نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۳۸۹، ص. ۲۶۱-۲۵۴

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 2, May-Jun 2010, p. 254-261

جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف باکتری فلاوباکتریوم (*Flavobacterim* spp.) از ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران

سمانه رفیعی[1*] - هادی اسدی رحمانی[2]

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۹
تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲

چکیده

در میان باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) توجه زیادی به باکتریهای جنس فلاوباکتریوم و نقش آنها در افزایش رشد و سلامت گیاه شده است. در این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی فلاوباکتریوم از ریزوسفر گندم مناطق مختلف تحت کشت کشور، تعداد ۶۵ نمونه خاک ریزوسفری تهیه شد. طراحی و انتخاب محیط کشت اختصاصی (FIM) جهت جداسازی، کشت و نگهداری فلاوباکتریوم‌ها از بین فرمولاسیون‌های مختلف و متنوعی نظیر ATCC۶۴ ، ۶۵ M_1 ATCC و M_1 Medium که برای این باکتری پیشنهاد شده است انجام گردید. تعداد ۶۱ جدایه منسوب به فلاوباکتریوم با استفاده از محیط کشت اختصاصی (FIM) جداسازی و خالص گردید. شناسایی در حد جنس و گونه با آزمایش‌های میکروسکوپی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام پذیرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که ۵ گونه *F.multivorum*، *F.odoratum*، *F.thalpophilum*، *F.balastinum* و *F.indoltheticum* در ریزوسفر گندم قابل شناسایی بودند. گونه*F.odoratum* بیشترین فراوانی(۷۲ درصد) و گونه‌های *F.balastinum*،*F.thalpophilum* و *F.indoltheticum* کمترین فراوانی(۱/۶ درصد) را در بین گونه‌های جداسازی شده داشتند.

واژه‌های کلیدی : فلاوباکتریوم، PGPR، ریزوسفر، گندم

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی (معمولاً ۳-۱ میلی متری) از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تاثیر فعالیت‌های ریشه نظیر تنفس و ترشحات ریشه ای قرار دارند (۶). در این ناحیه گروه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند که ممکن است برای گیاه میزبان، مفید، مضر و یا بی ضرر باشند (۵). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[3] به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌شود (۸). این باکتری‌ها به دو صورت « مستقیم » یعنی تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم هایی مانند تثبیت نیتروژن مولکولی، ترشح تنظیم کننده‌های رشد و افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول و یا « غیر مستقیم » از طریق تولید سیانیدهیدروژن، سیدروفور، متابولیت‌های ضد قارچ و آنتی بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند. تحریک رشد گیاه توسط باکتری‌های جنس *Flavobacterium*، *Azotobacter*، *Enterobacter*، *Bacillus*، *Arthrobace*، *Clostridium* و *Pseudomonas* گزارش شده است (۵ و ۱۰).

باکتریهای جنس *Flavobacterium* یکی از اعضای جامعه میکروارگانیسم‌های ریزوسفری می‌باشد که مطالعات پراکنده ای در خصوص اثرات مثبت ناشی از تلقیح آنها بر رشد گیاهان مختلف انجام شده است (۸، ۱۶ و ۲۶). فلاوباکتریوم باکتری‌های از خانواده کروموباکتریاسه (خانواده باکتریهای دارای رنگدانه) به شکل باسیل یا کوکوباسیل، گرم منفی، بدون اسپور و غیر متحرک می‌باشند. جدایه‌های ساپروفیت محیطی آن در دمای ۳۰- ۵ درجه سانتی گراد و جدایه‌های بیماری زا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد میکنند. این باکتری‌ها هنگام رشد در محیط جامد رنگدانه‌های زرد تا نارنجی تولید میکنند اما در باکتری‌های این جنس سویه‌های فاقد رنگدانه نیز یافت میشود. در باکتری‌های جنس فلاوباکتریوم طیف رنگ و شدت

۱- مربی مرکز آموزش علمی-کاربردی پردیس کشاورزی، کاشان
(*- نویسنده مسئول: Email: Rafiei1740@gmail.com)
۲- استادیارمرکز تحقیقات خاک و آب، گروه بیولوژی خاک، تهران

