یا نامنظم باشد.

^{۱۴} Completely Randomized Design

^{۱۵} Duncan's Multiple Range Test

^{۱۶} Chi-square test

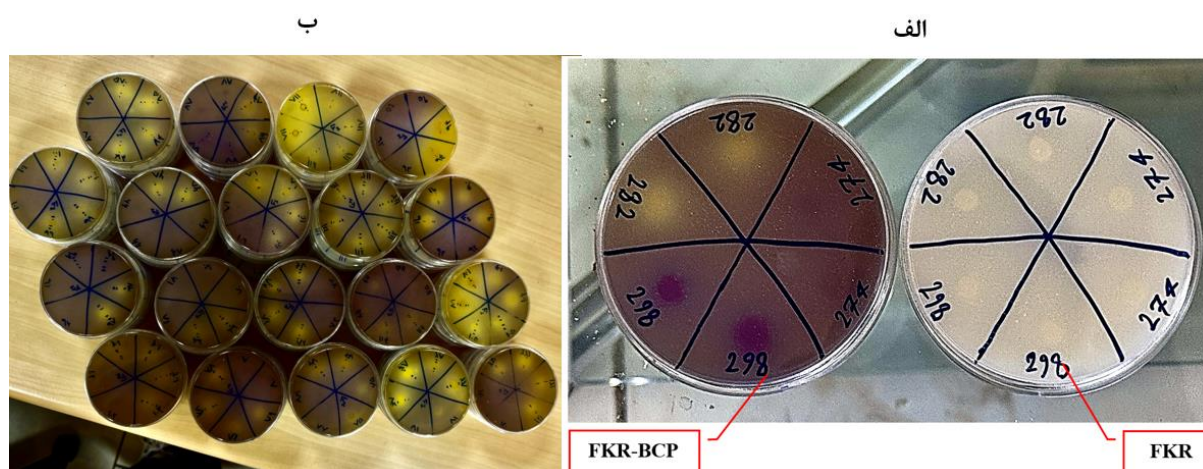
^{۱۰} Acid halo Diameter

^{۱۱} Acid/alkali halo

^{۱۲} Solubilization Depth

^{۱۳} Solubilization Volume

۱ (الف) نشان داده شده است و نمای کلی صفحات مورد استفاده برای غربالگری گسترده تمامی سویه‌ها در شکل ۱ (ب) قابل مشاهده است.



شکل ۱- الف) مقایسه عملکرد محیط‌های FKR و FKR-BCP در غربالگری اولیه سویه‌ها، ب) نمایی از محیط جامد FKR-BCP مورد استفاده در غربالگری سویه‌های مختلف جنس *Bacillus*.

Figure 1. a) Comparison of the performance of FKR and FKR-BCP media in the primary screening of strains, b) A view of the solid FKR-BCP medium used in screening various *Bacillus* strains.

سویه‌های حل‌کننده فسفات را تقریباً ۲,۹۵ برابر نسبت به میانگین سه محیط استاندارد افزایش می‌دهد.

مقایسه کمی کارایی FKR با محیط‌های کشت استاندارد

افزایش معنی‌دار توان شناسایی سویه‌های مثبت

غربالگری انجام‌شده بر روی ۲۹۹ سویه باکتریایی نشان داد که فرمولاسیون غنی شده FKR از نظر تعداد سویه‌های مثبت شناسایی‌شده، به طور معنی‌داری از محیط‌های استاندارد متداول برتر است. همان‌گونه که در (جدول ۲) خلاصه شده است، محیط FKR به‌تنهایی موفق به شناسایی ۱۶۴ سویه به عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) شد که معادل ۵۵ درصد کل سویه‌های مورد آزمون است. در مقابل، میانگین درصد شناسایی سویه‌های مثبت در سه محیط استاندارد *Pikovskaya*، *NBRIP* و *Sperber* تنها حدود ۱۹,۳ درصد بود.

تحلیل آماری (با استفاده از آزمون مناسب مقایسه نسبت‌ها؛ مثلاً آزمون کای‌دو یا آزمون دقیق فیشر) نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$). بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که فرمولاسیون FKR، به‌تنهایی کارایی فرآیند غربالگری

کاهش چشمگیر نتایج منفی کاذب

یکی از یافته‌های کلیدی در این بخش، کاهش قابل توجه سهم نتایج منفی کاذب در حضور محیط FKR بود. در محیط‌های استاندارد، حدود ۸۰ درصد از سویه‌ها فاقد هرگونه هاله انحلال قابل مشاهده بودند و به عنوان منفی طبقه‌بندی شدند؛ در حالی که این نسبت در محیط FKR به حدود ۴۵ درصد کاهش یافت (جدول ۳). به بیان دیگر، محیط FKR توانست بخشی از پتانسیل انحلال فسفات که در شرایط تغذیه‌ای محدود محیط‌های استاندارد پنهان می‌ماند، آشکار کند.

این یافته نشان می‌دهد که غنای تغذیه‌ای و طراحی شیمیایی FKR، شرایط فیزیولوژیک مناسب‌تری برای بیان ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات فراهم می‌آورد و از برآورد کمتر از واقع توان واقعی سویه‌ها جلوگیری می‌کند.

جدول ۳- مقایسه کمی عملکرد محیط‌های کشت در شناسایی سویه‌های مثبت و منفی کاذب در روش پلیت دوبعدی.

Table 3. Quantitative comparison of culture media in identifying positive strains and false-negative strains using the two-dimensional plate method.

محیط کشت / Culture medium	تعداد سویه‌های مثبت / Number of positive strains	شناسایی سویه‌های مثبت (%) / Positive strain identification (%)	تعداد سویه‌های فاقد هاله (منفی کاذب) / Number of strains lacking halo (false negative)	درصد نتایج منفی کاذب / False negative (%) results
FKR	164	55	135	45
FKR-BCP	150	50	149	50
Pikovskaya (PVK)	60	20	239	80
NBRIP	60	20	239	80
Sperber (SP)	54	18	245	82

مقایسه کیفی کارایی FKR با محیط‌های کشت استاندارد

توانایی برتر در تفکیک و شناسایی سویه‌های بسیار قوی

برتری محیط FKR تنها به افزایش تعداد سویه‌های مثبت محدود نشد، بلکه در قابلیت تفکیک کیفی

و شناسایی سویه‌های بسیار قوی نیز به طور بارزی مشاهده گردید. بر اساس طبقه‌بندی مبتنی بر شاخص SI، محیط FKR توانست ۸ سویه را در کلاس بسیار قوی (کلاس A؛ $SI \geq 2.5$) شناسایی کند؛ در حالی که مجموع سه محیط استاندارد، با وجود ارزیابی همان مجموعه سویه‌ها، تنها ۲ سویه را در این کلاس ثبت کردند (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه توانایی برتر محیط FKR نسبت به محیط‌های مرسوم در تفکیک و شناسایی سویه‌های کارآمد.

