نوزدهمین کنگره علوم خاک ایران

(مدیریت جامع‌نگر و هوشمند خاک و آب)

۲۵ تا ۲۷ شهریور ۱۴۰۴، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(Holistic and Smart soil and water management) 19th Iranian Soil Science Congress
16-18 September, 2025, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran

توسعه و ارزیابی محیط کشت جدید برای غربالگری مؤثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات: مطالعه موردی بر روی باکتری‌های گرم مثبت جداشده از خاک

شکیبا رئیسی[1*]، حسینعلی علیخانی[1]، علیرضا فلاح نصرت آباد[2]، احمد علی پوربابائی[1]، بهمن خوشرو[2]

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

۲- موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول: shakibaa.reisii@gmail.com

چکیده

غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)، به‌ویژه سویه‌های گرم مثبت با تمرکز بر جنس *Bacillus*، به دلیل نرخ بالای نتایج منفی کاذب در محیط‌های کشت استاندارد، چالشی اساسی در توسعه کودهای زیستی است. این پژوهش با هدف توسعه و اعتبارسنجی یک محیط کشت نوین (FKR) برای غلبه بر این محدودیت‌ها بر روی ۱۴۲ سویه باکتریایی انجام شد. نتایج نشان داد که محیط FKR به طور میانگین ۵۲٪ از سویه‌ها را به عنوان حل‌کننده فسفات شناسایی کرد، در حالی که این نرخ برای محیط‌های استاندارد NBRIP، Pikovskaya و Sperber تنها ۱۹٪ بود (کارایی ۲/۷ برابر بیشتر). این برتری در شناسایی سویه‌های بسیار قوی نیز مشهود بود؛ محیط FKR توانست ۹ سویه در کلاس A (با شاخص انحلال ≥ ۲,۵) شناسایی کند، در حالی که مجموع سه محیط استاندارد تنها موفق به شناسایی ۲ سویه در این کلاس شدند. علاوه بر این، استفاده از شناساگر pH در محیط FKR-BCP نشان داد که بخش قابل توجهی از سویه‌ها با وجود تولید اسید، در محیط‌های استاندارد هاله انحلال شفافی ایجاد نمی‌کنند. این یافته‌ها ثابت می‌کند که محیط FKR ابزاری با حساسیت و دقت بالاتر برای تفکیک کیفی و انتخاب سویه‌های برتر، به‌ویژه از جنس *Bacillus*، است.

کلمات کلیدی: انحلال فسفات، *Bacillus*، فرمولاسیون محیط کشت، غربالگری میکروبی، نشانگر pH.

۱. مقدمه

فسفر (P) به عنوان یکی از عناصر مغذی اصلی، نقشی حیاتی و غیرقابل جایگزینی در فرآیندهای کلیدی گیاه مانند انتقال انرژی، فتوسنتز و سنتز اسیدهای نوکلئیک ایفا می‌کند. با این حال، بخش قابل توجهی از فسفر کل در اکثر خاک‌های کشاورزی جهان، به فرم‌های نامحلول معدنی (مانند فسفات‌های کلسیم در خاک‌های آهکی) و یا ترکیبات آلی پیچیده تثبیت شده و برای جذب توسط گیاهان غیرقابل دسترس است (Alewell et al., 2020). این پدیده، که منجر به کمبود فسفر در بسیاری از اراضی کشاورزی می شود، استفاده گسترده از کودهای شیمیایی فسفاته را ضروری ساخته است. مصرف بی‌رویه این کودها، علاوه بر هزینه‌های

اقتصادی، با چالش‌های زیست‌محیطی مهمی از جمله آلودگی منابع آب (اوتروفیکاسیون) و نگرانی در مورد پایداری منابع محدود سنگ فسفات همراه است (Le Moal et al., 2019).

در راستای نیل به کشاورزی پایدار، باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) به عنوان اجزای کلیدی کودهای زیستی، راهکاری مؤثر برای افزایش فراهمی فسفر ارائه می‌دهند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز، نقش حیاتی در تبدیل این فرم‌های نامحلول به فسفات قابل جذب ایفا می‌کنند (Rawat et al., 2021). بنابراین، جداسازی و شناسایی سویه‌های PSB با کارایی بالا، گامی اساسی در توسعه کودهای زیستی مؤثر است.