3- Plant Growth Promothing Rizobacteria

تشکیل رنگدانه به طور قابل ملاحظه ای تحت تاثیر محیط کشت، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری قرار دارد. تشکیل رنگدانه در این باکتری‌ها در دمای پایین تر از ۲۰-۱۵ درجه سانتی گراد واضح تر بوده و روشنایی روز برای تشکیل حداکثر رنگدانه دراین باکتریها ضروری است. رنگدانه‌های این باکتری غیرکارتنوئید بوده و در برابر نور فرابنفش (۲۵۴nm) غیرفلورسنس میباشند. کلونی این باکتری نیمه شفاف (گاهاً کدر) با قطر۲-۱ میلی متر، محدب، صاف و درخشان با لبه‌های کامل میباشد. فلاوباکتریوم‌ها هوازی و از نظر منبع انرژی و کربن شیمیوارگانوتروف می‌باشند و به فراوانی درخاک یافت میشوند (۱۲ و ۱۳). بیش از ده گونه در این جنس شناخته شده اند که انواع شناخته شده آن شامل جنسهای *F.multivorum*،*F.spiritivorum*،*F.indoltheticum*، *F.mizutahi*،*F.yabuuchiae*،*F.odoratum*،*F.thalpophilum* و *F.balustinum* می‌باشند (۱۲ و ۱۳).

آزمون تولید ایندول گونه‌های فلاوباکتریوم را در دو گروه اصلی A (ایندول مثبت) و B وC (ایندول منفی) قرار می‌دهد (۱۲). گروه A شامل *F.balustinum*، *F. indoltheticum*، *species IIb Flavobacterium* (۱۳) و *F.breve* (۱۳) می‌باشد . گروه B شامل *F.odoratum* و گروه C شامل *F.multivorum* (۱۳)، *F.thalpophilum* (۱۴)، *F.yabuuchiae* و*F.Spiritivorum* (۱۳) و *F. mizutaii* (۱۴) می‌باشد. جهت اطمینان به تفکیک هر چه بیشتر گونه‌های فلاو باکتریوم تاکید بیشتر بر روی تحرک ایزوله‌های آن صورت گرفته است. برجی و همکاران(۱۹۹۴) گونه‌های فلاوباکتریوم را به دو گروه باکتری‌های غیر متحرک با G+C ۴۲-۳۰ درصد و غیر متحرک یا متحرک با فلاژل با درصد G+C ۷۰-۶۳ درصدتقسیم بندی میکنند.

اگرچه در برخی گزارشات از باکتری‌های جنس فلاوباکتریوم به عنوان یک باکتری محرک رشد گیاه یاد شده است (۳) ولی تحقیقات زیادی در خصوص صفات محرک رشد گیاهی این باکتری و تأثیر آن بر رشد و نمو گیاهان صورت نگرفته است.

بر اساس نتایج واسیوک و همکاران (۲۶) باکتریهای جنس فلاو باکتریوم و جنس‌های دیگری مانند آزوسپیریلوم، رودوسپریلوم و باسیلوس‌ها در ریزوسفر غلات و گیاهان علوفه ای وجود دارند. کریچنر و همکاران (۱۷) دلیل افزایش عمکرد گندم و جو تلقیح شده با فلاوباکتریوم را تثبیت نیتروژن، تولید فیتوهورمونها، فعالیت پکتیناز و افزایش جذب عناصر غذایی عنوان کرده اند. این تحقیقات منجر به تولید کود بیولوژیکی به نام Flavobacterin شده است که در سطح وسیعی برای غلات، سبزی و صیفی جات مصرف می‌شود. بلمیوف وهمکاران (۴) نشان دادند که تلقیح گیاهچه‌های کلزا با *Flavobacterium* sp p-4 در حضور یا عدم حضور غلظت‌های بالای کادمیوم سبب افزایش طول ریشه گردید. بر اساس گزارش گیری و پتی (۹) جدایه *Flavobacterium* sp TK_2 برگ پاشی شده در گیاه ذرت باعث ۳۷-۳۰ درصد افزایش عملکرد گردید. پیشچیک و همکاران (۲۳) نشان دادند که جدایه *Flavobacterium* sp L30 باعث افزایش طول ریشه گیاهچه‌های جو و افزایش محصول در خاکهای آلوده به کادمیوم گردید. مطالعات اسپکتروفتومتری و NMR نشان داده است که فلاوباکتریوم قادر به تولید آنتی بیوتیکی بنام Flavocin می‌باشد که مانع از رشد باکتری‌ها و قارچهای پاتوژن می‌شود (۲۵).

این تحقیق با هدف جدا سازی و شناسایی فلاوباکتریومها از ریزوسفر گیاه گندم در مناطق مختلف کشور انجام گردید.