Table 4. Comparison of FKR medium's superior ability over conventional media in differentiating and identifying efficient strains.

ویژگی میکروبی / شاخص ارزیابی / Microbial characteristic / Evaluation index	FKR (%)	FKR-BCP (%)	Sperber (SP) (%)	Pikovskaya (PVK) (%)	NBRIP (%)
الگوهای فنوتیپی کلنی‌ها / Phenotypic patterns of colonies					
فاقد هاله اسید و فاقد هاله انحلال / Lacking acid halo and lacking solubilization halo	35	35	35	35	35
دارای هاله اسید (تغییر رنگ محیط) / Having acid halo (medium color change)	—	65	—	—	—
دارای هاله اسید و فاقد هاله انحلال / Having acid halo and lacking solubilization halo	11	15	47	45	45
دارای هاله انحلال (مجموع سویه‌های مثبت) / Having solubilization halo (total positive strains)	55	50	18	20	20
تفکیک کیفی سویه‌های دارای هاله / Qualitative differentiation of halo-producing strains (SI)					
کلاس D (ضعیف یا فاقد هاله اتکا؛ $SI < 1.5$) / Class D (Weak or lacking reliable halo; $SI < 1.5$)	33	33	7	13	12
کلاس C (متوسط؛ $1.5 \leq SI < 2$) / Class C (Moderate; $1.5 \leq SI < 2$)	15	11	8	6	8
کلاس B (قوی؛ $2 \leq SI < 2.5$) / Class B (Strong; $2 \leq SI < 2.5$)	3	3	3	0	0
کلاس A (بسیار قوی؛ $SI \geq 2.5$) / Class A (Very strong; $SI \geq 2.5$)	3	4	1	1	0

مقادیر عددی نشان‌دهنده درصد سویه‌های دارای آن ویژگی در هر محیط کشت است (مبتنی بر جمعیت ۲۹۹ جدایه‌ای مورد مطالعه). فراوانی مطلق سویه‌های

مثبت در ردیف "مجموع سویه‌های مثبت" در این جدول، با نتایج ارائه شده در (جدول ۲) مطابقت کامل دارد.

الگوهای فنوتیپی کلنی‌ها

نتایج این بخش به وضوح نشان‌دهنده پدیده «منفی کاذب» در محیط‌های استاندارد است. در حالی که درصد بالایی از سویه‌ها (حدود ۴۵ تا ۴۷ درصد) در محیط‌های کلاسیک توانایی تولید اسید را دارند، اما به دلیل محدودیت‌های تغذیه‌ای این محیط‌ها، نمی‌توانند هاله انحلال شفاف‌ی ایجاد کنند. در مقابل، محیط FKR این محدودیت را شکسته و توانسته مجموع سویه‌های مثبت (دارای هاله انحلال) را به ۵۰ الی ۵۵ درصد برساند. محیط حاوی شناساگر (FKR-BCP) نیز به خوبی اثبات می‌کند که ۶۵ درصد از کل سویه‌های بررسی‌شده، دارای پتانسیل اسیدزایی هستند که این ظرفیت در محیط‌های قدیمی پنهان می‌ماند.

تفکیک کیفی سویه‌های دارای هاله

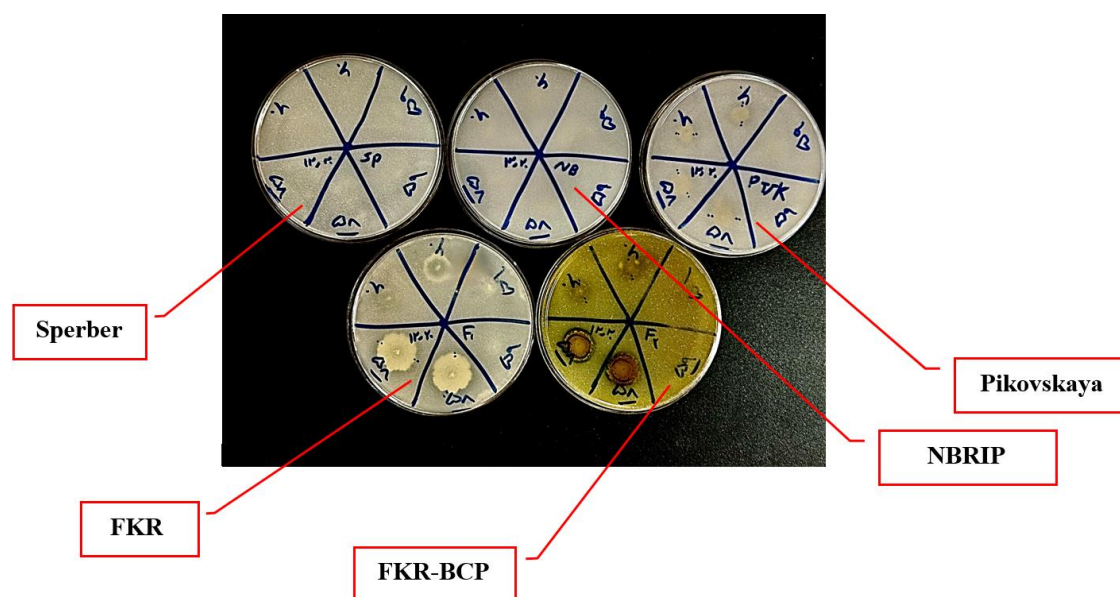
این بخش برتری کیفی محیط جدید را ثابت می‌کند. محیط‌های استاندارد مانند NBRIP و PVK در شناسایی سویه‌های قدرتمند (کلاس A و B) کاملاً ناتوان بوده‌اند (صفر درصد). در حالی که محیط FKR توانسته است با فراهم کردن شرایط بهینه، پتانسیل واقعی این سویه‌های ارزشمند را که کاندیداهای اصلی برای تولید کود زیستی هستند، با دقت بالایی شناسایی و غربال کند.

نکته قابل توجه اینکه محیط NBRIP، با وجود شناخته‌شدن به عنوان محیطی بافر شده و نسبتاً دقیق برای مطالعات انحلال فسفات، در شناسایی هیچ‌یک از سویه‌های بسیار قوی (کلاس A) موفق نبود. این الگو نشان می‌دهد که فرمولاسیون‌های حداقلی استاندارد، به طور سیستماتیک پتانسیل واقعی برخی از سویه‌های با عملکرد بالا را دست‌کم می‌گیرند و قدرت تفکیک آن‌ها در انتخاب کاندیداهای برتر برای تولید کود زیستی محدود است.

بهبود وضوح و شفافیت هاله‌های انحلال

علاوه بر تفاوت‌های کمی، اختلافات کیفی بارزی نیز در ویژگی‌های بصری هاله‌های انحلال بین محیط‌ها مشاهده شد. هاله‌های تشکیل‌شده بر روی محیط FKR عموماً دارای لبه‌های واضح‌تر، شفافیت بیشتر و قطر بزرگ‌تر بودند؛ ویژگی‌هایی که اندازه‌گیری دقیق قطر هاله (HD) را تسهیل می‌کردند و خطای دیداری را کاهش می‌دادند. در مقابل، هاله‌های تشکیل‌شده بر روی محیط‌های استاندارد، به ویژه Pikovskaya، اغلب محو، کم‌رنگ و در مواردی همراه با رسوبات موضعی بودند که تشخیص دقیق مرز هاله را دشوار کرده و عدم قطعیت در اندازه‌گیری را افزایش می‌داد.