محیط‌های کشت آزمایشگاهی ابزار اولیه برای غربالگری این باکتری‌ها هستند. با این حال، محیط‌های رایج مانند پیکوفسکایا (Pikovskaya)، اسپربر (Sperber) و NBRIP، دارای محدودیت‌های شناخته‌شده‌ای هستند. قابلیت اعتماد روش مبتنی بر هاله شفافیت در این محیط‌ها، به‌ویژه برای ارزیابی دقیق باکتری‌های گرم مثبت مانند *Bacillus*، همواره مورد سؤال بوده است، زیرا هاله‌های انحلال ممکن است کم‌رنگ، نامشخص و یا حتی غایب باشند (Bashan et al., 2013). علاوه بر این، ترکیبات غذایی حداقلی این محیط‌ها ممکن است نیازهای متابولیکی پیچیده‌تر باکتری‌های گرم مثبت را به طور کامل تأمین نکرده و منجر به ارزیابی نادرست و دست‌کم گرفتن پتانسیل واقعی آن‌ها شود.

این محدودیت‌ها ضرورت توسعه روش‌های غربالگری کارآمدتر را برجسته می سازد. از این رو، این تحقیق با هدف توسعه و ارزیابی یک محیط کشت جدید و بهینه شده (تحت عنوان FKR)، که به طور خاص برای غلبه بر چالش‌های موجود و بهبود غربالگری باکتری‌های گرم مثبت حل‌کننده فسفات، با تمرکز بر جنس *Bacillus*، طراحی شده است، انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه‌های باکتریایی و آماده‌سازی مایه‌تلقیح

در این پژوهش از مجموعه‌ای شامل ۱۴۲ سویه باکتریایی گرم مثبت و مولد اسپور، که عمدتاً متعلق به جنس *Bacillus* بودند، استفاده شد. این سویه‌ها پیشتر با استفاده از روش‌های استاندارد از خاک ریزوسفر گیاه ذرت (*Zea mays* L.) در مناطق مختلف ایران جداسازی و خالص‌سازی شده بودند. برای آماده‌سازی مایه‌تلقیح جهت هر آزمایش، از هر سویه یک کلنی خالص به ارلن حاوی محیط کشت مایع نوترینت براث (NB) منتقل گردید. کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از رشد کافی، غلظت سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) به ۰,۵ تنظیم گردید که معادل جمعیتی در حدود 10^8 CFU/mL است. این سوسپانسیون تازه به عنوان مایه‌تلقیح استاندارد در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- طراحی و آماده‌سازی محیط‌های کشت

به منظور ارزیابی مقایسه‌ای، سه محیط کشت استاندارد رایج و دو نسخه از محیط کشت نوین پیشنهادی (FKR) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات دقیق و مقایسه‌ای تمام این محیط‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

- **محیط‌های کشت استاندارد:** محیط‌های پیکوفسکایا (PVK)، اسپربر (SP) و NBRIP بر اساس فرمولاسیون‌های اصلی و کلاسیک خود تهیه شدند (Pikovskaya, 1948; Sperber, 1958; Nautiyal, 1999).
- **محیط کشت نوین (FKR):** این محیط با هدف رفع محدودیت‌های تغذیه‌ای محیط‌های استاندارد برای باکتری‌های گرم مثبت طراحی شد. اساس فرمولاسیون آن بر غنی‌سازی منابع نیتروژن و فاکتورهای رشد از طریق افزودن عصاره مخمر و پپتون و همچنین تأمین عناصر کمیاب ضروری برای فعالیت‌های آنزیمی استوار است. این ترکیبات برای حمایت از مسیرهای متابولیکی پیچیده‌تر باکتری‌های جنس *Bacillus* ضروری هستند (Sonenshein et al., 2002). این محیط در دو نسخه تهیه شد:
  - **FKR:** محیط پایه بهینه‌سازی شده.
  - **FKR-BCP:** محیط پایه به همراه شناساگر pH برموکرزول ارغوانی (BCP). این شناساگر به دلیل تغییر رنگ واضح از بنفش (pH > ۶/۸) به زرد (pH < ۵/۲)، امکان ردیابی سریع و بصری تولید اسید را فراهم می‌کند (Atlas, 2010).

تمام محیط‌ها با افزودن ۱۵ گرم بر لیتر آگار جامد شده و پس از تنظیم pH نهایی بر روی ۷٫۰، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند.

