بررسی توان باکتریهای فلاوباکتریوم در حلالیت فسفر نامحلول

سمانه رفیعی*[۱،] و هادی اسدی رحمانی[۲]

[۱] **کاشان، مؤسسه آموزش عالی علمی-کاربردی جهاد کشاورزی**

[۲] **کرج، موسسه خاک و آب**

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۷

چکیده

ریزوسفر محل زندگی طیف متنوعی از میکروارگانیسمها و بالاخص باکتریهاست که ممکن است برای رشد گیاه مفید، مضر یا بی تأثیر باشد. باکتریهای مفید این منطقه که به باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه موسوم می باشند توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده اند. این باکتریها می توانند با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص موجب بهبود رشد گیاه شوند. توانایی افزایش حلالیت فسفاتهای معدنی نامحلول یکی از صفاتی است که معمولاً در غربالگری و انتخاب این باکتریها در نظر گرفته می شود. باکتری جنس *Flavobacterium* یکی از انواع باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه است که در بسیاری از مقالات مروری چاپ شده در فهرست انواع PGPR ذکر شده است. در این تحقیق به منظور بررسی توانایی حل کنندگی فسفاتهای معدنی نامحلول در محیط کشت جامد و مایع حاوی تری کلسیم فسفات اسپربر، از ۴۴ جدایه فلاوباکتریوم جداسازی شده از ریزوسفر گندم خاکهای ایران استفاده شد. نتایج نشان داد که ۲۸ جدایه توان رشد در محیط جامد را داشتند. شاخص انحلال فسفر در روز چهارم از ۰/۲۴ تا ۱/۱۷، در روز ششم از ۰/۱۵ تا ۱/۳۶ و در روز هشتم از ۰/۱۲ تا ۲/۷۳ متغیر بود. بیشترین شاخص انحلال فسفر به طور متوسط مربوط به جدایه F_{11} بود. از نظر توانایی جدایه ها در استفاده از تری کلسیم فسفات در محیط اسپربر مایع، نتایج نشان داد که ۳۴ جدایه از قدرت حل کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط مایع برخوردار بودند. متوسط میزان حلالیت ۳/۵۴ میکروگرم در میلی لیتر و دامنه آن از صفر تا ۳۷/۴۸ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. نتایج حاکی از این بود که جدایه F_{11} برترین جدایه از نظر توان حل کنندگی فسفات در محیط اسپربر مایع بود.این جدایه از گونه *odaratum F.* متعلق به کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب به عنوان جدایه برتر از نظر توان حل فسفات معدنی نا محلول در محیط جامد و مایع بود.

واژه های کلیدی: فلاوباکتریوم، انحلال فسفر معدنی، باکتریهای محرک رشد گیاه، ریزوسفر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۲۵۲۱۲۵۹ ، پست الکترونیکی: samanehrafiei2004@yahoo.com

مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی پر مصرف مهم می باشد که کمبود آن رشد گیاه را به شدت محدود می کند. حلالیت فسفر در خاک کم بوده و لذا قسمت اعظم فسفر در خاک به فرم فسفاتهای نامحلول می باشد (۳). از طرف دیگر هنگام مصرف کودهای شیمیایی بخش قابل ملاحظه ای از فسفر به فرم ترکیبهای نامحلول در خاک تثبیت می گردد. لذا خاکهای کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از ذخایر فسفر نا محلول می باشند (۲۷). بنابراین آزاد سازی فسفر از فرمهای نا محلول و تثبیت شده موجود در خاک به منظور افزایش قابلیت فراهمی فسفر برای گیاهان زراعی از اهمیت خاصی برخوردار است. در این میان میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات (PSM) نقش بسیار مهمی در حلالیت ترکیبات نا محلول فسفر در خاک ایفا می کنند.این انواع شامل انواع مختلفی از میکروارگانیسمهای خاکزی هستند

