

## مدل‌سازی انحلال فسفر توسط *Pseudomonas fluorescens* با استفاده از روش سطح پاسخ

ساناز اشرفی سعیدلو<sup>۱</sup>، میرحسن رسولی صدقیانی<sup>۲</sup>، فرخ اسدزاده<sup>۳</sup>، محسن برین<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۹

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۳- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

\*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.barin@urmia.ac.ir

### چکیده

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد. استفاده از پتانسیل ریزجانداران حل‌کننده فسفات‌های نامحلول یکی از راهکارهای مهم در تأمین نیاز فسفوری گیاهان است. غربالگری توانایی انحلال ریزجانداران در شرایط آزمایشگاهی به منظور استفاده در کودهای زیستی، تحت تأثیر ترکیب عناصر غذایی محیط می‌باشد. هدف از این مطالعه مدل‌سازی تأثیر منابع و سطوح مختلف کربن و نیتروژن و میزان تری‌کلسیم فسفات بر انحلال فسفر با استفاده از طرح پلاکت - برمن و روش سطح پاسخ بر مبنای طرح مرکب مرکزی بود. ابتدا به منظور غربالگری و شناسایی منابع تأثیرگذار کربن و نیتروژن بر انحلال فسفر توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* تعداد ۱۲ آزمایش بر اساس طرح پلاکت - برمن اجرا شد. نتایج نشان داد که از بین منابع نیتروژن، عصاره مخمر تأثیر بیشتری در انحلال فسفر داشت. براساس نتایج این بخش، اثر سطوح متفاوت ساکارز، عصاره مخمر و همچنین تری‌کلسیم فسفات بر انحلال فسفر با استفاده از طرح مرکب مدل‌سازی شد. نتایج تجزیه واریانس بیانگر کارآمدی بالای ( $RMSE = 0.0372 g L^{-1}$ ) و ( $R^2 = 0.896$ ) مدل طرح مرکب مرکزی در برآورد انحلال فسفر مشاهده‌ای بود. عصاره مخمر و تری‌کلسیم فسفات به ترتیب مؤثرترین عوامل تأثیرگذار بر انحلال فسفر بودند. به طوری که افزایش مقدار عصاره مخمر در محدوده صفر تا ۴ گرم بر لیتر و تری‌کلسیم فسفات در محدوده صفر تا ۲۰ گرم بر لیتر سبب افزایش غلظت فسفر محلول شد. براساس مدل طرح مرکب مرکزی غلظت‌های ۱۸/۵۸، ۴ و ۱۷/۹۷ گرم بر لیتر از ساکارز، عصاره مخمر و تری‌کلسیم فسفات به عنوان شرایط بهینه برای دستیابی به بیشینه غلظت فسفر محلول در محیط کشت پیش‌بینی شد.

واژه‌های کلیدی: باکتری حل‌کننده فسفر، پلاکت - برمن، طرح مرکب مرکزی، محیط کشت، مدل‌سازی

## Modeling Phosphate Solubilization by *Pseudomonas fluorescens* Using Response Surface Methodology

S Ashrafi-Saeidlou<sup>1</sup>, MH Rasouli-sadaghiani<sup>2</sup>, F Asadzadeh<sup>3</sup>, M Barin<sup>3\*</sup>

Received: 28 January 2016 Accepted: 19 September 2016

1- Ph.D. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Assoc. Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3- Assist. Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

\* Corresponding Author, E-mail: m.barin@urmia.ac.ir

### Abstract

Phosphorus is one of the most important limiting elements for plant growth. Using phosphate solubilizing microorganisms (PSM) is one of the main strategies to meet plant P demand. In Vitro screening of phosphate solubilization potential in order to use as biofertilizers, is influenced by nutrient composition of media. The purpose of this study was modeling the effects of different carbon and nitrogen sources and tricalcium phosphate on phosphorous solubilization using Plackett-Burman design and response surface methodology with a central composite design. At the first step, 12 experiments based on Plackett-Burman design were carried out to screen and identify the effective carbon and nitrogen sources in phosphorous dissolution by *Pseudomonas fluorescens*. Results indicated that yeast extract was more effective source of nitrogen in comparison with other nitrogen sources. According to the results of the first step, response surface methodology with central composite design was employed to evaluate and to model the effects of sucrose, yeast extract and tricalcium phosphate concentrations on phosphate dissolution. The analysis of variance (ANOVA) depicted the high performance of the central composite predictive model of phosphorus dissolution ( $R^2=0.896$  and  $RMSE=0.0372 \text{ g L}^{-1}$ ). The yeast extract and tricalcium phosphate were the most significant parameters for phosphate solubilization. Increasing of the yeast extract concentration at the range of 0-4  $\text{g L}^{-1}$  and the tricalcium phosphate at the range of 0-20  $\text{g L}^{-1}$  significantly increased the soluble phosphate concentration. According to central composite design, maximum phosphate dissolution was obtained at the yeast extract, sucrose and tricalcium phosphate concentrations of 4, 18.58, 17.97  $\text{g L}^{-1}$  respectively.

**Keywords:** Central composite design, Media, Modeling, Phosphate solubilizing bacteria, Plackett-Burman

### مقدمه

است (رودریگز و فراگا ۱۹۹۹). در این میان ریزجانداران حل‌کننده فسفات<sup>۱</sup> نقش بسیار مهمی در حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر در خاک ایفا می‌کنند به-نحویکه شکل‌های معدنی و غیرقابل استفاده فسفر خاک، از طریق فرآیندهایی نظیر اسیدسازی، کیلیت نمودن و واکنش‌های تبدیلی توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات به فسفر محلول تبدیل می‌شوند. ریزجانداران حل‌کننده فسفات موجود در خاک علاوه بر اینکه می‌توانند مصرف کودهای شیمیایی حاوی فسفات را کاهش دهند، باعث افزایش جذب فسفر در گیاهان نیز می‌شوند (سیلزپور و همکاران ۲۰۰۲). توان سویه‌های مختلف

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف می‌باشد که کمبود آن رشد گیاه را به شدت محدود می‌کند. با این حال حلالیت ترکیبات فسفر در خاک بسیار کم بوده و بخش قابل توجهی از فسفر خاک به شکل فسفات‌های نامحلول می‌باشد (عبداله ۱۹۹۴). از سوی دیگر با مصرف کودهای شیمیایی حاوی فسفر نیز بخش قابل ملاحظه‌ای از فسفر به شکل ترکیب‌های نامحلول تبدیل شده و در خاک تثبیت می‌گردد. بنابراین خاک‌های کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از ذخایر فسفر نامحلول بوده و آزادسازی فسفر از فرم‌های نامحلول و تثبیت-شده موجود در خاک به منظور افزایش قابلیت فراهمی فسفر برای گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار

1- Phosphate solubilizing microorganisms

باکتری ارائه نمی‌دهد (پدماواتی ۲۰۱۵). در این ارتباط روش‌های آماری نظیر طرح پلاکت - برمن و روش سطح پاسخ، می‌توانند ابزارهای مفیدی جهت تشخیص شرایط بهینه‌ی کشت باکتری‌ها به منظور نیل به بیشینه کارایی این ریزجانداران در انجام فعالیت‌های زیستی نظیر انحلال فسفر محسوب شوند (سووتا و همکاران ۲۰۱۴، راجندران و همکاران ۲۰۰۷).