جدول ۱: مقایسه ترکیبات شیمیایی (گرم بر لیتر) محیط‌های کشت استاندارد و محیط کشت نوین (FKR)

جزء ترکیبی (g/L)	Pikovskaya (PVK)	Sperber (SP)	NBRIP	FKR / FKR-BCP
منبع کربن				
Glucose (Dextrose)	۱۰٫۰	۱۰٫۰	۱۵٫۰	۱۰٫۰
منبع فسفات نامحلول				
Tricalcium Phosphate	۵٫۰	۲٫۵	۵٫۰	۲٫۰
منابع نیتروژن و فاکتورهای رشد				
Yeast Extract	۰٫۵	۰٫۵	۰٫۱	۱٫۰
Peptone	–	–	–	۰٫۲
Ammonium Sulfate	۰٫۵	–	۰٫۱	۰٫۵
نمک‌های پایه و عناصر				
Potassium Chloride (KCl)	۰٫۲	–	۰٫۲	۰٫۲
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	۰٫۱	۰٫۲۵	۰٫۲۵	۰٫۲۵

Magnesium Chloride ($MgCl_2$)	-	-	۵,۰	-
Calcium Chloride ($CaCl_2$)	-	۰,۱	-	-
عناصر کمیاب (TE[۱])				
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	۰,۰۰۰۱	-	-	۰,۰۱
Ferrous Sulfate ($FeSO_4$)	۰,۰۰۰۱	-	-	۰,۰۱
Zinc Sulfate ($ZnSO_4$)	-	-	-	۰,۰۱
Copper Sulfate ($CuSO_4$)	-	-	-	۰,۰۱
اجزای دیگر				
Agar	۱۵,۰	۱۵,۰	۱۵,۰	۱۵,۰
pH Indicator (BCP)	-	-	-	۰,۰۲ (فقط در FKR-BCP)
pH نهایی	Unbuffered	۷,۲	Unbuffered	۷,۰~

۳-۲- ارزیابی کیفی انحلال فسفات و تولید اسید

برای ارزیابی عملکرد هر سویه، مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایه‌تلقیح استاندارد به صورت نقطه‌ای بر روی سطح محیط‌های کشت جامد تلقیح گردید. پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند. در روزهای اول، سوم و پنجم، قطر کلنی (CD) و قطر هاله شفافیت (HD) با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. در محیط FKR-BCP، قطر هاله زرد رنگ نیز به عنوان شاخص تولید اسید ثبت گردید. برای استاندارد سازی و مقایسه نتایج، شاخص انحلال (SI) و شاخص تولید اسید (API) طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Nautiyal, 1999):

شاخص انحلال (SI[۲]) = قطر هاله شفاف (HD[۳]) / قطر کلنی (CD[۴])

شاخص تولید اسید (API[۵]) = قطر هاله زرد (AD[۶]) / قطر کلنی (CD)

۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شدند. داده‌های مربوط به شاخص‌های SI و API با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹,۴) و از طریق تحلیل واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p\leq0.05$) انجام شد.

---

۱ Trace Elements
۲ Solubilization Index
۳ Halo diameter
۴ Colony dimeter
۵ Acid Production Index
۶ Acid diameter

۳. نتایج

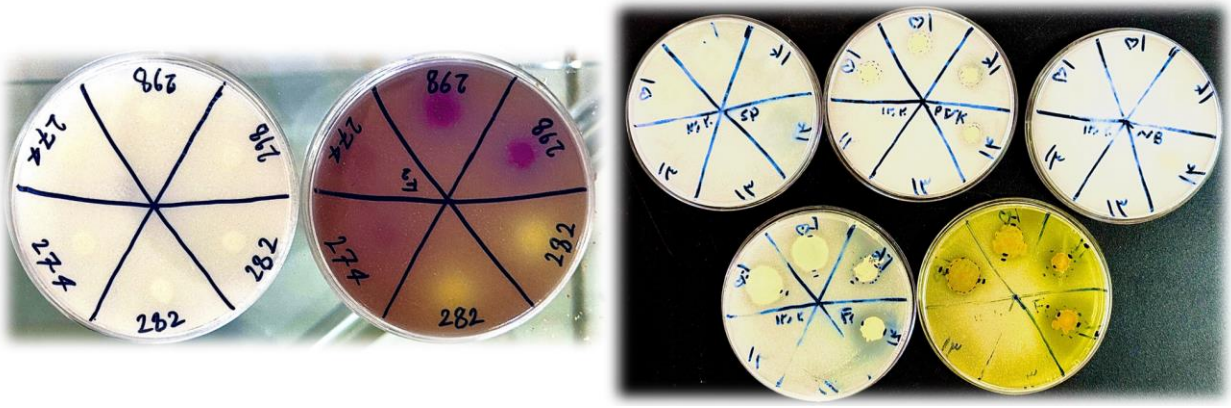
برای ارزیابی و مقایسه عملکرد محیط کشت نوین (FKR و FKR-BCP) با محیط‌های استاندارد، مجموعاً ۱۲۴ سویه باکتریایی گرم مثبت مورد غربالگری قرار گرفتند. نتایج کمی و کیفی این ارزیابی به طور کامل در **جدول ۱** خلاصه شده است.

