مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره اول (پیاپی ۲۲) بهار ۱۳۹۴
صفحات ۴۶-۳۸

Original Article

# جداسازی باکتری های حل کننده تری کلسیم فسفات از خاک مزارع گندم و جو شهرستان مرودشت

**فاطمه ناصری*[۱]، نیما بهادر [۲]، مجید باصری صالحی[۳]، مهدی کارگر[۴]**

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه میکروب شناسی، [۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

## چکیده

*سابقه و هدف:* بسیاری از میکروارگانیسم های خاک می توانند فسفر غیر قابل دسترس را از طریق فعالیت های متابولیکی با ترشح اسیدهای آلی حل کنند. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های فعال حل کننده تری کلسیم فسفات از خاک مزارع گندم و جو دشت مرودشت انجام شد.

*مواد و روش ها:* این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی خاک ۵۰ مزرعه جو و ۵۰ مزرعه گندم دشت مرودشت انجام گرفت. در ابتدا نمونه های خاک در محیط NRIP حاوی تری کلسیم فسفات (۱۰ درصد) غنی سازی شدند. باکتری های دارای هاله شفاف حل کننده تری کلسیم فسفات با آزمون های بیوشیمیایی، PCR و تعیین توالی شناسایی گردیدند. دو باکتری فعال جداسازی شده از خاک مزارع گندم و جو به منظور بررسی تولید اسید های آلی ترشح شده با روش HPLC آنالیز شدند.

*یافته ها:* از مجموع نمونه های جمع آوری شده، ۹ باکتری (۱۸٪) حل کننده تری کلسیم فسفات از مزرعه جو و ٦ باکتری (۱۲٪) حل کننده تری کلسیم فسفات از مزرعه گندم دشت مرودشت جداسازی گردید. نتایج حاصل از تزریق نمونه های باکتریایی به دستگاه HPLC نشان داد که باکتری های جداسازی شده از مزرعه جو دارای ٤ نوع اسید مختلف با وزن مولکولی پایین و در مزرعه گندم دارای ۳ نوع اسید مختلف می باشند.

*نتیجه گیری:* از آنجایی که در مطالعه حاضر بیشترین و فعال ترین باکتری های حل کننده فسفات از خاک مزارع جو جداسازی شدند می توان دریافت که این باکتری ها بیشتر در خاک های که کود های شیمیایی فسفره مصرف کمتری دارند، گستردگی بیشتری دارند. همچنین غربالگری باکتری های موجود در مزارع مختلف و نیز شناسایی آنها می تواند در تهیه کودهای بیولوژیک و رشد گیاهان منطقه موثر باشد.

*واژگان کلیدی:* مزارع گندم، مزارع جو، تری کلسیم فسفات، انتروباکتریاسه، *16S rRNA*.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۳

## مقدمه

فسفر یکی از مواد غذایی اصلی و ضروری برای گیاهان است که در خاک، فرم های فسفاتیک حاصل خیز کننده را ایجاد می کند (۱). بخش بزرگی از فسفات به صورت آلی محلول در خاک است و به عنوان حاصل خیز کننده از کود شیمیایی فراهم می شود. این فرم در دسترس گیاهان نمی باشد (۲). طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها در تحول فسفر خاک نقش دارند. بنابراین بخش جدایی ناپذیری از چرخه فسفر خاک می باشند (۳). میکروارگانیسم های موثر خاک در آزادی فسفر از منابع آلی و غیر آلی نقش دارند (٤). در حال حاضر هدف اصلی در مدیریت فسفر بهینه سازی محصول و به

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۲۸۲۵۹۸۱ پست الکترونیک: Fatemehnaseri95@gmail.com

حداقل رساندن از دست دادن فسفر خاک می باشد (۵). در سال های اخیر میکروارگانیسم های حل کننده فسفات، به منظور بهبود رشد و عملکرد بهتر گیاه نظر محققان را به خود جلب نموده است (٦). باکتری های ریزوسفر موجب افزایش رشد گیاه می گردند و برای گیاه بسیار مفید می باشند (۷).