این بهبود در کیفیت بصری، تکرارپذیری اندازه‌گیری‌ها و قابلیت اعتماد به ارزیابی کیفی را در محیط FKR به طور محسوسی افزایش داد. نمونه‌ای از این تفاوت بصری برای یک سویه معرف در (شکل ۲) ارائه شده است.



شکل ۲- مقایسه بصری عملکرد سویه‌های *Bacillus* بر روی محیط کشت نوین FKR در مقایسه با محیط‌های استاندارد.
Figure 2. Visual comparison of the performance of *Bacillus* strains on the novel FKR culture medium compared to standard media.

کاهش می‌دهد و کارایی فرآیند غربالگری را به طور معنی‌داری افزایش می‌بخشد.

وضوح بالاتر در تفسیر نتایج: ناحیه زرد در مقابل هاله شفاف

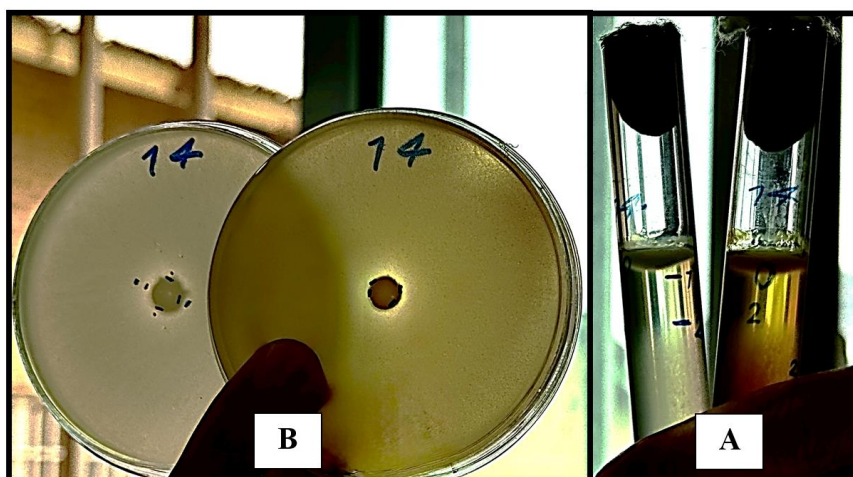
علاوه بر سرعت، وضوح و قطعیت در تفسیر نتایج نیز در روش لوله‌ای به مراتب بالاتر بود. تغییر رنگ شدید و مشخص شناساگر BCP از بنفش به زرد، یک پاسخ تقریباً دوتایی و بدون ابهام (فعال/غیرفعال) برای تشخیص تولید اسید فراهم آورد. این نوع پاسخ، وابستگی به قضاوت چشمی اپراتور را کاهش داده و خطاهای ناشی از تفسیرهای متفاوت را به حداقل می‌رساند. در مقابل، تشخیص و اندازه‌گیری هاله‌های شفاف در روش پلیت، به خصوص برای سویه‌های با فعالیت مرزی، اغلب با چالش‌هایی نظیر محو بودن لبه‌ها، تداخل با بافت کلنی و آرتیفکت‌های سطحی محیط همراه بود. این تفاوت، روش لوله‌ای نیمه‌جامد را به ابزاری مناسب برای غربالگری سریع، دقیق و قابل اعتماد تعداد زیادی از سویه‌ها تبدیل می‌کند (شکل ۳).

ارزیابی روش نوین غربالگری سه‌بعدی (روش لوله‌ای نیمه‌جامد)

برتری سینتیک و وضوح بصری روش نوین (تشخیص فعالیت انحلال در کمتر از ۲۴ ساعت)

مهم‌ترین مزیت روش لوله‌ای نیمه‌جامد، کاهش قابل توجه زمان لازم برای تشخیص فعالیت انحلال بود. پایش روزانه نمونه‌ها نشان داد که در طی ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح، بیش از ۷۵ درصد از سویه‌های دارای پتانسیل انحلال، فعالیت متابولیکی خود را به صورت ناحیه‌ای زردرنگ و کاملاً مشخص در محیط نیمه‌جامد FKR-BCP نشان دادند. در مقابل، در همین بازه زمانی، کمتر از ۵ درصد از سویه‌های مشابه روی محیط جامد FKR در پلیت، هاله شفاف قابل مشاهده و قابل اندازه‌گیری ایجاد کردند.

این اختلاف چشمگیر ($P \leq 0.05$) نشان می‌دهد که تغییر از سطح دویعدی به ماتریکس سه‌بعدی نیمه‌جامد، با افزایش سطح تماس، بهبود انتشار متابولیت‌ها و فراهم کردن ریزمحیط‌های مناسب‌تر، زمان لازم برای شناسایی اولیه سویه‌های فعال را از چندین روز به کمتر از یک روز



شکل ۳- مقایسه وضوح نتایج پس از ۲۴ ساعت؛ (A) پاسخ سریع و واضح در روش لوله‌ای نیمه‌جامد با محیط‌های FKR و FKR-BCP، (B) هاله ضعیف در روش استاندارد پلیت برای همان سویه. (قطر پلیت‌ها: ۹۰ میلی‌متر، قطر لوله‌های آزمایش: ۱۳ میلی‌متر).

Figure 3. Comparison of result clarity after 24 hours; (A) Rapid and clear response in the semi-solid tube method with FKR and FKR-BCP media, (B) Weak halo in the standard plate method for the same strain. (Plate diameter: 90 mm, test tube diameter: 13 mm).

مقایسه رتبه‌بندی سویه‌ها بر اساس شاخص‌های دوبعدی (SI) و سه‌بعدی (SV)

مقایسه رتبه‌بندی سویه‌ها بر اساس شاخص دوبعدی SI (حاصل از روش پلیت) و شاخص سه‌بعدی SV (حاصل از روش لوله‌ای) نشان داد که تصویر ما از برترین سویه‌ها به شدت وابسته به نوع سیستم ارزیابی است. همان‌گونه که در (جدول ۵) برای ۱۰ سویه برتر مجموعه نمایش داده شده است، در حدود ۱۵ درصد موارد، رتبه‌بندی سویه‌ها بین دو روش به طور محسوس تغییر کرده است.

