

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: ۸۸۷/۲ تاریخ پذیرش: ۹۰۷/۱۷

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 می‌باشند توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده‌اند. این باکتریها می‌توانند 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 می‌شود. 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 حل‌کنندگی 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_{۱۱} بود. از نظر توانایی جدایه‌ها در استفاده از تری کلسیم فسفات در محیط اسپربر مایع، نتایج نشان داد که ۳۴ جدایه از قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط مایع برخوردار بودند. متوسط میزان حلالیت ۳/۵۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه آن از صفر تا ۳۷/۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. نتایج حاکی از این بود که جدایه F_{۱۱} برترین جدایه از نظر توان حل‌کنندگی 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 نامحلول در محیط جامد و مایع بود.

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

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

مقدمه

نامحلول می‌باشند (۲۷). بنابراین آزاد سازی فسفر از فرمهای نامحلول و تثبیت شده موجود در خاک به منظور افزایش قابلیت فراهمی فسفر برای گیاهان زراعی از اهمیت خاصی برخوردار است. در این میان میکروارگانیسمهای حل‌کننده فسفات (PSM) نقش بسیار مهمی در حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر در خاک ایفا می‌کنند. این انواع شامل انواع مختلفی از میکروارگانیسمهای خاکزی هستند

فسفر یکی از عناصر غذایی پر مصرف مهم می‌باشد که کمبود آن رشد گیاه را به شدت محدود می‌کند. حلالیت فسفر در خاک کم بوده و لذا قسمت اعظم فسفر در خاک به فرم فسفاتهای نامحلول می‌باشد (۳). از طرف دیگر هنگام مصرف کودهای شیمیایی بخش قابل ملاحظه‌ای از فسفر به فرم ترکیبهای نامحلول در خاک تثبیت می‌گردد. لذا خاکهای کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از ذخایر فسفر

انحلال فسفات‌های معدنی در محیط جامد از محیط‌های مختلف مانند اسپربر، پیکوسکایا و RPAM که حاوی ترکیبات نامحلول فسفر مثل تری‌کلسیم فسفات، مونوکلسیم فسفات و آپاتیت هستند استفاده می‌شود (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 هاله‌هایی با قطرهای متفاوت را گزارش نمودند (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 جدایه‌ها بسیار متفاوت بود و ۲۱ جدایه توانایی خود را بعد از دو بار کشت از دست دادند (۱۹). بسیاری از محققین توانایی میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات را در محیط کشت مایع بررسی نموده‌اند. در این‌گونه تحقیقات محققین مقادیر فسفر آزاد شده و متابولیت‌های تولید شده از قبیل اسیدهای آلی توسط میکروارگانیزم‌ها را در محیط کشت ارزیابی کرده‌اند (۲۲ و ۳۳). کاسی و همکاران (۱۹۸۹) و باریوسف و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که حلالیت میکروبی فسفات‌های نامحلول در محیط کشت مایع حاوی این میکروارگانیزم‌ها به دلیل ترشح اسیدهای آلی می‌باشد (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 میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات تعیین و توسط محققین گوناگونی گزارش شده است (۴، ۱۴، ۱۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۴).

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

که ترکیبات نامحلول فسفر را به فرم محلول تبدیل می‌کنند. باکتری‌ها و قارچ‌ها (۳۳) عمده‌ترین میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات در خاک را تشکیل می‌دهند. *Aspergillus* و *Penicillium* از جنس‌های مهم قارچ‌های حل‌کننده فسفات نامحلول و *Bacillus* و *Pseudomonas* از انواع مهم باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشند (۱۵). توان سویه‌های مختلف باکتری‌های خاک برای انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول در گزارشات مختلف مورد اشاره قرار گرفته است. (۱۱). در میان این انواع می‌توان به جنس‌های *Sordomonas*، *Basilus*، *Flavobacterium*، *Microcococcus*، *Antro* باکتر و همچنین جنس‌های مختلف باکتری‌های ریزوبیوم اشاره کرد (۶، ۱۵ و ۲۷). معمولاً جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در ریزوسفر گیاهان در مقایسه با خاک‌های غیرریزوسفری بیشتر می‌باشد (۱۶ و ۲۸). مکانیسم انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول تا حدود زیادی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در تحقیقی وسکوایز و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که فراوانی میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات‌های معدنی نامحلول در ریزوسفر گیاهان بیشتر از خاک غیر ریزوسفری می‌باشد (۳۱). تولید اسیدهای آلی توسط این باکتری‌ها 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 می‌تواند 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 اسیدهای آلی را عامل اصلی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول توسط برخی از باکتری‌های گرم منفی اعلام کرد (۱۲). وسکوایز و همکاران (۲۰۰۰) اولین مرحله در ارزیابی توان حل فسفات معدنی جدایه‌های مختلف باکتری را تشکیل هاله در اطراف کلنی کشت شده روی محیط حاوی ترکیبات فسفات معدنی نامحلول دانسته‌اند (۳۱). به منظور بررسی توان باکتری در