توانایی حل کنندگی فسفات نامحلول به وسیله میکروارگانیسم ها به عنوان یکی از مهم ترین صفات برای تغذیه فسفر گیاه مطرح می شود (۸). اثرات منفی زیست محیطی کودهای شیمیایی و افزایش هزینه ها موجب استفاده از باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه در روش های کشاورزی پایدار شده است (۹). تعداد قابل توجهی از گونه های باکتریایی که در ارتباط با ریزوسفر گیاه هستند، قادر به اعمال اثر مفید بر رشد گیاه می باشند. بنابراین استفاده از آن ها به عنوان حاصل خیز کننده یا عوامل کنترل برای بهبود کشاورزی سبب شده است که بسیاری از پژوهشگران سال ها بر روی آن متمرکز شوند (۱۰ و ۱۱).

فسفر به دو فرم فسفات آلی و معدنی در خاک وجود دارد (۳). از آنجایی که بخش بزرگی از فسفر خاک به فرم نامحلول است برای تغذیه گیاه در دسترس نمی باشد. فسفر معدنی در خاک بیشتر در ترکیبات معدنی نامحلول ظاهر می شود (۱۱). این شکل از فسفر توسط گیاه قابل جذب نیست (۱۰). باکتری های حل کننده فسفات به صورت منفرد یا در ترکیب با سایر میکروارگانیسم ها با افزایش اثر بیولوژیک تثبیت نیتروژن موجب افزایش رشد گیاه می شوند (۱۲).

از مهم ترین باکتری های حل کننده فسفات می توان به جنس های *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *آزوسپریلیوم* (*Azospirillum*)، *باسیلوس* (*Bacillus*)، *ریزوبیوم* (*Rhizobium*)، *سراشیا* (*Serattia*)، *آلکالیژنز* (*Alkaligenus*)، *اسینتوباکتر* (*Acintobacter*) و *فلاباکتریوم* (*Flavobacterium*) اشاره نمود (۱۵-۱۳).

افزایش تولید محصولات در گیاهان مختلف در حضور باکتری های افزایش دهنده رشد، در آزمایشگاه و زمین های کشاورزی مورد بررسی قرار گرفته است. به طور کلی پذیرفته شده است که حلالیت معدنی توسط باکتری های حل کننده فسفات وابسته به آزادسازی مولکول های اسید آلی با وزن مولکولی کوچک می باشد. این عمل از طریق گروه های هیدروکسیل و کربوکسیل کلات کانیون های متصل به فسفات و در نتیجه تبدیل آن به فرم محلول انجام می پذیرد (٤) .

باشان (Bashan) و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که استفاده از تلقیح باکتریایی برای کود زیستی سبب افزایش رشد و طویل شدن گیاه، افزایش عملکرد، افزایش میزان فسفات در دسترس گیاه و آزاد شدن اسید استیک ایندول و اسید جیبرلیک می گردد (١٦). جیلانی (Jilani) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که باکتری‌های حل کننده فسفات از دو جنس *باسیلوس* و *سلوموناس* می باشند که موجب افزایش فسفات موجود در خاک و افزایش جذب کل فسفات در گیاه می شوند. باکتری‌های حل کننده فسفات و ریزوبیوم های افزایش دهنده رشد گیاه می‌توانند استفاده از کودهای فسفری را تا ۵۰ درصد کاهش دهند (۱۷). مدنی (Madani) و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که مصرف کودهای بیولوژکی فسفره می تواند در فصل پاییز همزمان با کشت و همچنین در بهار موجب افزایش عملکرد دانه نسبت به شاهد گردد. اما پاسخ گیاهان مختلف به تلقیح میکروبی یکسان نبود(۱۸).

ساریخانی (Sarikhani) و همکاران در سال ۲۰۱۳ دریافتند که شرایط آزمایش مانند نوع گیاه، رقم گیاه، نوع آزمایش گلدانی یا مزرعه ای و حاصل خیزی خاک مورد آزمایش می تواند در کارایی پاسخ گیاه به تلقیح میکروبی مؤثر باشد (۱۹).

هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های حل کننده تری کلسیم فسفات از خاک مزارع گندم و جو شهرستان مرودشت بود.

## مواد و روش ها

*الف) جداسازی باکتری های حل کننده تری کلسیم فسفات:*

این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی خاک ۵۰ مزرعه جو و ۵۰ مزرعه گندم دشت مرودشت انجام گرفت. نمونه های خاک از عمق ۵ تا ۱۵ سانتی متری خاک کنار ریشه گیاهان

جمع آوری و درون ظروف یک بار مصرف استریل به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در ابتدا ۵ گرم از خاک مزارع به ٤۵ میلی لیتر محیط کشت اختصاصی NRIP (National Butanical Reserch Institius Phosphate) حاوی تری کلسیم فسفات (۱۰ درصد) اضافه گردید (۱۵). محیط کشت ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس با ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شدند. در ادامه کلنی های دارای هاله شفاف حل شده تری کلسیم فسفات جداسازی و خالص سازی شدند (۲۰ و ۲۱)

*ب) آزمون های بیوشیمیایی:* باکتری های جداسازی شده به کمک رنگ آمیزی گرم و آزمون های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، ژلاتیناز، سیترات، SIM، Starch، DNase، OF، LD، OD، PD و TSI مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۲).

*ج) واکنش زنجیره پلی مراز (PCR):* در ابتدا باکتری ها در محیط مایع لوریا برتانی براث به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند.

DNA باکتریایی با استفاده از کیت استخراج (DNA DNP، سیناکلون، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای 27F: 5-AGAGTTTGATCGTGGCTCAG-3 و 338R: 5-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3 (سیناکلون، ایران) استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مولار dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/٤ میکرومولار) و ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر BioRad، آمریکا با شرایط واسرشت ابتدایی در دمای ۹٦ درجه سیلیسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۲۳). محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به منظور مشاهده اندازه باندها از دستگاه Gel Documentation استفاده شد. محصولات PCR با اندازه ۳۱۱ جفت باز از روی ژل تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردیدند. در نهایت توالی های به دست آمده در سایت NCBI بلاست شدند و جنس و گونه باکتری ها مشخص گردید.

*د) HPLC (High Performance Liquid Chromatography):* به منظور ارزیابی اسیدهای تولید شده در زمان استفاده از محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات به وسیله میکروارگانیسم، یک نمونه باکتریایی فعال از مزرعه گندم و یک نمونه از مزرعه جو انتخاب گردید. نمونه های دارای غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تری کلسیم فسفات اضافه شدند و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و دور g ۱۲۰ قرار داده شدند. pH محیط ارزیابی گردید. به منظور آنالیز اسیدهای آلی تولید شده، محیط کشت حاوی باکتری از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد.

۲۰ میکرولیتر از فیلتریت به دستگاه HPLC در مجاورت حلال های آب و متانول به نسبت ۲۰: ۸۰ حلال منتقل گردید تا میزان اسیدهای تولید شده ارزیابی گردد (٤). برای دقت بیشتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده دو تزریق به دستگاه انجام شد.

*ه) آنالیز آماری:* توزیع فراوانی باکتری های حل کننده فسفات در دو مزرعه به کمک آنالیز تجزیه واریانس بر اساس آزمون F با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزارهای *SPSS* و *SAS* در سطح ۵٪ انجام گردید. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفت.

## یافته ها

در مجموع ۹ باکتری (۱۸٪) حل کننده تری کلسیم فسفات از مزرعه جو و ٦ باکتری (۱۲٪) حل کننده تری کلسیم فسفات از مزرعه گندم دشت مرودشت جداسازی گردید (جدول ۱).