که تر کیبات نا محلول فسفر را به فرم محلول تبدیل می کنند. باکتریها و قارچها(۳۳) عمده ترین میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات در خاک را تشکیل می دهند. *Aspergillus* و *Penicillium* از جنسهای مهم قارچهای حل کننده فسفات نا محلول و *Bacillus* و *Pseudomonas* از انواع مهم باکتریهای حل کننده فسفات می باشند(۱۵). توان سویه های مختلف باکتریهای خاک برای انحلال فسفاتهای معدنی نامحلول در گزارشات مختلف مورد اشاره قرار گرفته است. (۱۱). در میان این انواع می توان به جنسهای سودوموناس، باسیلوس، فلاوباکتریوم، میکروکوکوس، انترو باکتر و همچنین جنسهای مختلف باکتریهای ریزوبیوم اشاره کرد(۶، ۱۵و ۲۷). معمولاً جمعیت باکتریهای حل کننده فسفات در ریزوسفر گیاهان در مقایسه با خاکهای غیرریزو سفری بیشتر می باشد(۱۶ و ۲۸). مکانیسم انحلال فسفاتهای معدنی نا محلول تا حدود زیادی مورد مطالعه قرار گرفته اند. در تحقیقی وسکوایز و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که فراوانی میکروارگانیسمهای حل کننده فسفاتهای معدنی نامحلول در ریزوسفر گیاهان بیشتر از خاک غیر ریزوسفری می باشد(۳۱). تولید اسیدهای آلی توسط این باکتریهای بعنوان مکانیسم اصلی انحلال فسفاتهای معدنی ذکر شده است(۱۴ و ۲۷). هالدر و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که اسیدهای آلی جدا شده از محیط کشت باکتری ریزوبیوم لگومینوسارم می تواند موجب انحلال فسفاتهای معدنی شود و مقدار فسفاتهای محلول شده در نتیجه اثر این اسیدها بیشتر از محلولهای فاقد سلول باکتری بوده است(۱۳). گلدستین (۱۹۹۵) تولید اسید های آلی را عامل اصلی انحلال فسفاتهای معدنی نا محلول توسط برخی از باکتریهای گرم منفی اعلام کرد(۱۲). وسکوایز و همکاران (۲۰۰۰) اولین مرحله در ارزیابی توان حل فسفات معدنی جدایه های مختلف باکتری را تشکیل هاله در اطراف کلنی کشت شده روی محیط حاوی ترکیبات فسفات معدنی نا محلول دانسته اند(۳۱). به منظور بررسی توان باکتری در انحلال فسفاتهای معدنی در محیط جامد از محیطهای مختلف مانند اسپربر، پیکووسکایا و RPAM که حاوی ترکیبات نا محلول فسفر مثل تری کلسیم فسفات، مونوکلسیم فسفات و آپاتیت هستند استفاده می شود (۹، ۱۰، ۱۸ و ۲۴). اسپربر و همکاران (۱۹۵۸) در تحقیقات خود از ۶۹۵ جدایه استفاده کردند و در بین باکتریهای که توان انحلال فسفات را داشتند هاله هایی با قطرهای متفاوت راگزارش نمود(۲۸). در تحقیق دیگری کاسی (۱۹۸۳) توان آزاد سازی فسفر در محیط جامد PDYA را با ۴۴ جدایه باکتری مطالعه نمود. نتایج نشان داد که توانایی حل کردن فسفات نامحلول به علت تنوع زیاد جدایه ها بسیار متفاوت بود و ۲۱ جدایه توانایی خود را بعد از دو بار کشت از دست دادند(۱۹). بسیاری از محققین توانایی میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات را در محیط کشت مایع بررسی نموده اند. در این گونه تحقیقات محققین مقادیر فسفر آزاد شده و متابولیتهای تولید شده از قبیل اسید های آلی توسط میکروارگانیسمها را در محیط کشت ارزیابی کرده اند(۲۲ و ۳۳). کاسی و همکاران (۱۹۸۹) و باریوسف و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که حلالیت میکروبی فسفاتهای نا محلول در محیط کشت مایع حاوی این میکروارگانیسمها به دلیل ترشح اسید های آلی می باشد (۵ و ۲۰). وجود اسیدهای آلی از قبیل اگزالیک، سیتریک، لاکتیک و گلوکنیک با روشهای مختلفی کروماتوگرافی از قبیل TLC و HPLC در محیط کشت مایع میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات تعیین و توسط محققین گوناگونی گزارش شده است(۴، ۱۴، ۱۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۴).