به عنوان مثال، برخی سویه‌ها با SI نسبتاً بالا در روش پلیت، در سیستم سه‌بعدی حجم انحلال پایینی داشتند و در رتبه‌های پایین‌تر قرار گرفتند؛ در مقابل، سویه‌ای که در روش پلیت در رتبه هفتم قرار داشت، با توجه به الگوی رشد نفوذی و کارآمد خود در ماتریکس نیمه‌جامد، حجم انحلال بسیار بالایی ثبت کرده و به رتبه دوم بر اساس SV صعود کرد. این تغییرات نشان می‌دهد که روش دوبعدی ممکن است پتانسیل واقعی بخشی از سویه‌ها را به‌ویژه آن‌هایی که در عمق محیط فعال‌تر هستند، دست‌کم بگیرد؛ در حالی‌که روش سه‌بعدی با ارائه شاخص حجمی، ابزار دقیق‌تر و واقع‌بینانه‌تری برای

کمی‌سازی حجمی و ارزیابی عمودی فعالیت انحلال

شاخص‌های نوین برای کمی‌سازی سه‌بعدی (SV و SD) نتایج نشان داد که سویه‌های برتر قادر به ایجاد عمق انحلال (SD) معنی‌دار تا بیش از ۴۰ میلی‌متر در طول دوره انکوباسیون بودند. بررسی دقیق‌تر داده‌ها حاکی از تنوع بالای سویه‌ها در میزان نفوذ عمقی است؛ به‌طوری‌که در برخی سویه‌های با کارایی پایین، عمق انحلال به کمتر از ۱۰ میلی‌متر محدود می‌شد، درحالی‌که سویه‌های بسیار فعالی مانند FKR-S94 و FKR-S2 توانستند تقریباً در تمام طول ستون محیط کشت نفوذ کرده و به‌ترتیب عمق انحلالی در حدود ۱۰۷ و ۹۸ میلی‌متر را ثبت کنند. این دامنه گسترده از تغییرات عمقی، مستقیماً در شاخص حجم انحلال (SV) نیز بازتاب یافت و مقادیر متنوعی از چند صد میلی‌متر مکعب تا بیش از ۱۰۰۰۰ میلی‌متر مکعب (برای سویه FKR-S94) را رقم زد. این تنوع نتایج نشان‌دهنده قدرت بالای روش سه‌بعدی در تفکیک و کمی‌سازی دقیق پتانسیل حل‌کنندگی باکتری‌هاست.

انتخاب کاندیداهای برتر جهت مراحل بعدی، از جمله آزمون‌های گلخانه‌ای، فراهم می‌آورد.

جدول ۵- مقایسه رتبه‌بندی ۱۰ سویه برتر بر اساس شاخص انحلال دوبعدی (SI) از روش پلِت و حجم انحلال سه‌بعدی (SV) در روش لوله‌ای نیمه‌جامد، در بین تمامی سویه‌های غربال‌شده.

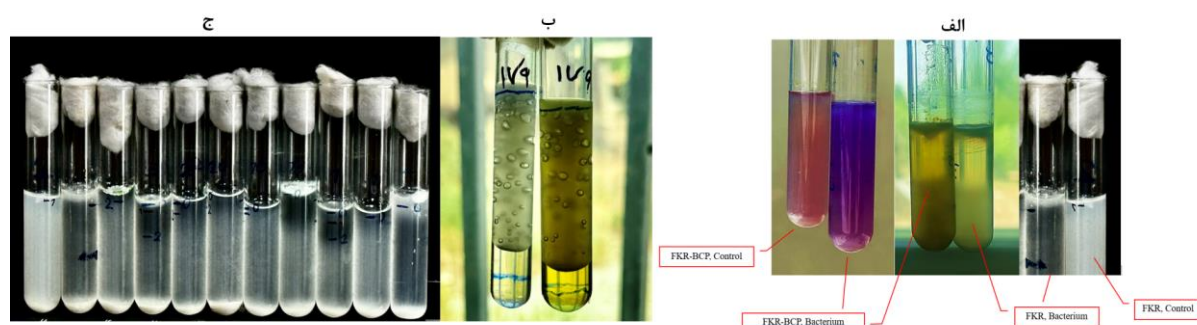
Table 5. Comparison of the ranking of the top 10 strains based on the two-dimensional solubilization index (SI) from the plate method and the three-dimensional solubilization volume (SV) in the semi-solid tube method, among all screened strains.

Rank based on SV / رتبه بر اساس	SV (mm ³)	Rank based on SI / رتبه بر اساس	SI	Top / کد سویه برتر / strain code
61	2031	1	3.50	FKR-S10
3	9361	2	2.84	FKR-S2
50	2384	3	2.66	FKR-S12
41	3797	4	2.50	FKR-S3
47	2914	5	2.50	FKR-S1
58	2120	6	2.50	FKR-S19
62	1943	7	2.50	FKR-S20
1	10244	8	2.47	FKR-S94
78	1236	9	2.45	FKR-S148
48	2650	10	2.43	FKR-S107

رشد مشاهده شد که بیانگر استفاده از مسیرهای متابولیکی بی‌هوازی یا تخمیری در عمق محیط است (Vessey, Blagodatskaya, 2015 & 2003; Kuzyakov). همچنین، حدود ۲ درصد از سویه‌ها توانایی مایع‌سازی ماتریکس نیمه جامد را بروز دادند. از سوی دیگر، ایجاد طبیعی گرادیان اکسیژن در ستون نیمه‌جامد منجر به شکل‌گیری سه الگوی رشد متمایز (سطحی، عمودی پیوسته و لایه‌ای) شد که نشان‌دهنده ترجیحات تنفسی متفاوت سویه‌ها در شرایط ریزوسفری است. تمامی این پدیده‌های متابولیکی و الگوهای رشد در (شکل ۴) خلاصه شده‌اند.

شبیه‌سازی شرایط ریزوسفر و کشف پدیده‌های متابولیکی جدید

یکی از مهم‌ترین یافته‌های سیستم سه‌بعدی لوله‌ای، آشکارسازی تنوع چشمگیر در فعالیت‌های متابولیکی و اکوفیزیولوژیک سویه‌ها بود. در این ارزیابی، ۶ سویه (حدود ۳,۸ درصد) با تغییر رنگ شناساگر BCP به بنفش تیره، سازوکار انحلال غیراسیدی (قلیایی‌کننده) را نشان دادند. علاوه بر این، در حدود ۷ درصد از سویه‌های فعال، تولید گاز به صورت حباب‌های ریز در امتداد مسیر



شکل ۴- پدیده‌های متابولیکی و الگوهای رشد در محیط سه‌بعدی نیمه‌جامد؛ الف) تنوع پاسخ pH شامل تولید اسید (ناحیه زرد) و سازوکار قلیایی‌کننده (هاله بنفش)، ب) فعالیت‌های متابولیکی ثانویه نظیر تولید گاز و مایع‌سازی ماتریکس، ج) الگوهای متنوع رشد و نفوذ در امتداد گرادیان اکسیژن.

Figure 4. Metabolic phenomena and growth patterns in the semi-solid three-dimensional medium; a) Diversity of pH response including acid production (yellow zone) and alkalinizing mechanism (purple halo), b) Secondary metabolic activities such as gas production and matrix liquefaction, c) Diverse growth and penetration patterns along the oxygen gradient.