روش‌های مذکور تکنیک‌هایی ترکیبی از روش‌های آماری و ریاضی به منظور طراحی آزمایش‌ها<sup>۲</sup> با هدف ایجاد مدل ریاضی پیش‌بینی‌کننده هستند که توانایی ارزیابی میزان تأثیر تعدادی عامل به‌عنوان متغیرهای مستقل را بر روی یک پاسخ مطلوب به‌عنوان متغیر وابسته دارند (مایرس و مانت‌گومری ۲۰۰۲). در حقیقت در این روش‌ها از اطلاعات کمی حاصل از تعداد مناسبی از آزمایش‌ها به‌طور همزمان استفاده شده و با تلفیق آن‌ها از طریق تحلیل معادلات چندپارامتری، متغیر پاسخ پیش‌بینی شده و یا بهینه‌سازی می‌گردد. روش سطح پاسخ با استفاده از طرح‌های مختلف مانند باکس-بنکن<sup>۳</sup> و یا طرح مرکب مرکزی<sup>۴</sup> انجام‌پذیر است. در سال‌های اخیر این روش‌ها به‌عنوان ابزارهایی توانمند در پژوهش‌های مربوط به مدل‌سازی و بهینه‌سازی فرآیند در علوم مهندسی و بیولوژی مورد استفاد قرار گرفته‌اند (موسوی و همکاران ۲۰۱۳، آقایی‌نژاد-میبدی و همکاران ۲۰۱۵).

به‌دلیل نقش قابل‌توجهی که اجزاء محیط کشت در انحلال فسفات‌های نامحلول دارند، مطالعات گوناگونی جهت شناسایی مؤثرترین بستر کشت در ارزیابی توانایی انحلال فسفر صورت گرفته است (زیا و همکاران ۲۰۰۹، سنگتا و ناتیل ۲۰۰۱، سانینگهام و کوآیک ۱۹۹۲). زیا و همکاران (۲۰۰۹) به‌منظور ارزیابی توانایی انحلال فسفات‌ها توسط *Rhizobium leguminosarum* از ۳ محیط کشت مختلف شامل پیکوسکایا<sup>۵</sup>، عصاره مخمر مانیتول<sup>۶</sup> و محیط رشد

باکتری‌های خاک برای انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول در پژوهش‌های مختلف مورد اشاره قرار گرفته است (گلداستین ۱۹۸۶). سودوموناس‌ها از انواع مهم باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشند (ایلمر و همکاران ۱۹۹۵). گونه‌های باکتریایی مختلفی از جمله *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *B. B. circulans*, *Bacillus firmus*, *P. aureofaciens* و *Megatherium* از توانایی انحلال فسفر برخوردارند. کاسی (۱۹۸۳) گزارش کردند که حلالیت میکروبی فسفات‌های نامحلول در محیط کشت مایع به‌دلیل ترشح اسیدهای آلی می‌باشد. وجود اسیدهای آلی از قبیل اگزالیک، سیتریک، لاکتیک و گلوکنیک با روش‌های مختلف کروماتوگرافی از قبیل TLC و HPLC در محیط کشت مایع ریزجانداران حل‌کننده فسفات، توسط پژوهشگران متعددی تعیین و گزارش شده است (وایت لاو و همکاران ۱۹۹۹، بانیک و دی ۱۹۸۲).

عوامل مختلفی از قبیل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، شرایط تهویه و دوره انکوباسیون در کارایی حل‌کننده‌های فسفات نقش دارند (پرادان و ساکالا ۲۰۰۵، وایت لاو ۲۰۰۷). باکتری‌های جنس سودوموناس از نظر منبع انرژی و کربن کموارگانوتروف هستند و قادرند از ۱۵۰ ترکیب آلی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند، لذا رشد و فعالیت متابولیکی این باکتری‌ها و در نتیجه قابلیت انحلال فسفر توسط آن‌ها توسط اجزاء بستر رشد نظیر منابع کربن و نیتروژن، نمک‌های معدنی متنوع و عناصر کم‌مصرف تحت تأثیر قرار می‌گیرد (تودار ۲۰۰۴). بنابراین بهینه‌سازی بستر یکی از معیارهای مهم برای انحلال فسفر می‌باشد. ترکیب سطوح مختلف عوامل مؤثر بر رشد باکتری‌ها از روش‌های معمول برای تشخیص شرایط مناسب انحلال فسفر توسط آن‌ها است. در روش‌های معمول برای بررسی اثر عوامل مختلف بر شرایط رشد و قابلیت انحلال فسفر توسط باکتری‌ها یک عامل متغیر بوده و عوامل دیگر ثابت نگه‌داشته می‌شوند که این امر علاوه بر زمانبر بودن، پرهزینه نیز بوده و از سوی دیگر تضمینی برای تشخیص شرایط کاملاً بهینه برای فعالیت متابولیکی

2- Design of experiments (DOE)

3- Box-Behnken

4- Central composite design (CCD)

5 - Pikovskaya' s medium

## گونه باکتری حل‌کننده فسفات

تعداد ۵۰ نمونه خاک ریزوسفری در مرحله‌ی پنجه‌دهی گندم از مزارع گندم استان آذربایجان غربی (شهرستان ارومیه) تهیه شد. پس از جداسازی سویه-های برتر باکتری‌های حل‌کننده فسفات (پیکوسکایا ۱۹۴۸)، باکتری *Pseudomonas fluorescens* که دارای بالاترین میزان شاخص حلالیت و مقدار فسفر آزاد شده نسبت به سویه‌های دیگر بود، به‌عنوان سویه مورد مطالعه انتخاب شد.