نقش اسیدهای آلی در حلالیت فسفاتهای نا محلول به کاهش pH، کلات نمودن کاتیونها و رقابت با فسفر جهت اشغال مکانهای جذب در خاک نسبت داده می شود. همچنین گزارش شده است که اسیدهای آلی ممکن است کمپلکسهای محلول با یونهای فلزی پیوند شده با فسفر از

قبیل کلسیم، آلومینیوم و آهن تشکیل دهند و بدین طریق باعث آزاد سازی فسفر گردند(۱۷ و ۲۳)

مواد و روشها

در این تحقیق از ۴۴ جدایه فلاوباکتریوم (F_1 تا F_{44}) متعلق به کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب استفاده شد. به منظور تهیه کشت خالص، هر یک از جدایه ها بر روی محیط کشت اختصاصی FIM کشت شدند. پس از گذشت ۶ روز از نگهداری پلیتها درانکوباتور با دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و تحت تابش نور سفید فلورسنت، از کلونیهای خالص رشد کرده جهت مراحل بعدی آزمایش استفاده شد. برای ارزیابی توانایی حل فسفاتهای معدنی نا محلول توسط جدایه ها در محیط جامد از محیط کشت اسپربر و خصوصیت شفاف سازی محیط اطراف کلونی باکتری استفاده شد (۲۸). ترکیبات محیط اسپربر جامد شامل گلوکز (۱۰ گرم در لیتر)، عصاره مخمر(۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۱۴ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۳۲ گرم در لیتر)، تری کلسیم فسفات (۲/۵ گرم در لیتر) و آگار (۱۸ گرم در لیتر) با pH= ۷/۲ بود. در این آزمون برای هر جدایه باکتری یک پلیت حاوی محیط اسپربردر نظر گرفته شد. سطح هر پلیت به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و به عنوان تکرار آزمایش در نظر گرفته شد. مرکز هر یک از قسمتهای چهارگانه با ۷ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری رشد یافته در محیط TSB تلقیح گردید و پلیتهای تلقیح شده توسط نوار پارافیلم درزگیری و در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قطر کلونی رشد یافته (CD) و نیز قطر هاله شفاف اطراف کلونی حاصل از انحلال تری کلسیم فسفات (HD) در سه نوبت ۴، ۶ و ۸ روز اندازه گیری گردید و متوسط نسبت هاله به کلونی HD/CD تکرار های چهار گانه هر جدایه فلاوباکتریوم ها محاسبه شد(۱).

به منظور بررسی توان جدایه های فلاوباکتریوم ها در انحلال فسفاتهای معدنی نا محلول در محیط مایع از محیط کشت اسپربر مایع استفاده شد. ابتدا باکتریها به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB در سه تکرار رشد داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط اسپربر مایع منتقل گردید. ارلنها به مدت ۱۲۰ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۵ دور بر دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تکان داده شدند. سپس pH نمونه ها قرائت شد. به طور همزمان سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شده و یک میلی لیتر از محلول رویی با ۳ میلی لیتر آب مقطر و یک میلی لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول آزاد شده توسط هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظتهای مختلف KH2PO4 محاسبه شد(۱).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه گیری توان حل فسفاتهای معدنی توسط جدایه های فلاوباکتریوم بر روی محیط کشت جامد اسپربر نشان داد که از ۴۴ سویه مورد استفاده ۱۶ جدایه ها توان رشد بر روی این محیط را نداشتند. در مابقی جدایه ها (۲۸ جدایه) با گذشت زمان شاخص انحلال فسفاتهای معدنی نامحلول (نسبت قطر هاله به کلنی) افزایش یافت. نتایج نشان داد که اثرات جدایه ها در انحلال فسفاتهای نا محلول در هر سه مرحله اندازه گیری در محیط جامد در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱). بین جدایه های مورد استفاده از نظر توان حل کنندگی فسفر در این محیط اختلاف معنی داری وجود داشت(جدول ۲). بیشترین نسبت قطر هاله به قطر کلنی در روز چهارم ۱/۱۷، در روز ششم ۱/۳۶ و در روز هشتم ۲/۷۳ بود. بیشترین شاخص انحلال فسفات به طور متوسط مربوط به سویه F_{11} بود. این جدایه از گونه *F. odaratum* متعلق به کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب به عنوان جدایه برتر از نظر توان حل فسفات معدنی نا محلول در محیط