بحث

برتری فرمولاسیون FKR در غربالگری PSB

نتایج این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون FKR عملکردی به مراتب کارآمدتر از محیط‌های استاندارد رایج (Pikovskaya, NBRIP, Sperber) در شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات دارد. افزایش چشمگیر درصد سویه‌های مثبت در FKR، همراه با کاهش قابل توجه منفی‌های کاذب، نشان می‌دهد که ترکیب تغذیه‌ای و فیزیوشیمیایی این محیط با نیازهای تغذیه‌ای و الگوی رشد باکتری‌های گرم‌مثبت ریزوسفری، به‌ویژه جنس *Bacillus*، سازگاری بیشتری دارد. در مطالعه پیشین ما نیز فرمولاسیون FKR توانست کارایی شناسایی PSB را به طور معنی‌داری نسبت به محیط‌های حداقلی متداول افزایش داده و طیفی از سویه‌های $\text{Acid}^+/\text{Halo}^-$ را آشکار کند که در محیط‌های کلاسیک به عنوان منفی کاذب گزارش می‌شوند (Reisi et al., 2025). داده‌های حاضر این یافته را تأیید کرده و نشان می‌دهند که بخش مهمی از ظرفیت واقعی سویه‌ها تنها زمانی بروز می‌کند که محیط کشت، محدودیت‌های تغذیه‌ای و تنشی غیرواقع‌بینانه‌ی محیط‌های حداقلی را بر آن‌ها تحمیل نکند. محیط‌های کلاسیک نظیر NBRIP فاقد منابع غنی نیتروژن آلی (پیتون) و فاکتورهای رشد هستند؛ کمبودی که به اثبات رسیده است باعث خاموشی مسیرهای متابولیک تولید اسیدهای آلی در باکتری‌های پرنیازتر نظیر *Bacillus* می‌شود (Sharma et al., 2023; Zhang et al., 2024). محیط FKR با جبران این محدودیت، به عنوان یک بستر محرک عمل می‌کند.

این نتیجه با گزارش‌های متعددی هم‌خوان است که نشان می‌دهند فرمولاسیون و شرایط کشت، به‌ویژه نوع منبع کربن و فسفر، حضور عناصر کم‌مصرف، pH اولیه و بافرها، نقش تعیین‌کننده‌ای در بیان پتانسیل حل‌کنندگی فسفات و تولید اسیدهای آلی دارند (Illmer & Schinner, 1995; Nautiyal, 1999; Chen et al., 2006). در واقع، آنچه در بسیاری از مطالعات به عنوان "فاقد توان حل‌کنندگی" گزارش می‌شود، در مواردی ممکن است

صرفاً بازتاب یک طراحی محیطی ناکافی باشد نه ضعف ذاتی سویه. محیط طبیعی خاک در مجاورت ریشه (ریزوسفر)، به دلیل حضور مداوم ترشحات ریشه‌ای، سرشار از قندها، اسیدهای آمینه و ویتامین‌هاست. غنای تغذیه‌ای اعمال شده در محیط FKR (نظیر حضور عصاره مخمر و پیتون) در واقع شبیه‌سازی همین ریزمحیط غنی است. در غیاب این پیش‌سازها در محیط‌های استاندارد، باکتری دچار سوءتغذیه شده و ژن‌های مسیر اسیدزایی آن خاموش می‌ماند که منجر به بروز "منفی کاذب" آزمایشگاهی می‌گردد. از این منظر، FKR را می‌توان نه تنها یک محیط شناسایی، بلکه یک پلتفرم بیان پتانسیل دانست که به سویه‌ها فرصت می‌دهد توان واقعی خود را در شرایطی نزدیک‌تر به وضعیت ریزوسفری بروز دهند. این مسئله در خاک‌های آهکی و قلیایی ایران که با بافر کربناتی شدید و دسترسی پایین فسفر همراه‌اند، اهمیت مضاعف پیدا می‌کند؛ زیرا در چنین خاک‌هایی، محیط‌های حداقلی کلاسیک حتی اگر از نظر شیمیایی پاسخ دهند، الزاماً رفتار واقعی سویه را در شرایط مزرعه بازتاب نمی‌دهند (Hinsinger, 2001; Alori et al., 2017).

تفکیک کیفی، وضوح بصری و کاهش منفی‌های کاذب

یکی از نقاط قوت کلیدی FKR در این پژوهش، توان تفکیک کیفی و وضوح بصری بالاتر نسبت به محیط‌های مقایسه‌ای بود. این محیط، علاوه بر افزایش تعداد سویه‌های مثبت، امکان طبقه‌بندی آن‌ها را در کلاس‌های کیفی مختلف (A-D) بر اساس شاخص انحلال دوبعدی (SI) فراهم کرد و تعداد سویه‌های بسیار قوی (کلاس A) را به طور معنی‌داری نسبت به محیط‌های استاندارد افزایش داد. به‌خصوص، شناسایی چندین سویه کلاس A در حالی که برخی محیط‌های مرجع هیچ سویه‌ای در این کلاس آشکار نکردند، نشان می‌دهد که حساسیت FKR نه صرفاً کمی، بلکه کیفی نیز بالاتر است. این موضوع از دیدگاه غربالگری صنعتی و توسعه کودهای

سکون بیشترین بیان را دارند، امکان رصد زود هنگام آن‌ها در روش سه‌بعدی می‌تواند تصویر پویاتری از پاسخ میکروبی ارائه دهد (Kim et al., 1997; Rodríguez & Fraga, 1999).

وضوح پاسخ و تفکیک متابولیک

استفاده از نشانگر pH (BCP) در محیط نیمه‌جامد، یک پاسخ رنگی دوتایی و بسیار واضح (زرد برای اسیدی شدن، بنفش برای قلیایی شدن) ایجاد کرد که نسبت به هاله‌های گاهی مبهم پلیت، از نظر تشخیصی مزیت کاملاً قابل ملاحظه‌ای دارد. این پاسخ نه تنها تمایز سویه‌های اسیدزا و غیر اسیدزا را ساده می‌کند، بلکه امکان شناسایی سریع سویه‌های دارای مکانیسم‌های غیر اسیدی (از جمله قلیایی‌کننده‌ها) را نیز فراهم می‌سازد؛ گروهی که در بسیاری از روش‌های سنتی به کلی نادیده گرفته می‌شوند (Sharma et al., 2013). علاوه بر این، مشاهده تولید گاز و مایع شدن محیط در بخشی از سویه‌ها، نشان‌دهنده قابلیت این سامانه برای ثبت هم‌زمان چندین فعالیت متابولیک مرتبط با چرخه کربن و فسفر است، که می‌تواند در طراحی کنسرسیوم‌های چندکارکردی مورد استفاده قرار گیرد.