## تهیه مایه تلقیح و اندازه‌گیری فسفر

باکتری *Sordomonas فلورسنس* مورد استفاده، پس از جداسازی در محیط کشت نوترینت آگار<sup>۹</sup> کشت شد (آرولانتام و همکاران ۲۰۱۲). پس از رشد باکتری، به منظور آماده‌سازی مایه تلقیح، ارلن حاوی ۵۰ میلی-لیتر محیط کشت نوترینت برات<sup>۱۰</sup> تهیه و باکتری در این محیط تلقیح شد. پس از ۲۴ ساعت شیک نمودن، ۱ میلی‌لیتر از مایه تلقیح (با جمعیت برابر  $10^8 \times 6/4$  سلول باکتری در یک میلی‌لیتر محلول در جذب نور با طول موج ۶۰۰ نانومتر) به هر یک از ارلن‌های حاوی محیط کشت پیکوسکایا (مرحله اول و دوم آزمون‌های ذیل) افزوده شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۹ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. محتویات ارلن‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شده و در عصاره-های به‌دست آمده مقدار فسفر محلول با روش مولیبدات-وانادات و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (کاتنی ۱۹۸۰).

مدل‌سازی انحلال فسفات بر مبنای تغییر شرایط محیط کشت

به‌منظور مدل‌سازی و تعیین شرایط بهینه انحلال فسفر توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و اجرا شد. در مرحله

فسفات مؤسسه تحقیقات گیاه‌شناسی ملی<sup>۶</sup> استفاده نمودند. نتایج حاکی از آن بود که سویه‌های منتخب بیشترین رهاسازی فسفر را در پیکوسکایا داشتند. کمترین کاهش pH و پایین‌ترین غلظت فسفر محلول نیز مربوط به عصاره مخمر مانیتول بود. با وجود اینکه ترکیب شیمیایی محیط کشت پیکوسکایا و NBRIP یکسان بود، NBRIP نتایجی مشابه با عصاره مخمر مانیتول را نشان داد. دلیل آن تفاوت این دو محیط کشت از نظر مقدار عناصر غذایی و وجود منابع آهن و منگنز در پیکوسکایا است چرا که نوع و غلظت اسیدهای آلی تولید شده توسط ریزجانداران، از ترکیب و غلظت اجزاء موجود در بستر کشت تأثیر می‌پذیرد (پرادهان و ساکلا ۲۰۰۵، وایت‌لاو ۱۹۹۹). پرادهان و ساکلا (۲۰۰۵) نیز به-منظور ارزیابی انحلال فسفات‌های معدنی توسط قارچ-های جداسازی شده از خاک‌های زراعی، از محیط‌های کشت پیکوسکایا، AYG<sup>۸</sup> و محیط رشد فسفات مؤسسه تحقیقات گیاه‌شناسی ملی استفاده کردند. در این مطالعه بیشترین غلظت فسفر مربوط به محیط کشت AYG بود. بر این اساس ارزیابی توانایی انحلال ریزجانداران با هرکدام از بسترهای کشت نتایج متفاوتی ایجاد می‌نماید (پرادهان و ساکلا ۲۰۰۵). هدف از این پژوهش مدل-سازی اثر متغیرهایی مانند منابع کربن و نیتروژن بر میزان انحلال تری‌کلسیم فسفات توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* بود. بر این اساس ابتدا اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر قابلیت انحلال تری-کلسیم فسفات توسط این باکتری با استفاده از طرح پلاکت - برمن تعیین شده و پس از غربال‌گری و شناسایی منابع تأثیرگذار کربن و نیتروژن، اثر سطوح مختلف این منابع بر انحلال‌پذیری تری‌کلسیم فسفات با استفاده از طرح مرکب مرکزی مدل‌سازی شده است.

## مواد و روش‌ها

6 - Yeast mannitol extract

7- National botanical research institute's phosphate (NBRIP)

8 -Ammonium sulfate yeast extract glucose (AYG)

9- Nutrient agar

10- Nutrient broth

طرح پلاکت - برمن تعداد ۱۲ آزمایش مختلف با ترکیب سطوح مختلف ۶ متغیر مورد بررسی (سه منبع کربن و سه منبع نیتروژن) انجام شد.

براساس تحلیل نتایج مربوط به انحلال فسفات از مرحله اول منابع کربن و نیتروژن مهم و تأثیرگذار شناسایی شده و در مرحله دوم با استفاده از طرح مرکب مرکزی و با ترکیب سطوح مختلف این منابع و همچنین تری کلسیم فسفات، قابلیت انحلال فسفات مدل-ساز شده و شرایط بهینه محیط کشت برای انحلال تعیین شد. تجزیه تحلیل‌های مربوط به مدل‌سازی طرح پلاکت - برمن و طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم-افزار MINITAB 14 صورت گرفت.

اول طرح پلاکت - برمن بر پایه مدل خطی درجه اول به‌منظور ارزیابی و غربالگری منابع کربن و نیتروژن مختلف بر قابلیت انحلال فسفر مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌های مربوط به این مرحله مطابق با جدول ۱ و با ترکیب مقادیر متفاوتی از سطح منابع کربن و نیتروژن مختلف صورت گرفت. در این بخش سه منبع مختلف کربن و سه منبع مختلف نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند که منابع کربن شامل گلوکز، ساکارز و فروکتوز در دو سطح +۱ (۲۰ گرم بر لیتر) و -۱ (۱۰ گرم بر لیتر) بوده و منابع نیتروژن نیز شامل عصاره مخمر، سولفات آمونیوم و اوره در دو سطح +۱ (۱۰ گرم بر لیتر) و -۱ (۰/۵ گرم بر لیتر) بود. بر مبنای

جدول ۱- دامنه‌ی متغیرهای مربوط به مدل پلاکت - برمن و مقدار فسفات محلول به‌عنوان متغیر پاسخ.

شماره آزمایش	منبع کربن			منبع نیتروژن		
	گلوکز	ساکارز	فروکتوز	عصاره مخمر	سولفات آمونیوم	اوره
۱	+۱	+۱	+۱	-۱	+۱	+۱
۲	+۱	-۱	+۱	+۱	-۱	+۱
۳	-۱	-۱	+۱	+۱	+۱	-۱
۴	-۱	-۱	-۱	+۱	+۱	+۱
۵	-۱	+۱	+۱	-۱	+۱	-۱
۶	-۱	+۱	+۱	+۱	-۱	+۱
۷	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	-۱
۸	+۱	-۱	-۱	-۱	+۱	+۱
۹	-۱	-۱	-۱	-۱	-۱	-۱
۱۰	+۱	-۱	+۱	-۱	-۱	-۱
۱۱	-۱	+۱	-۱	-۱	-۱	+۱
۱۲	+۱	+۱	+۱	+۱	-۱	-۱

+۱ و -۱ به ترتیب نشان‌دهنده ۲۰ و ۱۰ گرم بر لیتر منابع کربن و ۱۰ و ۰/۵ گرم بر لیتر منابع نیتروژن می‌باشند.