جامد بود. مولا و همکاران (۱۹۸۴) در بررسیهای خود نشان دادند که از ۱۸۴ باکتری ۸۴ جدایه هاله ای به قطر ۱۰-۱ میلی متر ایجاد کردند(۲۱). اسپربر (۱۹۵۸) پس از بررسی ۶۹۵ جدایه گزارش کرد که هاله ایجاد شده در ۸۷ جدایه باکتری بین ۰ تا ۱ میلی متر، در ۴۳ جدایه بین ۱ تا ۳ میلی متر، در ۳۰ جدایه بین ۳ تا ۸ میلی متر و در ۵۶ جدایه بیشتر از ۸ میلی متر بود(۲۸). علیخانی(۱۳۸۲) در اندازه گیری توان حل فسفات معدنی توسط سویه های ریزوبیومی در محیط کشت اسپربر نشان داد که از مجموع ۴۴۶ سویه باکتری تعداد ۱۹۸ سویه توان حل فسفات از خود نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که هیچ کدام از ۵۷ سویه برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم و ۱۳ سویه برادی ریزوبیوم همزیست گیاه بادام زمینی آزمون شده، توانایی انحلال فسفر در محیط کشت اسپربر را نداشتند(۲).

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی جدایه های فلاوباکتریوم در انحلال فسفات معدنی نا محلول در محیط مایع نشان داد که ۳۴ جدایه از توانایی حل کردن تری کلسیم فسفات برخوردار بودند. متوسط میزان فسفر آزاد شده ۳/۵۴ µg/ml و دامنه آن از ۰ تا ۳۷/۴۸ µg/ml متغیر بود. بیشترین مقدار فسفر حل شده مربوط به جدایه F_{11} و معادل µg/ml ۳۷/۴۸ بود. دی فرتاس و همکاران (۱۹۹۷) حلالیت سنگ فسفات در محیط مایع RPAM را طی ۱۵ روز مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که باکتریهای مورد استفاده توان آزادسازی ۷/۵ تا ۲۲/۵ µg/ml فسفر را دارند(۹). تومار (۱۹۹۷) مقدار فسفر محلول آزاد شده در طی ۱۴ روز در محیط مایع حاوی تری کلسیم فسفات تلقیح شده با باکتریهای میله ای گرم منفی را برابر ۷۸/۸ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت گزارش نمود(۲۹).

در تحقیق حاضر تعداد ۱۰ جدایه به شماره F_2، F_{21}، F_{26}، F_{27}، F_{31}، F_{32}، F_{35}، F_{42}، F_{43} و F_{44} توانایی حل کردن فسفات معدنی نامحلول را نداشتند. کاتلان و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که جدایه های Gw۲۱۰۳ و Lc۱۱۱۸ از گونه *Flavobacterium indologenes* فاقد چنین توانایی بودند(۷).

در مورد تعدادی از جدایه های فلاوباکتریوم که دارای توانایی انحلال تری کلسیم فسفات بودند کاهش pH محیط کشت (تا حدود pH معادل۵/۰۴) در مقایسه با شاهد بدون باکتری(pH= ۵/۶۲) مشاهده گردید. کاهش pH در محیطهای کشت مایع باکتریهای حل کننده فسفات توسط محققین مختلف گزارش شده است(۵، ۸ و ۱۵). تومار (۱۹۹۷)در اندازه گیری فسفر محلول و pH آن در طی ۱۴ روز از کشت باکتریها در محیط مایع حاوی تری کلسیم فسفات مشاهده کرد که با افزایش فسفر محلول pH محیط کاهش یافت(۲۹). تغییرات pH محیط کشت در سطح ۱ درصد معنی دار بود. ونکاتس وارلو و همکاران (۱۹۸۴) همبستگی منفی معنی داری (r=-۰/۹۳) بین میزان حل شدن فسفات و pH محیط مشاهده نمودند(۳۲). در تحقیق دیگری رشید و همکاران (۲۰۰۴) نیز بین دو شاخص مذکور همبستگی منفی (r=-۰/۴) گزارش کردند(۲۶). نتایج کلی این تحقیق نشان داد که از میان باکتریهای مورد مطالعه جدایه های F_3، F_7، F_8، F_{11}، F_{17}، F_{18}، F_{20}، F_{22}، F_{34}، F_{37} و F_{10} جدایه های برتر از نظر توان آزاد سازی فسفر از تری کلسیم فسفات در محیط مایع و جامد بودند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس(جدول۱) و مقایسه میانگینها (جدول۲)، مقدار فسفر آزاد شده از تری کلسیم فسفات توسط جدایه های فلاوباکتریوم اختلاف معنی داری بین این جدایه ها از نظر توان حل کنندگی فسفات وجود دارد.بین مقدار فسفر حل شده در محیط مایع و در محیط جامد همبستگی معنی داری در سطح یک درصد به دست آمد که بیشترین همبستگی مربوط به روزهشتم (r**=-۰/۹۴۵) بود. جدایه F_{11} گونه *F. odaratum* متعلق به کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب برترین جدایه از نظر توان حل کنندگی فسفات در محیط مایع در بین باکتریهای مورد استفاده بود.