جدول ۱: باکتری های حل کننده فسفات جداسازی شده از مزارع گندم و جو دشت مرودشت.

| ردیف | جنس و گونه | مکان جداسازی |
|---|---|---|
| ۱ | *الکالیجنس فیکالیس* (*Alcaligenes faecalis* strain IAM12369) | مزرعه گندم کوه سبز |
| ۲ | *انترو باکتر لودجیئی* (*Enterobacter ludwigii* strain : EN-119 = DSMZ 16688 = CIP 108) | مزرعه جو کوه سبز |
| ۳ | *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaenae strain ATCC11296) | مزرعه جو کوه سبز |
| ۴ | *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaenae strain ATCC11296) | مزرعه جو قاسم آباد |
| ۵ | *انتروباکتر کبویی* (*Enterobacter kobei* strain CIP 105566) | مزرعه گندم فالونک |
| ۶ | *گلاسیکلا اگاریلاتیکا* (*Glaciecola agarilytica* strain NO2) | مزرعه جو زرگرون |
| ۷ | *رواتلا پلانتیکولا* (*Raoultella planticola* strain ATCC 33531) | مزرعه جو رامجرد |
| ۸ | *کلبسیلا واریکولا* (*Klebsiella variicola* strain F2R9) | مزرعه جو کوه سبز |
| ۹ | *انتروباکتر کبویی* (*Enterobacter kobei* strain CIP 105566) | مزرعه گندم کوه سبز |
| ۱۰ | *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella neumonia* strain DSM 30104) | مزرعه جو فالونک |
| ۱۱ | *انتروباکتر ائروجینس* (*Enterobacter aerogenes* strain JCM1235) | مزرعه گندم فالونک |
| ۱۲ | *انتروباکتر کلوآکه* (*Enterobacter cloacae* strain279-56) | مزرعه گندم کوه سبز |
| ۱۳ | *انتروباکتر امنیجینوس* (*Enterobacter amnigenus* strain JCM1237) | مزرعه جو قاسم آباد |
| ۱۴ | *انتروباکتر کلوآکه* (*Enterobacter cloacae* subsp. Dissolvens strain LMG 2683) | مزرعه جو فالونک |
| ۱۵ | *کلبسیلا واریکولا* (*Klebsiella variicola* strain F2R9) | مزرعه گندم کوه سبز |

رابطه معنی داری بین تعداد باکتری های حل کننده تری کلسیم فسفات و نوع محصول مزارع گندم و جو مشاهده نگردید (جدول ۲). بیشترین درصد فراوانی باکتری های جداسازی شده در مزارع جو به ترتیب مربوط به روستای کوه سبز (۲۵٪)، روستای فالونک (۲۲٪)، روستای قاسم آباد (۲۰٪)، روستای زرگرون (۱۲/۵٪) و روستای رامجرد (۹٪) بود. همچنین بیشترین درصد فراوانی در مزارع گندم نیز به ترتیب مربوط به روستای کوه سبز (۳۳٪) و روستای فالونک (۲۲٪) بود. هیچ باکتری حل کننده فسفاتی در مزارع گندم واقع در روستاهای زرگرون، رامجرد و قاسم آباد جداسازی نگردید. بیشترین فراوانی باکتری های آزاد کننده فسفات خاک را *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaenae strain ATCC11296) و *انترو باکتر کوبی* (*Enterobacter kobei* strain CIP 105566) تشکیل دادند.

جدول ۲: تجزیه واریانس داده ها در رابطه با تعداد باکتری در مزارع جو و گندم.

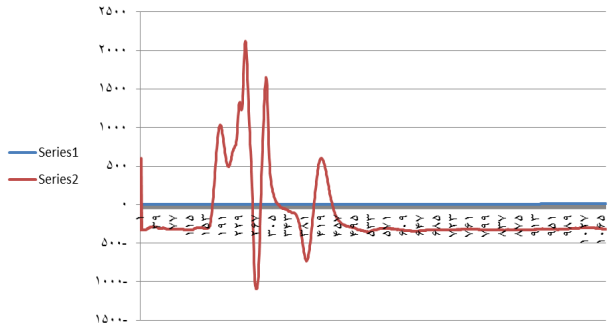
| منابع تغییر | درجات آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | ارزش F | ضریب تغییرات |
|---|---|---|---|---|---|
| مزرعه | ۱ | ۱/۸۰ | ۱/۸۰ | ۰/۵۹ ns | ٪ ٤۲/۵ |
| خطا | ۹۸ | ۲۹۸/۰۱ | ۳/۰٤ | – | |
| کل | ۹۹ | ۲۹۹/۸۱ | – | | |