## نتایج و بحث

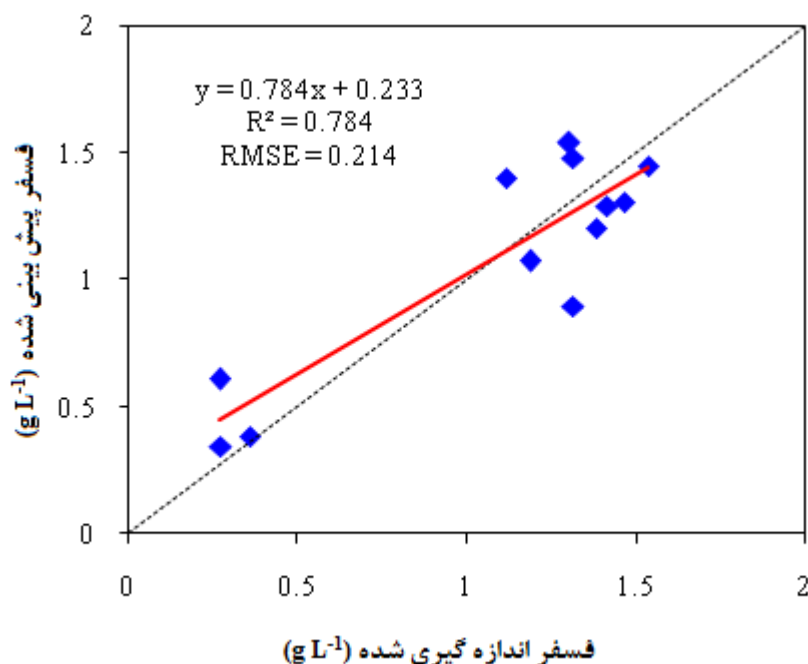
### طرح پلاکت - برمن

اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر قابلیت انحلال فسفر توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* با استفاده از طرح پلاکت - برمن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به قابلیت مدل حاصل از طرح پلاکت - برمن برای پیش‌بینی انحلال فسفات در شکل ۱ و همچنین نتایج مربوط به تجزیه آماری این طرح در

جدول ۲ ارائه شده است. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، مدل مربوط به طرح پلاکت - برمن توانسته با دقت قابل قبولی ( $RMSE = 0.214 \text{ g L}^{-1}$ ) و  $R^2 = 0.784$  مقدار انحلال فسفر در آزمایش‌های ۱۲ گانه مربوط به مرحله اول را پیش‌بینی نماید. براساس نتایج ارائه شده در جدول ۲ و مقدار آماره  $P$  به دست آمده برای منابع کربن و نیتروژن می‌توان گفت که استفاده از منابع مختلف کربن تفاوت معنی‌داری در

نتایج این مرحله از آزمایش‌ها به روشنی نشان‌دهنده قابلیت مطلوب مدل مربوط به طرح پلاکت - برمن بوده و بیان‌کننده این واقعیت است که منابع مختلف کربن شامل ساکارز، گلوکز و فروکتوز می‌توانند به‌عنوان جایگزین یکدیگر در محیط کشت استفاده شوند در حالی‌که در بین منابع مختلف نیتروژن، عصاره مخمر نسبت به سایر منابع اولویت بیشتری دارد. بر این اساس برای بهینه‌سازی سطوح منابع کربن و نیتروژن محیط کشت در آزمایش‌های مربوط به طرح مرکب مرکزی (مرحله دوم) ساکاروز و عصاره مخمر به ترتیب به عنوان منابع کربن و نیتروژن انتخاب شدند.

مقدار انحلال فسفر را ایجاد نکرده است (طبق جدول ۲). به‌عبارت دیگر تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف کربن وجود نداشته و هر کدام از آن‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزین یکدیگر در محیط کشت استفاده شوند. اما در مورد منابع مختلف نیتروژن مشاهده می‌شود که مقدار آماره  $P$  برای عصاره مخمر ( $0/04$ ) معنی‌دار بوده و در عین حال کمتر از مقدار آماره  $P$  برای اوره ( $0/51$ ) و سولفات آمونیوم ( $0/398$ ) است (طبق جدول ۲). این امر نشان می‌دهد که در بین منابع مختلف نیتروژن عصاره مخمر نقش بیشتری در فعالیت متابولیکی باکتری و در نتیجه افزایش قابلیت انحلال فسفر توسط آن را دارد.



شکل ۱- ارتباط بین مقادیر فسفات پیش‌بینی شده و برآورد شده با استفاده از مدل پلاکت - برمن.

جدول ۲- ضرایب رگرسیونی\* مربوط به داده‌های آزمایشی مدل پلاکت - برمن.

تیمار	پارامتر	ضریب	آماره $T$	آماره $P$
منبع کربن	ثابت معادله	$1/079$	$11/25$	$0/000$
	گلوکز	$0/097$	$1/01$	$0/357$
	ساکارز	$0/119$	$1/25$	$0/267$
منبع نیتروژن	فروکتوز	$-0/076$	$-0/79$	$0/464$
	عصاره مخمر	$0/263$	$2/75$	$0/040$
	سولفات آمونیوم	$0/088$	$0/92$	$0/398$
	اوره	$0/245$	$2/56$	$0/051$

$$R^2 = 78/40 \cdot *$$

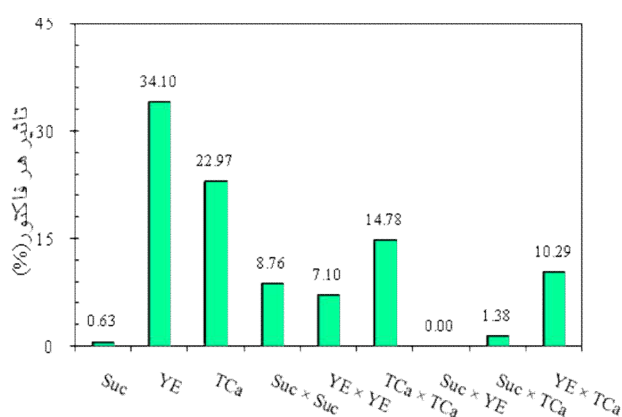
### مدلسازی طرح مرکب مرکزی

طرح مرکب مرکزی به منظور مدلسازی و پیش-بینی اثرات سطوح مختلف ساکاروز، عصاره مخمر و همچنین تری کلسیم فسفات موجود در محیط کشت، به-عنوان متغیرهای مستقل، بر قابلیت انحلال فسفر به-عنوان متغیر وابسته مورد استفاده قرار گرفت. در این روش دامنه‌های متفاوتی از این سه متغیر شامل ساکاروز (۰-۴۰ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۰-۲۰ گرم بر لیتر) و تری کلسیم فسفات (۰-۲۰ گرم بر لیتر) در نظر گرفته شده و به صورت کدبندی شده در محدوده +۱ تا -۱ به نرم افزار MINTAB معرفی گردید. در جدول ۳ متغیرهای مورد استفاده و دامنه تغییرات آنها به طور خلاصه ارائه شده است. نرم افزار براساس دامنه