جدول۱- تجزیه واریانس اثر جدایه های مختلف فلاوباکتریوم در حل کنندگی فسفات های معدنی نا محلول در محیط جامد و مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		نسبت قطر کل به کلونی (روز چهارم)	نسبت قطر کل به کلونی (روز ششم)	نسبت قطر کل به کلونی (روز هشتم)	میزان حلالیت در محیط مایع
سویه	۴۳	۰/۳۴۲**	۰/۴۰۲**	۰/۸۹**	۴/۵۳۶**
خطا	۸۸	۱/۴۴۷	۴/۱۱۴	۱/۳۲۶	۰/۰۰۴

** -معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول ۲- توان جدایه های مورد استفاده در حلالیت فسفر نامحلول در محیط جامد و مایع

جدایه	قطر کل هاله به قطر کلونی در محیط جامد			فسفر آزاد شده در محیط مایع (µg/ml)	pH محیط رشد
	روز چهارم	روز ششم	روز هشتم		
F_1	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۱۴N	۱/۲۴NOPQ	۵/۶۴
F_2	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_3	۰/۴۵F	۰/۴۹F	۰/۵۹ G	۴/۲۶FGH	۵/۵۸
F_4	۰/۴۰J	۰/۴۶FGH	۰/۵۷H	۳/۸۵HI	۵/۶۴
F_5	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۶۲RST	۵/۶۵
F_6	۰/ ۳۱ H	۰ /۴۴HG	۰/۵۹G	۳/۶۴I	۵/۵۹
F_7	۰/۸۰D	۰/۸۳D	۰/۹۱E	۶/۱۸E	۵/۳۶
F_8	۰/۵۱E	۰/۵۶E	۰/۶۷F	۴/۶۷F	۵/۶۷
F_9	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰ O	۰/۸۳PQRS	۵/۶۲
F_{10}	۰/۷۹D	۰/۸۴D	۰/۹۶D	۷/۱۵D	۵/۴۵
F_{11}	۱/۱۷A	۱/۳۶A	۲/۷۳A	۳۷/۴A	۵/۰۴
F_{12}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۷۶QRS	۵/۶۳
F_{13}	۰/۰۰J	۰/۲۷J	۰/۳۲L	۱/۷۹KLMN	۵/۶۳
F_{14}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۱۲N	۱/۱۱OPQR	۵/۷۱
F_{15}	۰/۴۰J	۰/۴۴HG	۰/۵۵I H	۳/۷۸HI	۵/۶۳
F_{16}	۰/۰۰J	۰/۰۰ L	۰/۱۲N	۱/۱۷OPQR	۵/۶۰
F_{17}	۰/۵۰E	۰/۵۴E	۰/۶۶F	۴/۵۴FG	۵/۵۹
F_{18}	۰/۹۲C	۰/۹۷C	۱/۲۱C	۹/۶۲C	۵/۵۲
F_{19}	۰/۳۹J	۰/۴۵FGH	۰/۵۵HI	۳/۰۳J	۵/۵۴
F_{20}	۰/۹۶B	۱/۲۶B	۱/۹۰B	۱۶/۷۵B	۵/۱۹
F_{21}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰ T	۵/۶۰
F_{22}	۰/۷۹D	۰/۸۳D	۰/۹۱E	۶/۴۶E	۵/۴۲
F_{23}	۰/۰۰J	۰/۳۲JI	۰/۳۴L	۱/۸۶KLM	۵/۴۲
F_{24}	۰/۴۰J	۰/۴۴HG	۰/۵۴I	۳/۷۱HI	۵/۵۵
F_{25}	۰/۰۰J	۰/۳۰JI	۰/۳۳L	۱/۸۶KLM	۵/۷۲
F_{26}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰ /۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{27}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰Td	۵/۶۰
F_{28}	۰/۰۰J	۰/۱۵K	۰ / ۱۸M	۱/۳۸MNOP	۵/۵۷
F_{29}	۰/۳۱۰H	۰/۳۴I	۰/۴۰K	۲/۱۳K	۵/۸۰
F_{30}	۰/۲۴۶۶۷I	۰/ ۳۴I	۰/۳۹K	۱ /۹۹KL	۵/۶۳
F_{31}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{32}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{33}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۷T	۵/۶۳
F_{34}	۰/۸۰D	۰/۸۳D	۰/۹۲E	۶/۴۶E	۵/۴۷
F_{35}	۰/۰۰J	۰/ ۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{36}	۰/۳۹ J	۰/۴۲H	۰/۵۱J	۲/۳۴K	۵/۷۸
F_{37}	۰/۴۴F	۰/۴۷GF	۰/۵۹G	۳/۹۹GHI	۵/۸۲
F_{38}	۰/۰۰J	۰/۱۷K	۰/۱۹M	۱/۴۵LMNO	۵/۷۰
F_{39}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۶۲RST	۵/۷۰
F_{40}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰ O	۰/۴۸ ST	۵/۵۹
F_{41}	۰/۰۰J	۰/۱۷K	۰/۱۹M	۱/۴۵LMNO	۵/۷۵
F_{42}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{43}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F_{44}	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰ T	۵/۶۰