ns غیرمعنی دار

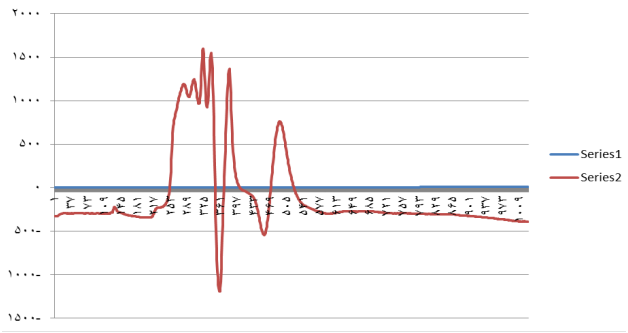
نتایج حاصل از تزریق نمونه ها به دستگاه HPLC بیانگر آن است که نمونه های به دست آمده از مزارع جو و گندم منحنی های تقریباً متفاوتی از خود نشان می دهند. به طوری که منحنی به دست آمده از مزرعه گندم با ۳ پیک بیانگر نوع اسید مختلف می‌باشد (نمودار ۱). همچنین منحنی به دست آمده از نمونه های جو با ٤ پیک، حاکی از حضور ٤ نوع اسید مختلف با وزن مولکولی پایین می باشد (نمودار ۲). با توجه به زمان تولید و از آنجایی که پیک ایجاد شده در بخش انتهایی منحنی ها به یکدیگر شباهت بیشتری دارد، احتمالاً نوع اسید تولیدی یکسان می‌باشد.

## بحث

در این پژوهش ۱۰۰ نمونه خاک از مزارع گندم و جو در شهرستان مرودشت تهیه گردید. بیشترین باکتری های حل کننده فسفات از خاک مزارع جو جداسازی گردید. همچنین تعداد باکتری های کل شمارش شده در هر یک گرم خاک و نیز فعال ترین باکتری در حل کردن تری کلسیم فسفات از مزرعه جو جداسازی شد. با توجه به نتایج به دست آمده می توان دریافت که به دلیل عدم استفاده از کودهای فسفاته در مزارع جو باکتری های حل کننده فسفات به راحتی می توانند فسفات




نمودار ۱: آنالیز HPLC باکتری حل کننده فسفات به دست آمده از مزرعه گندم.




نمودار ۲: آنالیز HPLC باکتری حل کننده فسفات به دست آمده از مزرعه جو.

معدنی شامل تری کلسیم فسفات و دیگر ترکیبات معدنی را آزاد کرده و در اختیار گیاه قرار دهند. اما در مزارع گندم به دلیل اینکه سودآوری و تولید محصول در نظر کشاورزان بیشتر است، استفاده از کودهای فسفاته شیمیایی و دیگر کودهای شیمیایی رواج بیشتری دارند (۱۳). این امر موجب رشد کمتر یا عدم وجود باکتری های آزاد کننده فسفات می گردد.

در پژوهش حاضر با توجه به نتایج HPLC می توان دریافت که تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین باعث آزادسازی فسفات خاک و در نتیجه بهبود رشد گیاه می گردد. واسیلوا (Vassileva) و همکاران در سال ۲۰۱۰، گوتیر (Gautier) و همکاران در سال ۲۰۰۵ و پاراساد (Prasad) در سال ۲۰۱٤ نیز آزادسازی فسفات به وسیله باکتری ها را مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که مولکول های آلی با وزن مولکولی پایین باعث آزادسازی و حل شدن فسفات معدنی می شوند (۱۰، ۲٤ و ۲۵). در تحقیقات چن (Chen) و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشخص گردید که اسید سیتریک، اسید گلوکانیک، اسید لاکتیک و اسید پروپیونیک، مهم ترین اسیدهای آلی جدا شده از محیط کشت باکتریایی هستند که موجب آزادسازی فسفات خاک می شوند (۹).