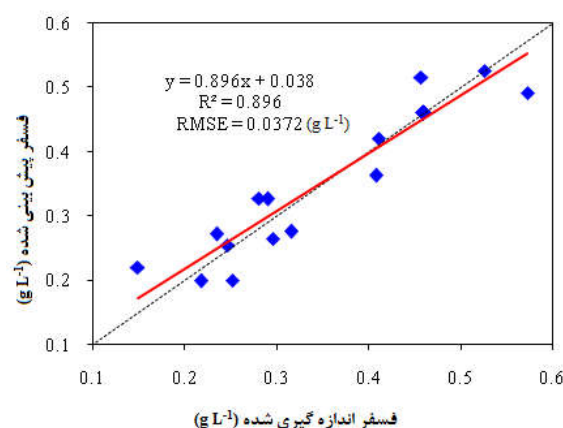
معرفی شده و همچنین تعداد متغیرهای مستقل، مجموع ۲۰ آزمایش و با ترکیب سطوح متفاوتی از مقادیر کدبندی شده این متغیرها طراحی می‌نماید. آزمایش‌های طراحی شده توسط نرم افزار براساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. در ادامه این مرحله، محیط کشت باکتری براساس سطوح مختلف ساکاروز، عصاره مخمر و همچنین تری-کلسیم فسفات آماده شده و پس از کشت باکتری مقدار فسفر انحلال یافته در هر یک از آنها اندازه‌گیری شد که نتایج مربوط به انحلال فسفر در هر آزمایش نیز در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۳- دامنه مقادیر آزمایشی متغیرهای مورد استفاده در مدلسازی.

متغیرهای مستقل	فاکتور	دامنه و مقادیر		
	$X_i$	+۱	۰	-۱
ساکاروز ( $g L^{-1}$ )	$X_1$	۴۰	۲۰	۰
عصاره مخمر ( $g L^{-1}$ )	$X_2$	۴	۲	۰
تری کلسیم فسفات ( $g L^{-1}$ )	$X_3$	۲۰	۱۰	۰



شکل ۳- نتایج تحلیل پارتو برای مقایسه اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی بر غلظت فسفات.



شکل ۲- مقایسه غلظت فسفات محلول مشاهده‌ای و پیش-بینی شده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی.

جدول ۴- ماتریس مقادیر متغیرهای کد شده در مدل سازی روش طرح مرکب مرکزی.

شماره آزمایش	مقادیر کد شده متغیرها (Coded variables)			فسفات محلول (g L <sup>-1</sup> )
	ساکاروز (Suc)	عصاره مخمر (YE)	تری کلسیم فسفات (TCa)	
۱	-۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۵۲۶
۲	۰-/۵۹۵	۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۲۳۵
۳	۰/۰۰۰	-۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۴	۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۲۴۷
۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۷	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۷۳
۸	۰/۰۰۰	-۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۱۴۹
۹	-۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۲۹۰
۱۰	-۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۳۱۶
۱۱	۰/۰۰۰	-۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۱۲	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۰۸
۱۳	۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۲۸۱
۱۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۱۵	۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۲۹۶
۱۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۶۰
۱۷	-۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	-۰/۵۹۵	۰/۲۵۲
۱۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۴۱۱
۱۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۱/۰۰۰	۰/۲۱۸
۲۰	۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۵۹۵	۰/۴۵۷

جدول ۵- ضرایب تابع چند جمله طرح مرکب مرکزی برای پیش بینی غلظت فسفات محلول.

بخش مدل	پارامترهای مدل	ضریب	آماره T	آماره P
ثابت مدل	Constant	۰/۴۶۰۰	۲۱/۴۴۱	۰/۰۰۰
خطی	Suc	۰/۰۱۱۰	۰/۷۷۰	۰/۵۴۹
	YE	۰/۰۸۰۷	۵/۶۶۷	۰/۰۰۰
	TCa	۰/۰۶۶۳	۴/۵۶۱	۰/۰۰۱
درجه‌ی دو	Suc × Suc	-۰/۰۴۰۹	-۲/۹۵۰	۰/۰۱۵
	YE × YE	-۰/۰۳۶۸	-۲/۶۵۶	۰/۰۲۴
	TCa × TCa	-۰/۰۵۳۲	-۳/۸۳۳	۰/۰۰۳
برهمکنش	Suc × YE	۰/۰۰۰۴	۰/۰۱۹	۰/۹۵۸
	Suc × TCa	-۰/۰۱۶۲	-۰/۸۷۲	۰/۴۰۴
	YE × TCa	۰/۰۴۴۴	۲/۳۸۳	۰/۰۲۸

Suc, YE, TCa به ترتیب نشان دهنده ساکاروز، عصاره مخمر و تری کلسیم فسفات می باشند.





داده شده است. از بین متغیرهای مستقل بررسی شده به ترتیب عصاره مخمر، تری کلسیم فسفات، توان دوم تری کلسیم فسفات و نیز برهمکنش بین عصاره مخمر و تری کلسیم فسفات بیشترین تأثیر را بر میزان فسفر محلول مشاهده‌ای دارند. به طوری که درصد اثر این ۴ متغیر به ترتیب برابر با ۳۴/۱۰، ۲۲/۹۷، ۱۴/۷۸ و ۱۰/۲۹ بوده و مجموع درصد اثرات این ۴ متغیر نیز برابر با ۸۲/۱۴ درصد است.

به منظور نشان دادن اثر ترکیبی متغیرها شامل ساکاروز، عصاره مخمر و تری کلسیم فسفات، نمودار سه بعدی تغییرات غلظت فسفر محلول برای این متغیرها به صورت دو به دو و بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی ترسیم شده و در شکل ۴ ارائه گردیده است. با افزایش میزان عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژنی و تری کلسیم فسفات مقدار فسفر محلول به شدت افزایش یافت. به طوری که مقدار فسفر در حضور ۲۰ گرم بر لیتر تری کلسیم فسفات و ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر در مقایسه با شرایط عدم حضور این متغیرها ۸۳/۳ درصد افزایش داشت (شکل ۴ الف).