منابع

۱-عباس زاده دهجی، پ. جداسازی و شناسایی سودوموناس های فلورسنت محرک رشد گیاه (PGPR) و مطالعه تأثیر آنها بر رشد و عملکرد گیاه کلزا. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲-علیخانی، ح. ۱۳۸۲. بررسی پتانسیل کاربرد سویه های بومی ریزوبیومی به عنوان عوامل محرک رشد گیاه (PGPR) و تعیین اثرات تلقیح انواع برتر انها بر شاخص های رشد گندم، ذرت و یونجه. پایان نامه دکتری گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

3-Abd-Alla, M.H. 1994. Phosphate and the utilization of organic phosphorous by *Rhizobium Leguminosarum* biovar viceae. Lett. Appl. Microbiol., 18: 294-296.

4-Banik, S. and B.K.Dey,. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant Soil, 69:353-364.

5-Bar-Yosef, B., Rogers, R. D., Wolfarm, J. H. and Richman, E. 1999. Pseudomonase cepacie-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorilloni suspension. Soil. Sci. Soc. Am. J. 63:1703-1708.

6-Bolan, N. S., Eillott, J., Glegg, P. E .H. and Weil, S. 1997. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. Biol. Fertil. Soils, 24: 169-174.

7-Cattelan, A. J., Hartel, P. G. and Fuhrmunn, J. J. 1999. Screening for plant growth- promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil. Sci. Soc. Am. J. 63:1670-1680.

8-Cunningham, J. e. and Kuiack, C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1451-1458.

9-De Freitas, J. R., Baneryee, M. R. and Germida, J. J. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus L*). Biol. Fertil. Soils, 24: 358-346.

10-Gaint, S. and Gaur, A. C. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean . Plant Soil, 133:141-149.

11-Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects . Am. J. Altern. Agri. 1: 51-57.

12-Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. Biolog. Agric. Horticul.12: 185- 193.

13-Halder, A. K., and Chakrabartty, P. K. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. Folia. Microbiol. 38: 325-330.

14-Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates: Solubilizations mechanisms . Soil Biol. Biochem . 27: 257-263.

15-Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly soluble $AlPO_4$ with P-Solubilizing Microorganism. Soil. Biol. Biochem. 27:265-270.

16-Katznelson, H., Peterson , E. A. and Rovatt, J. W. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants . Can. J. Bot . 40: 1181-1186.

17-Kepert, D. G., A. D. Rbson and A. M. Ponser. 1979. The eaffect of organic root products on the availability of phosphorus to plants In: The Soil-root Interface:(L. Harley and R. Scott Russel Eds.) Academic Press London, PP:115-124.