جدول ۱- مقایسه عملکرد و کلاس‌بندی کیفی محیط‌های کشت بر روی ۱۲۴ سویه باکتریایی گرم مثبت

شاخص ارزیابی	FKR	FKR-BCP	Sperber	Pikovskaya	NBRIP
تعداد کل سویه‌های شناسایی شده مثبت (SI > ۱)	۶۵	۵۹	۲۵	۲۷	۲۴
درصد شناسایی سویه‌های مثبت	۵۲٪	۴۸٪	۲۰٪	۲۲٪	۱۹٪
کلاس A (بسیار قوی / SI ≥ 2.5)	۴	۵	۱	۱	۰
کلاس B (قوی / ۲ ≤ SI > ۲,۵)	۴	۴	۴	۰	۳
کلاس C (متوسط / ۱,۵ ≤ SI > ۲)	۱۸	۱۳	۱۱	۹	۱۱
کلاس D (ضعیف / ۱ < SI > ۱,۵)	۳۸	۳۷	۹	۱۷	۱۳
تعداد سویه‌های فاقد هاله (SI = 1)	۵۹	۶۵	۹۹	۹۷	۱۰۰
درصد سویه‌های فاقد هاله	۴۸٪	۵۲٪	۸۰٪	۷۸٪	۸۱٪
تعداد سویه‌های با پتانسیل پنهان ($Acid^+/Halo^-$)	۱۴	۲۰	۵۴	۵۲	۵۵
درصد سویه‌های با پتانسیل پنهان	۱۱٪	۱۶٪	۴۴٪	۴۲٪	۴۴٪

۳-۱- برتری کمی محیط کشت FKR در شناسایی سویه‌های مثبت

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، تفاوت چشمگیری در کارایی کلی محیط‌های کشت مشاهده شد. محیط FKR با شناسایی ۶۵ سویه (۵۲٪) و محیط FKR-BCP با شناسایی ۵۹ سویه (۴۸٪)، به طور مشخص از بهترین محیط استاندارد، یعنی Pikovskaya که تنها ۲۷ سویه (۲۲٪) را شناسایی کرد، پیشی گرفتند. محیط‌های Sperber و NBRIP به ترتیب با شناسایی ۲۰٪ و ۱۹٪ از سویه‌ها، عملکرد ضعیف‌تری داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که فرمولاسیون بهینه‌سازی شده FKR به طور میانگین بیش از ۲,۵ برابر کارآمدتر از روش‌های استاندارد در تشخیص پتانسیل انحلال فسفات عمل می‌کند. نتایج حاصل از غربالگری یک سویه باکتریایی گرم مثبت، تفاوت چشمگیری را در کارایی محیط کشت نوین (FKR) در مقایسه با محیط‌های استاندارد آشکار می‌سازد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه بصری عملکرد محیط کشت نوین (FKR) با محیط‌های استاندارد در غربالگری باکتری‌های گرم مثبت.

۳-۲- تفکیک کیفی و شناسایی سویه‌های برتر[۷]

برتری محیط FKR در طبقه‌بندی کیفی سویه‌ها نیز کاملاً مشهود بود. طبق داده‌های جدول ۱، محیط‌های FKR و FKR-BCP مجموعاً ۹ سویه در کلاس A (بسیار قوی) و ۸ سویه در کلاس B (قوی) را شناسایی کردند. این در حالی است که مجموع سه محیط استاندارد تنها موفق به شناسایی ۲ سویه کلاس A و ۷ سویه کلاس B شدند. به طور خاص، محیط NBRIP که به عنوان یک محیط استاندارد دقیق شناخته می‌شود، هیچ سویه‌ای را در کلاس A شناسایی نکرد. این یافته نشان می‌دهد که برای یافتن کاندیداهای واقعاً برتر جهت تولید کود زیستی، محیط‌های استاندارد از حساسیت و دقت کافی برخوردار نیستند.