در غلظت‌های بالای عصاره مخمر میزان فسفر با کاهش مقدار ساکاروز افزایش یافت. بیشینه میزان فسفر در سطح مرکزی ساکاروز (۲۰ گرم بر لیتر) مشاهده شد (شکل ۴ ب).

با توجه به اینکه کربن یکی از منابع غذایی اولیه برای رشد و فعالیت متابولیکی ریزجانداران تلقیح شده می‌باشد و وجود آن برای تولید اسیدهای آلی ضروری است لذا تعیین منبع کربنی مناسب برای باکتری‌های حل‌کننده فسفر حائز اهمیت می‌باشد (شارمیلال و همکاران ۱۹۸۹، پراساد ۲۰۱۴، گانگولیا و همکاران ۲۰۱۵) ساگرواوشی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای که از منابع کربن متنوعی برای ارزیابی انحلال فسفر استفاده نمودند، دریافتند که بیشترین انحلال فسفر در حضور گلوکز اتفاق می‌افتد، در نبود گلوکز نیز عصاره مخمر منجر به رشد ریزجانداران تلقیح یافته می‌شود. در مطالعه دیگری که توسط شهاب و احمد (۲۰۰۸) صورت گرفت تمام سویه‌های باکتریایی مورد بررسی

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۵ برای معنی‌داری هر یک از ضرایب تابع چند جمله‌ای طرح مرکب مرکزی و با در نظر گرفتن ضرایب دارای اثر معنی‌دار تابع پیش‌بینی‌کننده مقدار فسفر محلول به صورت معادله ۱ قابل ارائه خواهد بود. در این معادله  $X_1$ ،  $X_2$  و  $X_3$  به ترتیب مربوط به مقادیر کد شده ساکاروز، عصاره مخمر و تری کلسیم فسفات می‌باشند.

$$\text{Phosphate (gl}^{-1}\text{)} = 0.46 + 0.0807X_2 + 0.0663X_3 - 0.0409X_1^2 - 0.0368X_2^2 - 0.0532X_3^2 + 0.04443X_2X_3 \quad [1]$$

$$R^2 = 89.6\% \quad R_{adj}^2 = 80.3\%$$

معادله ۱ که بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی خلاصه شده است به روشنی بیانگر اثر مثبت و افزایش‌دهنده عصاره مخمر ( $X_2$ ) و تری کلسیم فسفات ( $X_3$ ) بر افزایش فسفر محلول است. در شکل ۲ نیز مقدار فسفر مشاهده شده در آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی در مقابل میزان فسفر محاسبه شده از روی مدل طرح مرکب مرکزی معادله ۱ ترسیم شده است. این شکل به روشنی نشان می‌دهد که مدل طرح مرکب مرکزی به طور مطلوبی مقدار فسفر محلول مشاهده شده را برآورد نموده است. بر اساس مقدار ضریب تبیین مدل طرح مرکب مرکزی، می‌توان گفت که ۸۹/۶ درصد از تغییرات فسفر محلول توسط این مدل قابل تبیین است. ریشه میانگین مربعات خطا برای مدل مذکور نیز برابر با ۰/۰۳۷ گرم بر لیتر است.

به منظور تفسیر بهتر نتایج مدل و رتبه‌بندی اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی در معادله ۱، درصد اثر هر یک از این پارامترها با استفاده از تحلیل پارتو<sup>۱۱</sup> و با کاربرد معادله ۲ محاسبه گردید (امان‌پور و همکاران ۲۰۱۳).

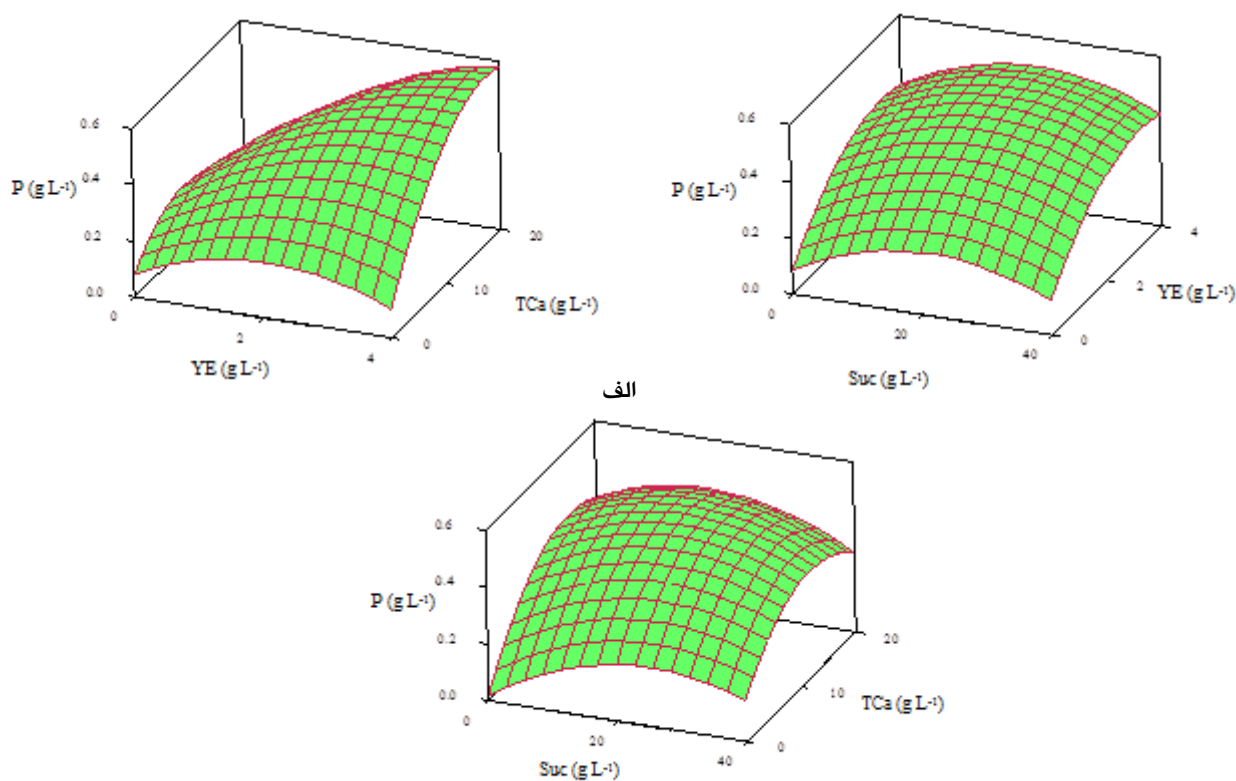
$$P_i = \left[ \frac{\beta_i^2}{\sum \beta_i^2} \right] \times 100 \quad i \neq 0 \quad [2]$$

درصد اثر هر یک از پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی به همراه سطح معنی‌داری آن در شکل ۳ نشان

کاهش تولید اسیدهای آلی توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* باشد.