18-Kim Y. K. , D. Jordan and G. A. McDonald. 1997. Effect of phosphate- solubilizing andvesicular- arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity

19-Kucey , R. M. N. 1983. Phosphate – solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils . Can . J. Soil Sci. 63: 671-678.

20-Kucey, R.M. N., H. H. Janzen and M. E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. Adv. Agron., 42: 199-228

21-Molla, M.A.Z., chowdury,A.A., Islam ,A. and Hoque. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil . Plant Soil . 78: 393-399.

22-Narula, N., Kumar, R. K. Behl, A. A. Deubel, A. Geansee, W. Merbach, N. Narula and V. Kumar. 2000. Effect of P solubilizing Azotobacter choococcum on N, P, K uptake in P responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. J. Plant Nut. Soil Sci. 163: 393-398

23-Omar, D.A. 1998. The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. Biotechnol., 14:211-219

24-Pal, S. S. 1998. Interaction of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. Plant Soil. 198:169-177

25-Parks, E.J., Olsen, G.J., Brinckman, F.E. and Baldi, F. 1990. Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. J. Industr. Microbiol. 5:183-190.

26-Rashid. M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F. 2004. Organic Acids production solubilizatio by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pak. J. Biol. Sci. 7:187-196

27-Rodriguez, H. and Frage , R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol .Adv.17: 319-339.

28-Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite – solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust . J. Agric. Res. 9: 778.

29-Tomar, R.K. S. 1997. Effect of phosphate solubilizing bacteria and farmyard manure on the yield of blackgram (*Phaseolus mungo*) . Indian J. Agron. 38:131-133

30-Vassilev, N., M. T. Baca, M. Vassileva, I. Franco and R. Azcon. 1995. Rock phosphate solubilization by Aspergillus niger grown on sugar- beet wastemedium. Appl.Microbiol. Biotechnol. 44:546-549

31-Vazques, P., Holguin, G., Pvente , M. E., Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y. (2000) .Phosphate solubilizing microorganisms associated with rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon . Biol. Fertil. Soils . 30: 460-468.

32-Venkateswarlu, B., Rao, A. V., Raina, P. and Ahmad, N. 1984. Evaluation of phosphate solubilization by microorganisms isolated from aridisols. J Indian . Soc. Soil Sci. 32: 273-277

33-Whitelaw, M. A., T. Y. Harden and G. L. Bender. 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *penicillium radicum* sp. No. Australian Journal of Soil Research, 38:291-300

34-Whitelaw, M. A., Harden, T. J. and Helyar, K. R. (1999). phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus penicillium radicum . Soil Biol. Biochem. 31: 655- 665.

Survey the ability of *flavobacterium sp*.bacteria in solubilization of insoluble phosphate

Rafiei S.[1] and Asadi Rahmani H.[2]

[1]Applied -Scientific Higher Education Institute of Agricultural Jihad, Kashan, I.R. of Iran

[2] Soil and Water Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Rhizosphere is the living habitat for a variety of microorganisms, especially bacteria which may have beneficial, detrimental or neutral effects on plant growth. Rhizosphere beneficial bacteria are commonly called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and have been under researchers focus for many years. PGPRs can stimulate plant growth through different mechanisms. Solubilization of inorganic phosphate is a characteristic has been frequently used for screening these bacteria . *Flavobacterium* has been noted as PGPR in almost all review article as well. In this research forty-four isolates of *Flavobacterium* were isolated from wheat rhizosphere in Iran and their ability for solobilizing inorganic phosphate in solid and broth medium was determined. Results of the phosphate solubilizing in solid medium revealed that twenty-eight isolates were capable to growth in solid medium. Phosphate solubilizing index ranging from 0.24-1.17, 0.15-1.36 and 0.12- 2.73 after 4, 6 and 8 days after inoculation. Isolate F11 was selected as a superior isolate. Thirty-four isolates were capable to solubilizing inorganic phosphate in broth medium. The average rate of P-solublization was 3.54µg/ml, ranging from zero to 37.48. The result showed that F11 was superior isolate.

Key words: *Flavobacterium*, Solubilization of inorganic phosphate, Plant growth promoting rhizobacteria, Rhizosphere