کمی‌سازی حجمی و بازآرایی رتبه‌بندی سویه‌ها

یکی از نوآوری‌های کلیدی این پژوهش، معرفی شاخص‌های عمق انحلال (SD) و حجم انحلال (SV) به عنوان مکمل SI دوبعدی بود. در حالی که SI تنها بُعد سطحی و شعاعی هاله یا ناحیه تغییر رنگ را لحاظ می‌کند، SD و SV امکان ارزیابی توزیع عمقی و سه‌بعدی متابولیت‌ها را فراهم آوردند. نتایج نشان داد که رتبه‌بندی ۱۰ سویه برتر بر اساس SV به طور معنی‌داری با رتبه‌بندی مبتنی بر SI تفاوت داشت و برخی سویه‌ها که در سامانه دوبعدی در رده‌های میانی قرار می‌گرفتند، در ارزیابی حجمی به رتبه‌های بالاتر صعود کردند. این پدیده نشان

زیستی اهمیت دارد، زیرا تمرکز غالباً بر انتخاب «برترین» سویه‌ها است و از دست رفتن حتی درصد کمی از سویه‌های کلاس A می‌تواند پیامدهای عملی قابل توجهی داشته باشد.

از سوی دیگر، وضوح هاله‌های انحلال در FKR از نظر شفافیت، کنتراست و مرزبندی - دقت و تکرارپذیری اندازه‌گیری SI را بهبود بخشید و وابستگی به قضاوت شخصی مشاهده‌گر را کاهش داد. این مسئله در مطالعه حاضر با کاهش در صد منفی‌های کاذب نسبت به محیط‌های استاندارد همراه بود و نشان داد که بخشی از منفی‌های کاذب گزارش‌شده در ادبیات می‌تواند ناشی از هاله‌های مبهم و تفسیرپذیر در پلیت‌های کلاسیک باشد (Rao et al., 1999; Collavino et al., 2010). در عین حال، مشاهده سویه‌های Acid⁺/Halo⁻ در FKR، که در محیط‌های دیگر فاقد هاله قابل قبول بودند، تأکیدی است بر این‌که اتکای صرف به حضور هاله شفاف سطحی می‌تواند منجر به حذف سیستماتیک گروهی از سویه‌های بالقوه ارزشمند شود.

مزایای روش سه‌بعدی نیمه‌جامد (روش لوله‌ای)

تسریع فرآیند غربالگری

پلتفرم سه‌بعدی مبتنی بر محیط نیمه‌جامد لوله‌ای، نسبت به روش کلاسیک پلیت (محیط جامد)، توانست زمان موردنیاز برای شناسایی سویه‌های فعال را به طور چشمگیری کاهش دهد. بیش از سه‌چهارم سویه‌های مثبت در این روش در کمتر از ۲۴ ساعت شناسایی شدند، در حالی که در روش پلیت، تشخیص قابل اعتماد به چند روز انکوباسیون نیاز داشت. این تسریع، هم برای مطالعه فرآیندهای متابولیکی و هم برای برنامه‌های غربالگری انبوه^{۱۷} اهمیت دارد و می‌تواند هزینه و زمان توسعه فرمولاسیون‌های جدید کود زیستی را به طور محسوسی کاهش دهد. از آنجا که بسیاری از ژن‌های مرتبط با حل‌کنندگی فسفات در فاز رشد فعال و اوایل ورود به فاز

^{۱۷} High throughput

می‌دهد که الگوی فضایی انتشار اسیدها و سایر عوامل حل‌کننده، لزوماً با اندازه هاله سطحی همبستگی خطی ندارد و سویه‌هایی وجود دارند که به‌جای گسترش شعاعی وسیع، نفوذ عمقی و کارآمدتری دارند.

از منظر اکوفیزیولوژی یک، این تفاوت می‌تواند بازتاب استراتژی‌های مختلف سازگاری با شرایط ریزوسفری باشد؛ در محیط واقعی خاک، ریشه‌ها و لنزهای ذرات فسفات غالباً در عمق‌های متفاوت و منافذ محدود قرار دارند، و نفوذ عمقی مؤثرتر از گسترش سطحی صرف می‌تواند مزیت عملکردی ایجاد کند (Hinsinger, 2001; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). بنابراین، ترکیب SI با SV و SD می‌تواند ابزار دقیق‌تری برای انتخاب سویه‌هایی فراهم کند که در شرایط مزرعه، خصوصاً در خاک‌های آهکی و لایه‌دار، کارایی بالاتری دارند، حتی اگر در آزمون‌های صرفاً دوبعدی چندان برجسته به نظر نرسند. اگرچه سنجش کمی فسفر محلول در محیط مایع همواره به عنوان استاندارد نهایی برای ارزیابی سویه‌های منتخب ضروری است، اما اجرای آن برای جوامع آماری بزرگ (نظیر غربالگری اولیه صدها سویه) بسیار زمان‌بر و پرهزینه است. سامانه سه‌بعدی با ارائه شاخص SV، به عنوان یک حلقه واسطه و فیلتر اولیه قدرتمند عمل می‌کند تا پژوهشگران تنها برترین کاندیدها را برای آزمون‌های کمی محیط مایع و ارزیابی‌های گلخانه‌ای انتخاب نمایند.

کشف سازوکارهای نوین و الگوهای رشد اکوفیزیولوژیک

یکی از یافته‌های برجسته این مطالعه، شناسایی گروه کوچکی از سویه‌ها با واکنش قلیایی‌کننده بود که در محیط FKR-BCP با ایجاد نواحی بنفش مشخص شدند. مکانیسم‌های احتمالی در این گروه می‌تواند شامل تولید فسفات‌تازهای قلیایی، ترشح لیگاندها و کلات‌کننده‌های آلی یا معدنی، و نیز مبادله یونی همراه با آزادسازی آلومینیوم/آهن از فاز جامد باشد (Jones, 1998; Richardson et al., 2009). مشاهده تولید گاز و مایع شدن

محیط در در صدی از سویه‌ها حاکی از آن است که بخش قابل توجهی از PSB‌های شناسایی‌شده در این مطالعه، علاوه بر حل‌کنندگی فسفات، از نظر فعالیت‌های متابولیکی دیگر نیز پویا هستند. تولید گاز می‌تواند نشانه برخی مسیرهای تخمیری، دنیتریفیکاسیون جزئی، یا تجزیه ترکیبات آلی پیچیده باشد، در حالی که مایع‌شدن محیط نشانه تولید آنزیم‌ها و آگزولاکتیات‌ها یا پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی ویژه است که ساختار ژل مانند محیط را تغییر می‌دهد. بستر نیمه جامد لوله‌ای با ایجاد گرادیان اکسیژن، pH و مواد غذایی در طول عمق ستون، شرایطی نزدیک‌تر به ریزوسفر واقعی را شبیه‌سازی می‌کند. در این محیط، الگوهای متنوعی از رشد (از جمله الگوهای سطحی، عمودی، لایه‌ای و تجمع در عمق‌های خاص، مشاهده شد که می‌توانند بازتاب استراتژی‌های متفاوت سازگاری میکروارگانیسم‌ها با میکروزیستگاه‌های ریزوسفری باشند.