۳-۳- شناسایی پتانسیل پنهان و نرخ بالای نتایج منفی کاذب در روش‌های استاندارد

یکی از مهم‌ترین یافته‌های این تحقیق، که با استفاده از محیط FKR-BCP ممکن شد، شناسایی پتانسیل پنهان در سویه‌های باکتریایی بود. داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که در محیط‌های استاندارد، درصد بسیار بالایی از سویه‌ها با وجود داشتن فعالیت متابولیکی (تولید اسید)، هاله انحلال شفافی ایجاد نکردند و به اشتباه به عنوان منفی طبقه‌بندی شدند. این پدیده در محیط NBRIP از همه شدیدتر بود، به طوری که ۵۵ سویه (۴۴٪) با وجود تولید اسید، فاقد هاله شفاف بودند. این امر منجر به نرخ بالای نتایج منفی کاذب (False Negative) و حذف اشتباه سویه‌های بالقوه مفید در فرآیندهای غربالگری استاندارد می‌شود.

۳-۴- بحث و تحلیل نتایج

---

[۷] Elite Strains

نتایج این تحقیق به طور قاطع نشان می‌دهد که فرمولاسیون محیط‌های کشت استاندارد، برای ارزیابی دقیق پتانسیل باکتری‌های گرم مثبت حل‌کننده فسفات، به‌ویژه جنس *Bacillus*، دارای محدودیت‌های جدی و یک خطای سیستماتیک منفی است. برتری چشمگیر محیط نوین FKR، که به طور میانگین کارایی شناسایی سویه‌های مثبت را ۲/۷ برابر افزایش داد، می‌تواند به ترکیب بهینه سازی شده آن نسبت داده شود. برخلاف محیط‌های حداقلی استاندارد، فرمولاسیون غنی شده FKR با منابع نیتروژن آلی (عصاره مخمر و پپتون) و عناصر کمیاب (جدول ۱)، نیازهای متابولیکی پیچیده‌تر باکتری‌های گرم مثبت را تأمین می‌کند. این گروه از باکتری‌ها برای تولید اسیدهای آلی و سایر متابولیت‌های مؤثر در انحلال فسفات، به پیش سازها و کوفاکتورهای آنزیمی متنوعی نیاز دارند که در محیط‌های رایج به شدت محدود است (Sonenshein et al., 2002). بنابراین، عملکرد ضعیف سویه‌ها در محیط‌های استاندارد لزوماً به معنای پتانسیل ژنتیکی پایین آن‌ها نیست، بلکه بیشتر ناشی از ناتوانی آن محیط‌ها در فراهم کردن بستر لازم برای بیان فنوتیپ مورد نظر است؛ یافته‌ای که تحلیل انتقادی پیشین در مورد نامناسب بودن این محیط‌ها را تأیید و تقویت می‌کند (Bashan et al., 2013).

یکی از مهم‌ترین دستاوردهای این پژوهش، آشکارسازی پدیده پتانسیل پنهان از طریق محیط FKR-BCP بود. نتایج ما نشان داد که در صد بالایی از سویه‌ها (در برخی آزمایش‌ها بیش از ۴۰٪ در محیط‌های استاندارد) با وجود داشتن فعالیت متابولیکی و تولید اسید، قادر به ایجاد هاله انحلال شفاف قابل مشاهده نیستند. این امر نشان می‌دهد که اتکای صرف به هاله شفاف به عنوان تنها معیار غربالگری، منجر به نرخ بالای نتایج منفی کاذب[۸] و حذف اشتباه سویه‌های بالقوه مفید می شود. این یافته، پیچیدگی فرآیند انحلال را برجسته می سازد؛ جایی که صرفاً تولید اسید کافی نیست و عواملی مانند نوع اسید تولیدی، قدرت کلات‌کنندگی آن و احتمال وجود مکانیسم‌های همزمان دیگر در تعیین کارایی نهایی نقش دارند (Rawat et al., 2021).