رودریگز (Rodriguez) و همکاران در سال ۱۹۹۹ با PCR بر روی ژن های فسفاتاز و کلون سازی این ژن ها نشان دادند که علاوه بر مولکول های آلی، اسید فسفاتازها نیز در آزادسازی فسفات خاک نقش دارند (۱۲). بنابراین می توان نتیجه گرفت که با دستکاری های ژنتیکی در باکتری، می توان قدرت حل کنندگی فسفات نامحلول را افزایش و رشد گیاه را بهبود بخشید. مطالعات نشان داده است که بیشترین فراوانی باکتری های آزاد کننده فسفات خاک را باکتری های گرم منفی شامل می شوند. با توجه به نتایج این پژوهش بیشترین باکتری های جداسازی شده *کلبسیلا نمونیه* و انترو باکتر کوبی بودند.

رودریگز (Rodriguez) و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که بیشترین باکتری های حل کننده شامل جنس های *انتروباکتر* (*Enerobacter*)، *سراشیا* (*Serattia*)، *آلکالیژینس* (*Alkaligenus*)، *اسینتو باکتر* (*Acintobacter*) و *فلاباکتریوم* (*Flavobacterium*) بودند (۱۲). این یافته با نتایج پژوهش حاضر هم خوانی دارد.

ماهانتش (Mahantesh) و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی عملکرد کودهای بیولوژیک در تثبیت نیتروژن مولکولی به وسیله باکتری ریزوبیوم و گونه های آزادزی ازتوباکتر نشان دادند که عملکرد بهتر باکتری های تثبیت کننده نیتروژن وابسته به باکتری های آزاد کننده فسفات و فسفات قابل دسترس گیاه می باشد. این موضوع اهمیت باکتری های آزاد کننده فسفات معدنی گیاه را نشان می دهد (۲٦ و ۲۷). بنابراین یکی از روش های بهبود رشد گیاه استفاده از باکتری های آزاد کننده فسفات می باشد.

مدنی (Madani) و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر مصرف کودهای شیمیایی فسفره و باکتری های حل کننده فسفات را در عملکرد دانه کلزا مورد بررسی قرار دادند. یافته های آن ها نشان داد که استفاده از باکتری های حل کننده فسفات موجب تولید بافت

رویشی در مراحل زایشی بذر خواهد شد و اختلاف معنی داری نسبت به استفاده از کودهای شیمیایی دارد (۱۸).

تیموری (Teimoori) و همکاران در سال ۲۰۰٤ در مطالعه ای ۹ جنس و گونه مختلف باکتری های حل کننده فسفات را از خاک های جنگلی جداسازی کردند. در پژوهش آن ها جنس های *انتروباکتر* (*Enterobacter*) و *الکالیژنس* (*Alkaligenus*) جداسازی شد که با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۲۹). قدس علوی (Ghods Alavi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ قدرت انحلال باکتری های حل کننده فسفات را در باکتری های ریزوسفر گیاه سنبل الطیب مورد ارزیابی قرار دادند. بیشترین جنس های جداسازی شده شامل *سودوموناس* و *زانتاموناس* (*Xanthomonase*) بود (۳۰).

در مجموع پیشنهاد می گردد که با جداسازی باکتری های آزاد کننده فسفات از مزارع استان و دیگر استان های کشور و جداسازی فعال ترین آنها با دستکاری های ژنتیکی و کلون سازی ژن های تولید کننده فسفاتازها و اسیدهای آلی، بر فعالیت این باکتری ها افزود و باعث بهبود رشد گیاهان و محصول بیشتر در مزارع شد (۸).

همچنین در کنار باکتری های آزاد کننده فسفات می توان از قارچ هایی مانند *آسپرژیلوس فلاوس* (*Aspergillus flavus*)، *آسپرژیلوس ملوس* (*Aspergillus melleus*) و *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) نیز به عنوان آزاد کننده های فسفات نام برد (۱۷ و ۲٤).