پیامدها، محدودیت‌ها و چشم‌اندازهای آینده

از منظر کاربردی، ترکیب محیط FKR و پلتفرم سه‌بعدی معرفی‌شده در این مطالعه، یک سامانه غربالگری قدرتمند برای شناسایی و انتخاب باکتری‌های فسفات حل‌کننده در خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌آورد. شناسایی سویه‌های بسیار قوی (کلاس A)، سویه‌های با الگوی نفوذ عمقی بالا (SV برتر)، و نیز سویه‌های قلیایی‌کننده با مکانیسم‌های غیراسیدی، مجموعه‌ای از کاندیدهای ارزشمند را برای توسعه فرمولاسیون‌های کود زیستی فسفات، به‌ویژه برای خاک‌های ایران، در اختیار قرار می‌دهد. افزون بر این، قابلیت سامانه در آشکارسازی فعالیت‌های متابولیکی ثانویه و الگوهای رشد متنوع، امکان طراحی کنسرسیوم‌های چندکارکردی را فراهم می‌کند که می‌توانند هم‌زمان بر چرخه‌های فسفر، کربن و ساختار خاک تأثیر بگذارند. با این حال، چند محدودیت مهم باید مدنظر قرار گیرد. نخست آن‌که این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی و در

اندازه‌گیری کمی غلظت فسفر آزاد شده در محیط مایع ۱۹ برای تأیید نهایی قدرت انحلال این سویه‌ها، یک ضرورت روش‌شناسی و غیرقابل انکار به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که ترکیب محیط جدید FKR با یک روش سه‌بعدی نیمه‌جامد می‌تواند کاستی‌های روش‌های سنتی غربالگری باکتری‌های فسفات‌حل‌کن را تا حد زیادی برطرف کند. محیط FKR، در مقایسه با محیط‌های رایج، تعداد بیشتری از سویه‌های باسیلوس حل‌کننده فسفات را شناسایی کرد، منفی کاذب را کاهش داد و تفکیک دقیق‌تری از کلاس‌های عملکردی سویه‌ها ارائه داد. رویکرد سه‌بعدی لوله‌ای با امکان اندازه‌گیری شاخص‌های حجمی (SD و SV)، نسبت به هاله‌های دوبعدی محیط‌های جامد، تصویر واقع‌بینانه‌تری از کارایی انحلال فسفات فراهم ساخت و نشان داد که رتبه‌بندی سویه‌ها در ارزیابی دوبعدی می‌تواند گمراه‌کننده باشد. مشاهده سویه‌های قلیایی‌کننده و الگوهای متنوع رشد، وجود مکانیسم‌های انحلال غیراسیدی و تفاوت‌های اکوفیزیولوژی یک مهم میان سویه‌ها را آشکار کرد؛ ویژگی‌هایی که در آزمون‌های پلیت معمولاً نادیده می‌مانند. به طور کلی، روش سه‌بعدی مبتنی بر FKR با افزایش سرعت، دقت و عمق ارزیابی، بستر مناسبی برای انتخاب هدفمند سویه‌های کارآمد و پایدار جهت تولید کودهای زیستی به‌ویژه برای خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌کند. با این حال، تأیید میدانی عملکرد سویه‌های منتخب و تکمیل داده‌ها با تحلیل‌های مولکولی و ابزارهای پیشرفته (امثال تصویربرداری و میکروفلوئیدیک) برای بهره‌برداری کامل از ظرفیت این روش ضروری است.

شرایط کنترل شده انجام شد و انتقال نتایج به سطح مزرعه ضروری است. کارایی واقعی سویه‌ها و کنسر سیوم‌های پیشنهادی در خاک طبیعی، تحت تأثیر عوامل متعددی چون رطوبت، دما، ترکیب جامعه میکروبی بومی، ریشه و ترشحات گیاه قرار می‌گیرد و بدون آزمایش‌های مزرعه‌ای چندمکانی و چندفصلی، نمی‌توان در مورد پایداری و اثرگذاری آن‌ها قضاوت قطعی کرد (Vessey, 2003; Alori et al., 2017). دوم آن‌که این مطالعه عمدتاً بر شاخص‌های فنوتیپی (SI, SD, SV و پاسخ رنگی) متکی بود و اطلاعات مولکولی در مورد ژن‌ها و مسیرهای دخیل در حل‌کنندگی فسفات در دسترس نیست؛ بنابراین، ادغام این پلتفرم با روش‌های ژنومیک، ترنسکریپتومیک و متابولومیک می‌تواند در آینده، تصویر بسیار دقیق‌تری از مکانیسم‌های دخیل و پتانسیل سازگاری بلندمدت این سویه‌ها ارائه دهد.

سوم آن‌که، اگرچه استفاده از شناساگر رنگی (BCP) در محیط نیمه‌جامد سرعت غربالگری و تشخیص تولید اسید را به شدت افزایش می‌دهد، اما باید توجه داشت که تری‌کلسیم فسفات (TCP) دارای خاصیت بافری بالایی است. در بسیاری از موارد، پروتون‌های تولیدشده توسط باکتری مستقیماً صرف شکستن پیوندهای TCP و رها سازی فسفات می‌شوند و در نتیجه، افت pH در محیط به حدی نمی‌رسد که تغییر رنگ ملموسی ایجاد نماید. افزون بر این، برخی باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های کاملاً غیراسیدی (نظیر ترشح کلات‌کننده‌های قوی مانند سیدروفورها) اقدام به کیلیت نمودن کاتیون کلسیم و انحلال فسفات می‌کنند که فاقد تغییرات اسیدی است. بنابراین، اتکای انحصاری به تغییر رنگ می‌تواند منجر به از دست رفتن بخشی از جدایه‌های توانمند (منفی کاذب رنگی) شود. به همین دلیل، همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، سامانه FKR-BCP صرفاً یک فیلتر اولیه با توان عملیاتی بالا ۱۸ برای انتخاب کاندیداهای مستعد است و

^{۱۹} Broth assay

^{۱۸} High-throughput screening

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی و تجهیزاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات خاک و آب کشور (SWRI) انجام شده است. نویسندگان از همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاهی این مجموعه‌ها کمال تشکر را دارند.

بیانیه دسترسی به داده‌ها

داده‌های خام و مجموعه داده‌های پشتیبان نتایج این پژوهش، در صورت درخواست معقول و منطقی، توسط نویسندگان مسئول در دسترس سایر پژوهشگران قرار خواهد گرفت.

ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش

تعارض منافع

نویسندگان صراحتاً اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار این مقاله، هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، شخصی یا حرفه‌ای که بتواند بر روند پژوهش، تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج تأثیرگذار باشد، وجود ندارد.