شکل ۴ الف نشان می‌دهد که مقادیر بیشینه فسفر محلول پیش‌بینی شده منطبق با بیشینه مقادیر غلظت در نظر گرفته شده برای عصاره مخمر و همچنین تری‌کلسیم فسفات است. به عبارت دیگر می‌توان پیش‌بینی نمود که در صورت افزایش غلظت این دو متغیر به خارج از محدوده مورد آزمایش، غلظت فسفر محلول می‌توانست همچنان افزایش یابد. با این حال با توجه به اینکه اعتبار مدل طراحی شده تنها در دامنه مورد استفاده برای متغیرهای ورودی قابل اطمینان است، بهینه‌سازی مقدار غلظت فسفر محلول نیز در این دامنه صورت گرفت. که نتایج آن در شکل ۵ ارائه شده است.

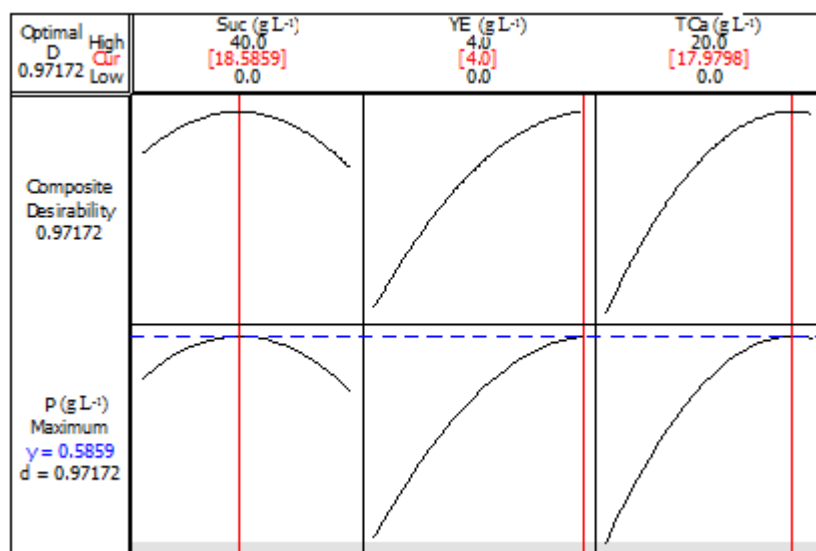
در حضور ساکاروز به عنوان منبع کربن از توانایی رشد و انحلال برخوردار بودند. اگرچه افزایش غلظت قند (منبع کربن) می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیک و کربوکسیلیک باعث افزایش تولید اسید شود اما این امر در مورد تمام ریزجانداران صادق نمی‌باشد به عنوان مثال در حضور مقادیر محدود منبع کربن تولید اسید آلی توسط *Penicillium billai* افزایش می‌یابد و این امر افزایش انحلال فسفر را در پی دارد (سانینگهام و کوآیک ۱۹۹۲). در توضیح علت این امر باید بیان نمود که وجود کمتر از حد مطلوب منابع کربن برای تولید متابولیت‌های ثانویه ضروری است (ایلمر و شینیر ۱۹۹۲). بر این اساس ممکن است کاهش میزان فسفر محلول در غلظت‌های بالای ساکاروز ناشی از



شکل ۴- نمایش سه‌بعدی تغییرات مقدار فسفات در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی.

تاکور و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ای که در ارتباط با تأثیر بهینه‌سازی شرایط کشت در افزایش انحلال فسفر توسط سویه‌های مختلف *سودوموناس فلورسنت* انجام گرفت، دریافتند که مقدار بهینه تری‌کلسیم فسفات برای انحلال فسفر ۵ گرم بر لیتر می‌باشد. در ارتباط با منبع نیتروژنی نیز آزمایشات نشان دادند که تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تنها در حضور نمک‌های آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژنی قادر به انحلال فسفر هستند (ایلمر و شینیر ۱۹۹۲، فاسیم و همکاران ۲۰۰۲). با این حال عصاره مخمر که مخلوطی شامل اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین‌ها و سرشار از ویتامین B و نمک‌های معدنی مفید است در نبود سایر منابع نیتروژنی به‌عنوان منبع نیتروژن توسط باکتری‌ها مصرف شده و منجر به انحلال فسفر می‌شود (شارمیلال و همکاران ۱۹۸۹).

براساس پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال فسفر مشاهده می‌شود که غلظت‌های ۱۸/۵۸ گرم بر لیتر ساکاروز، ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۷/۹۷ گرم بر لیتر تری‌کلسیم فسفات منجر به ایجاد بیشینه غلظت فسفر محلول معادل با ۰/۵۸ گرم بر لیتر می‌شود (شکل ۵). این درحالی است که در محیط پیکوسکایا به‌طور معمول از ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم بر لیتر تری‌کلسیم فسفات استفاده می‌شود (پیکوسکایا ۱۹۴۸). در مطالعه‌ای که به‌منظور تعیین مقادیر بهینه اجزاء محیط کشت جهت ارزیابی انحلال فسفر صورت گرفت، از بین منابع مختلف فسفر شامل فسفات آمونیوم، تری-کلسیم فسفات، فسفات روی و سنگ فسفات، تری‌کلسیم فسفات به‌عنوان بهترین منبع فسفات در محیط کشت مایع پیکوسکایا تعیین شد چرا که این ترکیب از حلالیت بالاتری برخوردار است (نگوین و همکاران ۱۹۹۲).



شکل ۵- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل برای کسب بیشینه غلظت فسفات محلول.

در رابطه با مقایسه‌ی منابع مختلف نیتروژن و کربن با استفاده از طرح پلاکت - برمن نشان داد که منابع کربن تفاوت چندانی از نظر تأثیرگذاری بر انحلال فسفر از تری‌کلسیم فسفات ندارند در حالی که از بین منابع نیتروژن، عصاره مخمر در مقایسه با اوره و سولفات

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش شرایط محیط کشت باکتری *سودوموناس فلورسنت* از نظر منبع کربن و همچنین منبع نیتروژن، برای نیل به بیشینه انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اولیه

بین متغیرهای ورودی، غلظت عصاره مخمر و همچنین غلظت تری‌کلسیم فسفات موجود در محیط نقش بیشتری در تعیین میزان انحلال فسفر دارند. نتایج مربوط به بهینه‌سازی متغیرهای ورودی مدل برای دستیابی به بیشینه غلظت فسفر محلول نشان داده که بیشینه مقدار غلظت پیش‌بینی شده برای دامنه‌ی متغیرهای مورد استفاده برابر با ۰/۵۸ گرم بر لیتر است که از ترکیب محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱۸/۵۸ گرم بر لیتر ساکاروز، ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۷/۹۷ گرم بر لیتر تری‌کلسیم فسفات قابل دستیابی است.