## نتیجه گیری

از آنجایی که در مطالعه حاضر بیشترین و فعال ترین باکتری های حل کننده فسفات از خاک مزارع جو جداسازی شدند می توان دریافت که به دلیل عدم استفاده از کودهای فسفاته در مزارع جو باکتری های حل کننده فسفات به راحتی می توانند فسفات معدنی شامل تری کلسیم فسفات و دیگر ترکیبات معدنی را آزاد کرده و در اختیار گیاه قرار دهند. همچنین غربالگری باکتری های حاضر در مزارع مختلف و نیز شناسایی آنها می تواند در تهیه کودهای بیولوژیک و رشد گیاهان منطقه موثر باشد و به تغذیه سالم مردم منطقه نیز کمک نماید.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References


1. Patil VS. *Bacillus subtilis*: A potential salt tolerant phosphate solubilizing bacterial agent. Int J Life Sc Bt Pharm Res. 2014; 3(2): 242-249.
2. Asuming-Brempong S, Aferi NK. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from tropical soil. GARJAS. 2014; 3(1): 8-15.
3. Sankaralingam S, Harinathan B, Shankar T, Prabhu D, Peer M. Effect of Phosphate solublizing bacteria on growth and development of *Sesbania grandiflora* and *Moringa oleifera*. Sci Agric. 2014; 3 (2): 88-96.
4. Rodrıguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilisation and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant Soil. 2006; 287: 15-21.
5. Hakkim Y, Bae B, Choung YK. Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate_solubilizing microorganism. J Biosci Bioeng. 2005; 99 (1): 23-29.
6. Narveer AV, Harsh K, Chayanika P. In vitro Phosphate solubilization by *Bacillus* sp. NPSBS

3.2.2 obtained from the cotton plant rhizosphere. Biosci Biotech Res Asia. 2014; 11(2): 401-406.

**7.** Luis DPS, Carolina P, Marcela FC. Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. Afr J Microbiol Res. 2014; 8(8): 734-742.

**8.** Poonguzhali S, Munusamy M, Tongmin SA. Isolation and identification of Phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. J Microbiol Biotech. 2008; 18(4): 773-777.

**9.** Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol. 2006; 34: 33-41.

**10.** Prasad MP. Optimisation of fermentation conditions of phosphate solubilising bacteria: a potential biofertilizer. MRJMBS. 2014; 2(2): 31-35.

**11.** Emine O, Ahmet E, Sezai E, Metin T, Fikrettin S. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. HORTSCI. 2006; 11(1): 38-43.

**12.** Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech Adv. 1999; 17: 319-339.

**13.** Lin TF, Huang HI, Shen FT, Young CC. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-Al74. Bioreso Techn. 2006; 97: 957-960.

**14.** Yasmin H, Asghari B. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizoshphere soil of weeds of Khewra salt range and Attock. Pak J Bot. 2011; 43: 1663-1668.

**15.** Susilowati LE, Syekhfani M. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from Pb contaminated soils and their potential for dissolving tricalcium phosphate. JDLM. 2014; 1(2): 57-62.

**16.** Bashan Y, Davis EA, Carrillo A, Linderman RG. Inoculum potential of Mycorrhizal fungi and edaphic factors in relation to the preferential survival and growth of young cacti under the canopy of mesquite trees in a disturbed area of the Sonoran desert. Appl Soil Eco. 1998; 15(5): 24-32.

**17.** Jilani G, Akram A, Ali RM, Hafeez FY, Shamsi IH, Chaudhry AN, Chaudhry AG. Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. Ann Microbiol. 2007; 57: 177-181.

**18.** Madani H, Naderi Borojerdi Gh, Aghajani H, Pazaki A. Comparing the effects of using phosphorus fertilizers and phosphate solubilizing bacteria in the performance of seed, biology and relative content of phosphorus of tissues in autumn Brassica Napus, JAPB. 2004; 6(4): 47-53.

**19.** Sarikhani MR, Aliasgharzad N, Malboobi MA. Improvement of wheat phosphorus nutrition using phosphate solubilizing bacteria. J Soil Managem Sustaina. 2013; 3(1): 39-57.

**20.** Karpagam T, Nagalakshmi PK. Isolation and characterization of Phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. IJCMAS. 2014; 3(3): 601-614.