شاید شگفت‌انگیزترین یافته این تحقیق، شناسایی سویه‌هایی با سازوکار انحلال غیر اسیدی بود که با قلیایی کردن محیط، هاله بنفش تیره ایجاد کردند. این مشاهده نشان می‌دهد که این باکتری‌ها احتمالاً از مسیرهای جایگزینی مانند تولید آنزیم‌های فسفاتاز یا عوامل کلات‌کننده کلسیم برای آزادسازی فسفات بهره می‌برند. این دسته از سویه‌ها از نظر کشاورزی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند، زیرا پتانسیل بالایی برای کاربرد در خاک‌های آهکی و قلیایی ایران از خود نشان می‌دهد؛ در این خاک‌ها، اسید تولیدی توسط PSBهای معمولی به سرعت توسط بافر کربنات کلسیم خنثی شده و کارایی خود را از دست می‌دهد (Alori et al., 2017). کشف این سویه‌ها، که با روش‌های استاندارد کاملاً نادیده گرفته می شدند، ارزش محیط FKR را به عنوان یک ابزار اکتشافی برای یافتن تنوع عملکردی جدید دوچندان می‌کند.

۴. نتیجه‌گیری

[۸] False Negative

نتایج این پژوهش به طور قاطع نشـان می‌دهد که محیط کشـت نوین FKR، ابزاری برتر و کارآمدتر نسـبت به روش‌های اسـتاندارد برای غربالگری باکتری‌های گرم مثبت حل‌کننده فسـفات، به‌ویژه جنس *Bacillus*، می‌باشـد. این برتری نه تنها در نرخ شـناسـایی سویه‌های مثبت (که بیش از ۲/۵ برابر افزایش یافت) مشهود بود، بلکه در توانایی تفکیک کیفی سویه‌ها، شناسایی کاندیداهای برتر (کلاس A) و کشف سویه‌هایی با سازوکارهای انحلال غیرا سیدی نیز به اثبات ر سید. محیط FKR با کاهش چ شمگیر نتایج منفی کاذب و آشـکارسـازی پتانسـیل واقعی میکروبی، یک ابزار قابل اعتماد برای غلبه بر یکی از موانع اصـلی در مسـیر توسـعه کودهای زیستی مؤثر فراهم می‌کند. بنابراین، استفاده از این محیط کشت بهینه‌سازی شده می‌تواند فرآیند انتخاب و توسعه نسل جدیدی از کودهای زیستی فسفاته را به طور قابل توجهی تسریع و کارآمدتر نماید.

منابع

Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D. A., Panagos, P., & Borrelli, P. (2020). Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nature Communications*, *11*(1), 4546.

Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 971.

Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media* (4th ed.). CRC press.

Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, *4[1]9*, 465-479.

Le Moal, M., Gascuel-Odoux, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., ... & Pinay, G. (2019). Eutrophication: A new wine in an old bottle?. *Science of the Total Environment*, *651*, 1-11.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *170*(1), 265-270.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, *17*, 362-370.

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *21*(1), 49-68.

Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., & Losick, R. (Eds.). (2002). *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. ASM Press.

Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, *9*(6), 778-787.

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

Shakiba Reisi*[1], Hosseinali Alikhani[1], Alireza Fallah Nosratabad[2], Ahmad Ali Pourbabaee[1], and Bahman Khoshru[2]

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

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

*Corresponding author: shakibaa.reisii@gmail.com

Abstract

Screening of phosphate-solubilizing bacteria (PSB), particularly Gram-positive strains with a focus on the genus *Bacillus*, is a fundamental challenge in biofertilizer development due to the high rate of false negatives in standard culture media. This research aimed to develop and validate a novel culture medium (FKR) to overcome these limitations, tested on 142 bacterial strains. Results showed that the FKR medium identified an average of 52% of strains as phosphate solubilizers, whereas the rate for standard media (NBRIP, Pikovskaya, and Sperber) was only 19% (a 2.7-fold higher efficiency). This superiority was also evident in identifying elite strains; the FKR medium identified 9 Class A strains (Solubilization Index ≥ 2.5), while all three standard media combined identified only 2. Furthermore, the use of a pH indicator in the FKR-BCP medium revealed that a significant portion of acid-producing strains do not form clear halos on standard media. These findings establish the FKR medium as a more sensitive and accurate tool for the qualitative differentiation and selection of superior strains, especially from the genus *Bacillus*.

Keywords: *Bacillus*, Culture medium formulation, Microbial screening, pH indicator, Phosphate solubilization.