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 نمونه‌ها 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 مولیدات و انادات 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 KH_2PO_4 محاسبه شد (۱).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری توان حل فسفاتهای معدنی توسط جدایه‌های فلاوباکتریوم بر روی محیط کشت جامد اسپربر نشان داد که از ۴۴ سویه مورد استفاده ۱۶ جدایه‌ها توان رشد بر روی این محیط را نداشتند. در مابقی جدایه‌ها (۲۸ جدایه) با گذشت زمان شاخص انحلال فسفاتهای معدنی نامحلول (نسبت قطر هاله به کلنی) افزایش یافت. نتایج نشان داد که اثرات جدایه‌ها در انحلال فسفاتهای نامحلول در هر سه مرحله اندازه‌گیری در محیط جامد در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بین جدایه‌های مورد استفاده از نظر توان حل‌کنندگی فسفر در این محیط اختلاف معنی‌داری 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. odoratum* متعلق به کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب به عنوان جدایه برتر از نظر توان حل فسفات معدنی نامحلول در محیط

قبیل کلسیم، آلومینیوم و آهن تشکیل دهند و بدین طریق باعث آزادسازی 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 جدایه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی FIM کشت شدند. پس از گذشت ۶ روز از نگهداری پلیت‌ها در انکوباتور 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 نامحلول توسط جدایه‌ها در محیط جامد از محیط اطراف کلونی 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 $pH=7/2$ بود. در این آزمون برای هر جدایه باکتری یک پلیت حاوی محیط اسپربر در 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 پارافیلیم 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 اندازه‌گیری گردید و متوسط نسبت هاله به کلونی HD/CD تکرارهای چهارگانه هر جدایه فلاوباکتریوم‌ها محاسبه شد (۱).

به منظور بررسی توان جدایه‌های فلاوباکتریوم‌ها در انحلال فسفاتهای معدنی نامحلول در محیط مایع از محیط

(۱۹۹۹) نیز نشان دادند که جدایه های Gw2103 و Lc1118 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 معادل ۵/۰۴) 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 ($r=-0/93$) 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 ($r=-0/4$) گزارش کردند (۲۶). نتایج کلی این تحقیق نشان داد که از میان باکتریهای مورد مطالعه جدایه های F_2 ، F_3 ، F_7 ، F_8 ، F_{11} ، F_{17} ، F_{18} ، F_{22} ، F_{23} و F_{37} جدایه های برتر از نظر توان آزاد سازی فسفر از تری کلسیم فسفات در محیط مایع و جامد بودند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) و مقایسه میانگینها (جدول ۲)، 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 روز هشتم ($r^{**}=-0/945$) بود. جدایه F_{11} گونه *F. odoratum* 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.

جامد بود. مولا و همکاران (۱۹۸۴) در بررسیهای خود نشان دادند که از ۱۸۴ باکتری ۸۴ جدایه هاله ای به قطر ۱-۱۰ 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 نامحلول در محیط مایع نشان داد که ۳۴ جدایه از توانایی حل کردن تری کلسیم فسفات برخوردار بودند. متوسط میزان فسفر آزاد شده $37/48 \mu\text{g/ml}$ و دامنه آن از ۰ تا $37/48 \mu\text{g/ml}$ متغیر بود. بیشترین مقدار فسفر حل شده مربوط به جدایه F_{11} و معادل $37/48 \mu\text{g/ml}$ 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 $7/5$ تا $22/5 \mu\text{g/ml}$ 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 $78/8$ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت گزارش نمود (۲۹).

در تحقیق حاضر تعداد ۱۰ جدایه به شماره F_2 ، F_{11} ، 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

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر جدایه های مختلف فلاواکتیویوم در حل کنندگی فسفات های معدنی نامحلول در محیط جامد و مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			میزان حلالیت در محیط مایع
		نسبت قطر کل به کلونی (روز چهارم)	نسبت قطر کل به کلونی (روز ششم)	نسبت قطر کل به کلونی (روز هشتم)	
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	۱/۳۴NOPQ	۵/۶۴
F ₂	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۰۰O	۰/۰۰T	۵/۶۰
F ₃	۰/۴۵F	۰/۴۹F	۰/۵۹G	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	۰/۳۱H	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	۰/۰۰O	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	۰/۳۷L	۱/۷۹KLMN	۵/۶۳
F ₁₄	۰/۰۰J	۰/۰۰L	۰/۱۳N	۱/۱۱OPQR	۵/۷۱
F ₁₅	۰/۴۰J	۰/۴۴HG	۰/۵۵IH	۳/۷۸HI	۵/۶۳
F ₁₆	۰/۰۰J	۰/۰۰L	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	۰/۰۰T	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	۰/۳۱H	۰/۳۴I	۰/۴۰K	۲/۱۳K	۵/۸۰
F ₃₀	۰/۲۴۶۶VI	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	۰/۳۹J	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	۰/۰۰O	۰/۴۸ST	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	۰/۰۰T	۵/۶۰

منابع

- ۲-علیخانی، ح. ۱۳۸۲. بررسی پتانسیل کاربرد سویه های بومی ریزوبیومی به عنوان عوامل محرک رشد گیاه (PGPR) و تعیین اثرات تلقیح انواع برتر آنها 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 montmorillonite 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 Fuhrmann, 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 Kuiuack, 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. Horticult.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 choococum* 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 solubilization 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.

Archive SID

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

Rafiei S.¹ and Asadi Rahmani H.²

¹Applied -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 solubilizing 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-solubilization 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