**21.** Kucey RMN. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Can EJSS. 1983; 63: 671-678.

**22.** Brenner DJ, Krieg NR, Statey JT, editors. Bergie's manual systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; 2005: Part C.

**23.** Natalie DH, Ruth A, Reitzel BS, Roland J, Martens DVM, Noah D, Chon VMD. Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. AJVR. 2005; 8: 1380-1385.

**24.** Vassileva M, Serrano M, Bravo V, Jurado E, Nikolaeva I, Martos V, Vassilev N. Multifunctional properties of phosphate-solubilizin microorganisms grown on agro-industrial wastesin fermentation and soil conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 85: 1287-1299.

**25.** Gautier A, Lopin C, Garipova G, Dubert O, Kalinina I, Salcedo C, Balieu S, Glatigny S, Valnot J, Gouhier, G, Piettre SR. The preparation of new phosphorus-centered functional groups for modified oligonucleotides and other natural phosphates. Molecules. 2005; 10: 1048-1073.

**26.** Mahantesh P, Patil CS. Isolation and biochemical characterization of phosphate solubilizing microbes. IJMRR. 2011; 3(1): 67-70.

**27.** Chakraborty BN, Chakraborty U, Saha A, Sunar K, Dey PL. Evaluation of Phosphate solubilizes from soils of north Bengal and their diversity analysis. WJAS. 2010; 6(2): 195-200.

**28.** Gandhi A, Muralidharan G, Sudhakar E. Isolation and identification of elite phosphate solubilizing bacteria from soil under paddy cultivation. ILNS. 2014; 11(1): 62-68.

**29.** Teimoori M, Karori AA, Matinmi Zadeh SM, Khoshnevis M. Isolation and Identification of Phosphate solubilizing bacteria from Vaz Jungle soil. RCNR. 2004; 65(3): 12-26.

**30.** Ghods Alavi B, Soleimani, M, Ahmad Zad M, Soleimani S. The dissolution of Phosphate and symbiotic efficiency of isolated bacteria from the Rhizosphere of medicinal plant Valeriana officinalis. STGC. 2013; 4(13): 29-35.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 1, April 2015

Original Article

# Isolating tricalcium phosphate solubilizing bacteria from wheat and oat soil in Marvdasht

**Fatemeh Naseri**[1], **Nima Bahador**[2], **Majid Baserisalehi**[3], **Mehdi Kargar**[4]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Kazeroun branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran.
[4]MS.c. Student, Young Researcher's and Elite Club, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: Many soil microorganisms are ale to solve unavailable phosphorus through metabolic activity and secretion of organic acids. This study was aimed to isolate tricalcium phosphate active solubilizing bacteria from wheat and barley farms in Marvdasht Plain.

*Materials & Methods:* This cross-sectional study was conducted on 50 barley and 50 wheat farms in Marvdasht Plain. The soil samples were enriched in NRIP media containing 10 percent tricalcium phosphate. The tricalcium phosphate solubilizing bacteria which produced halos on media were determined through biochemical tests, PCR and sequencing techniques. The activity of two active bacteria isolated from wheat and barley farms were analysed by HPLC method in order to investigate the production of secreted organic acids.

*Results:* Overall 9 (18%) and 6 (12%) of the tricalcium phosphate solubilizing bacteria were isolated from the wheat and barley farms located at Marvdasht, respectively. The HPLC analysis showed that the microorganisms isolated from barely and wheats farms produce 4 and 3 respectively, different low molecular weight acids.

*Conclusion:* Since most of the tricalcium phosphate active solubilizing bacteria were isolated from the barely farms, these bacteria can be found in the soils in which less Phosphorus fertilizers were used. Screening of these bacteria in different farms and their identification can be useful in the production of biologic fertilizers and growth of plants in that area.

*Keywords:* Wheat fields, Oat fields, Tricalcium phosphate, Enterobacteriaceae,*16Sr RNA*.

**Correspondence to**: Fatemeh Naseri

Tel: +989122825981

E-mail: Fatemehnaseri95@gmail.com

Journal of Microbial World 2015, 8(1): 38-46.