بیانیه مشارکت نویسندگان

ش. رئیسی: انجام آزمایش‌ها، گردآوری و تحلیل داده‌ها، نگارش پیش‌نویس اصلی. ح. ع. علی‌خانی: مفهوم‌سازی، نظارت، اعتبارسنجی. ع. فلاح نصرت‌آباد: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، تأمین منابع، نظارت، بازبینی و ویرایش نهایی. ب. خوشرو: مفهوم‌سازی، نظارت، روش‌شناسی، اعتبارسنجی، تحلیل آماری، بازبینی و ویرایش نهایی. ا. ع. پوربائنی: نظارت، اعتبارسنجی. تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه نموده و با چاپ آن موافقت کرده‌اند.

References

1. Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D.A., Panagos, P. and Borrelli, P., 2020. Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nature Communications*, 11, pp.4546. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7>
2. Alori, E.T., Glick, B.R. and Babalola, O.O., 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, pp.971. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
3. Atlas, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed. CRC Press.
4. Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wiermans, P.C.A. and Pieterse, C.M.J., 2020. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 11, pp.581. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>
5. Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y. and Dhiba, D., 2018. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp.1606. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>
6. Bashan, Y., Kamnev, A.A. and de-Bashan, L.E., 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 49, pp.465-479. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>
7. Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H., 2017. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, pp.130-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>
8. Berg, H.C., Brown, D.A. and Turner, L., 2002. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239, pp.500-504. DOI: <https://doi.org/10.1038/239500a0>
9. Castanheira, N.L., Dourado, M.N., Pais, I. and Moreira, H., 2021. Microbial-based bioproducts as a sustainable approach to improve phosphorus availability in agricultural soils. *Journal of Environmental Management*, 287, pp.112322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112322>
10. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W.A. and Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, pp.33-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
11. Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. and Aguilar, O.M., 2010. Comparison of in vitro phosphate-solubilizing activity and phosphorus uptake by soybean plants inoculated with efficient and inefficient phosphate-solubilizing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 46, pp.427-438. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
12. Crank, J., 1975. *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed. Oxford University Press.
13. Edi-Premono, M., Moawad, A.M. and Vleck, P.L.G., 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, pp.13-23.
14. Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, pp.963401. DOI: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
15. Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2), pp.96-102. DOI: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000187>
16. Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237, pp.173-195. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
17. Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D. and Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321, pp.117-152. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9797-1>
18. Hinsinger, P., Herrmann, L., Lesueur, D., Robin, A., Trap, J., Waithaisong, K. and Plassard, C., 2011. Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. In: Bünemann, E.K., Oberson, A. and Frossard, E. (eds.) *Phosphorus in Action*. Springer, pp.177-199.
19. Illmer, P. and Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 27, pp.257-263. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00190-C](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C)

20. Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil*, 205, pp.25-44. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004356007312>
21. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Mitra, D., Chaithra, M., et al., 2023. Rock phosphate solubilizing potential of soil microorganisms: Advances in sustainable crop production. *Bacteria*, 2(2), pp.98-115. DOI: <https://doi.org/10.3390/bacteria2020008>
22. Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E. M., Uniyal, N., Mahakur, B., et al., 2020. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: An economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), pp.3062-3092. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1799004>
23. Khosravi, H., Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., and Mitra, D., 2024. Exploring the landscape of biofertilizers containing plant growth-promoting rhizobacteria in Iran: Progress and research prospects. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, pp.100268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100268>
24. Kim, K.Y., Jordan, D. and McDonald, G.A., 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24, pp.347-352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s003740050256>
25. Kuzyakov, Y. and Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology & Biochemistry*, 83, pp.184-199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.014>
26. Malusá, E. and Vassilev, N., 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp.6599-6607. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
27. Malusá, E., Sas-Paszt, L. and Ciesielska, J., 2016. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2016, pp.1-12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/4910412>
28. Mendes, G.O., Freitas, A.L.M., Pereira, O.L., da Silva, I.R. and Vassilev, N.B., 2021. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied Soil Ecology*, 158, pp.103809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103809>
29. Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J.M., 2014. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp.634-663. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
30. Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Mezeli, M.M. and Haygarth, P.M., 2018. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus forms in soil as a fertilizer resource. *Frontiers in Earth Science*, 6, pp.140. DOI: <https://doi.org/10.3389/feart.2018.00140>
31. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. and Renella, G., 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bünemann, E.K., Oberson, A. and Frossard, E. (eds.) *Phosphorus in Action*. Springer, pp.215-243.
32. Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, pp.265-270. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
33. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S., 2017. Phosphate solubilizing bacteria: Mechanisms and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17, pp.1128-1147. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-951620170004000XX>
34. Pereira, S.I.A. and Castro, P.M.L., 2014. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73, pp.526-535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.060>
35. Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, pp.362-370.
36. Rao, N.S.S., 1999. *Soil Microorganisms and Plant Growth*. 2nd ed. Oxford & IBH Publishing.
37. Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D. and Shankhdhar, S.C., 2021. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. In: Rakshit, A., Singh, H.B. and

- Sen, A. (eds.) *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*. Springer, pp.137-162.
38. Reisi, S., Alikhani, H., Fallah Nosratabad, A., Pourbabae, A.A. and Khoshru, B., 2025. Development and evaluation of a new culture medium for effective screening of phosphate-solubilizing bacteria: A case study on Gram-positive bacteria isolated from soil. In: *19th Iranian Soil Science Congress*, 16-18 September 2025, Karaj, Iran. (In Persian).
39. Richardson, A.E., Lynch, J.P., Ryan, P.R., Delhaize, E., Smith, F.A., Smith, S.E., Harvey, P.R., Ryan, M.H., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R.A. and Simpson, R.J., 2009. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, 321, pp.305-339. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
40. Rodríguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, pp.319-339. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
41. Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., De Pascale, S., Bonini, P. and Colla, G., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, pp.91-108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>
42. Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E.U.B., Sadhana, B. and Vani, S.S., 2017. Phosphorus solubilizing microbes: Sustainability boon for agricultural production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), pp.1304-1315. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.610.XXX>
43. Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. and Jackson, M.A., 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94, pp.1267-1271. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267>
44. 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, pp.587. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
45. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds.), 2002. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. ASM Press.
46. Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9, pp.782-787.
47. Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. and Aronsson, A.-C., 2017. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, pp.49. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
48. van der Bom, F., Nunes, I., Raymond, N.S., Hansen, V., Bonnichsen, L., Magid, J. and Nybroe, O., 2018. Long-term fertilisation form, level and duration affect the diversity, structure and functioning of soil microbial communities in the field. *Soil Biology & Biochemistry*, 122, pp.91-103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.001>
49. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, pp.571-586. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
50. Yadav, B.K. and Verma, A., 2018. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. In: Rakshit, A., Singh, H.B. and Sen, A. (eds.) *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*. Springer, pp.199-212.
51. Zhang, X., Li, Y., Liu, X., Wang, C. and Chen, Q., 2024. Screening and characterization of phosphate-solubilizing *Bacillus* strains for improving phosphorus availability in calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 190, pp.104918. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104918>