آمونیم نقش بیشتری در قابلیت انحلال فسفر دارد. بر این اساس در مرحله‌ی دوم بر مبنای طرح مرکب مرکزی دامنه‌های متفاوتی از ساکاروز، عصاره مخمر و همچنین تری‌کلسیم فسفات با یکدیگر ترکیب شده و قابلیت انحلال فسفر براساس این متغیرها مدل‌سازی شد. نتایج نشان داد که مدل‌سازی اثر توأم متغیرهای ساکاروز، عصاره مخمر و تری‌کلسیم فسفات براساس تعدادی آزمایش محدود با استفاده از طرح مرکب مرکزی موفقیت‌آمیز بوده و مدل توسعه داده شده قابلیت مطلوبی در پیش‌بینی غلظت فسفر محلول دارد. از

#### منابع مورد استفاده

- Abd-Alla MH, 1994. Phosphate and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium Leguminosarum* biovar viceae. Lett Appl Microbiol 18: 294-296.
- Aghaeinejad-Meybodi A, Ebadi A, Shafiei S, Khataee and Rostampour M, 2015. Degradation of antidepressant drug fluoxetine in aqueous media by ozone/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system: process optimization using central composite design. Environ Technol 36(12):1477-1488.
- Amanpour J, Salari D, Niaei A, Mousavi SM and Panahi PN, 2013. Optimization of Cu/activated carbon catalyst in low temperature selective catalytic reduction of NO process using response surface methodology. J Environ Sci Health., Part A 48(8): 879-886.
- Arulanantham R, Pathmanathan S, Ravimannan N and Niranjana K, 2012. Alternative culture media for bacterial growth using different formulation of protein sources. J Nat Prod Plant Resour 2(6): 697-700.
- Banik S and Dey BK, 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant Soil 69: 353-364.
- Cotteni A, 1980. Methods of plant analysis. Pp. 64-100. In: Robert Lee Westerman. Soil and Plant Testing, FAO Soil Bulletin.
- Cunningham JE and Kuyack C, 1992. Production of citric acid and oxalic acid and solubilization calcium phosphate by penicillium billai. Appl Environ Microbiol 58: 1451-1458.
- Fasim F, Ahmed N, Parson R and Gadd GM, 2002. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. FEMS Microbiol Lett 213: 1-6.
- Goldstein AH, 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am J Altern Agri 1: 51-57.
- Gangoliya SS, Kishor G and Singh ND, 2015. Phytase production through response surface methodology and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* NF191. Indian J Exp Biol 53: 350-355.
- Illmer P and Schinner F, 1992. Solubilization of hardly-soluble AlPO<sub>4</sub> with P-solubilizing microorganisms. Soil Bio and Biochem 24: 389-395.
- Illmer P, Barbato A and Schinner F, 1995. Solubilization of hardly soluble AlPO<sub>4</sub> with P Solubilizing Microorganism. Soil Biol Biochem 27: 265-270.
- Isaie M and Padmavathi T, 2015. Statistical optimization of cellulase and xylanase enzyme production by *Penicillium crustosum* using sugar beet peel substrate by response surface methodology. Res J Pharm BioChem Sci 6: 1144-1151.
- Kucey RMN, 1983. Phosphate – solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Can J Soil Sci 63: 671- 678.
- Mousavi SM, Niaei A, Salari D, Nakhostin-Panahi P and Samandari M, 2013. Modelling and optimization of Mn/activate carbon nanocatalysts for NO reduction: comparison of RSM and ANN techniques. Environ Technol 34(11): 1377-84.
- Myers RH and Montgomery DC, 2002. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments, (2nd ed.), John Wiley and Sons, UK.

- Nguyen C, Yan W, Le Tacon F and Lapyire F, 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotiv and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus laccaria bicolor (Maire) P D Orton. Plant Soil 143:193-199.
- Padmavathi T, 2015. Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. Soil Sci Plant Nutr 15 (3): 781-793.
- Plackett RL and Burman JP, 1946. The Design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33:305-325.
- Pikovskaya RI, 1948. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiol 17: 362-370.
- Pradhan Nand Sukla L.B, 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. Afr J Biotechnol 5: 850-854.
- Prasad MP, 2014. Optimization of fermentation conditions of phosphate solubilizing bacteria- a potential bio fertilizer. MRJMBS 2(2): 031-035.
- Rajendran A, Meikandhan T and Viruthagiri T, 2007. Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Indian J Biotechnol 6: 469- 478.
- Rodriguez H, and Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol Adv 17: 319-339.
- Sagervanshi A, Kumari P, Nagee A and Kumar A, 2012. Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from Anand agriculture soil. Int J pharm Life sci 2: 2250-0480.
- Sangeeta M, and Nautiyal CS, 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Curr. Microbiol 43:51-56.
- Seilsepour M, Baniani E and Kianirad M, 2002. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) in reducing the rate of phosphate fertilizers application to cotton crop. Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
- Shahab S and Ahmed N, 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. Afr J Biotechnol 7 (10): 1543-1549.
- Sharmila M, Ramanand K and Sethunathan N, 1989. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. Can J Microbiol 35: 1105-1110.
- Sheydaei M, Aber S and Khataee AR, 2014. Degradation of amoxicillin in aqueous solution using nanolepidocrocite chips/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: optimization and kinetics studies. Ind Eng Chem Res 20:1772-1778.
- Swetha S, Varma A and Padmavathi T, 2014. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, a-amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett-Burman experimental design. Biotech 4: 439-445.
- Thakur D, Kaur M and Shyam V, 2014. Optimization of best cultural conditions for high production of phosphate solubilizing activity by *Fluorescent Pseudomonas* isolated from normal and replant sites of apple and pear. Bioscan 9: 143-150.
- Todar K, 2004. Todars Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin Madison. Department of Bacteriology, Wisconsin, USA.
- Whitelaw MA, Harden TJ and Helyar KR, 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biol Biochem 31: 655- 665.
- Whitelaw MA, 2007. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Adv Agronomy 69: 99-151.
- Xia J, Knight D and Leggett M, 2009. Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphate solubilizing ability. Can J Microbiol 55: 910-915.