مواد و روش ها

نمونه برداری از خاک ریزوسفری

تعداد ۶۵ نمونه خاک ریزوسفری از مزارع گندم در استانهای تهران، قزوین، زنجان، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان و همدان تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. پراکنش مناسب نمونه‌ها در تمامی استانها رعایت گردید و موقعیت جغرافیایی تمامی نقاط نمونه برداری توسط دستگاه GPS مشخص شد. نمونه‌های مذکور تا انجام آزمایشات مربوط به جداسازی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

طراحی و انتخاب محیط کشت اختصاصی برای جداسازی و کشت فلاوباکتریوم

با توجه به فرمولاسیون‌های مختلف و متنوعی نظیر medium M_1 (عصاره گوشت ۲ گرم در لیتر، پروتئوز پپتون ۵ گرم در لیتر، کلرور سدیم ۳ گرم در لیتر، آگار۱۲ گرم در لیتر)، ATCC M_165 (پتیون ۱ گرم در لیتر، فسفات پتاسیم ۰/۵ گرم در لیتر، کازئین ۲ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم در لیتر، آگار ۱۲ گرم در لیتر) و ATCC 647 (عصاره گوشت ۱۰ گرم در لیتر، پپتون۱۰ گرم در لیتر، کلرور سدیم ۵ گرم در لیتر، آگار ۱۲ گرم در لیتر) که برای جدا سازی و کشت و نگهداری این باکتری پیشنهاد شده است (۲۲) فرمولاسیون جدیدی با نام اختصاصی FIM (*Flovobacterium* Isolation Media) طراحی گردید. اجزاء محیط کشت FIM شامل کازئین هیدرولیز شده (۲ گرم در لیتر)، پروتنوز پتیون (۴ گرم در لیتر)، کلرور سدیم (۳ گرم در لیتر)، عصاره گوشت (۲گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۱گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۰/۵گرم در لیتر)، آگار (۱۸-۱۵ گرم در لیتر) و pH= ۷/۲-۷/۴ بود. این محیط بعد از اتوکلاو شدن در پلیت‌های استریل توزیع و به منظور کشت باکتری در مراحل مختلف تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی باکتری‌های فلاوباکتریوم

در ابتدا از خاک ریزوسفری سری‌های رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی محیط کشت اختصاصی FIM گسترده شد. پس از گذشت ۶ روز از زمان نگهداری پلیت‌ها در انکوباتوربا دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و تحت تابش نور سفید فلورسنت (۳۰۰ nm) نسبت به انتخاب کلنی‌های زرد تا نارنجی، نسبتاً شفاف تا کمی مات با قطر ۲–۱ میلی متر و محدب و براق اقدام گردید. پس از بازکشت این کلنی‌ها بر روی محیط FIM کشت خالص این جدایه‌ها تهیه شد (۱۲و۱۳).

شناسایی جدایه ها

برای شناسایی جنس فلاوباکتریوم از میان جدایه‌های انتخاب شده از آزمون‌های رنگ آمیزی گرم و بررسی مشخصات مرفولوژیک، ایجاد رنگ فلورسنس، کاتالاز، اکسیداز، فسفاتاز، OF و تحرک استفاده شد (۱۲و۱۳).

برای بررسی ایجاد رنگ فلورسنس اقدام به کشت باکتری بر روی محیط کشت kingB گردید (۲۴). پس از رشد باکتری روی محیط کلیه کلنی‌ها با استفاده از لامپ با تابش نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون کاتالاز از روش اضافه کردن محلول H_2O_2 ۳۰ درصد بر روی کلنی‌ها و ظهور حباب‌های اکسیژن به عنوان شاخصی برای انواع کاتالاز مثبت استفاده شد. برای انجام آزمون اکسیداز چند قطره از معرف اکسیداز (محلول یک درصد دی متیل پارا فنیلین دی آمین هیدرو کلراید) بر روی کلنی‌های ریخته شده و تغییر رنگ به سمت قرمز تیره یا سیاه بعنوان اکسیداز مثبت در نظر گرفته شد (۱۹). در آزمون توان تحرک باکتری از محیط نیمه جامد با ترکیب پپتون (۱۰ گرم در لیتر) عصاره گوشت (۳ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۵ گرم در لیتر) و آگار (۰/۴ گرم در لیتر) استفاده گردید. برای انجام این آزمون تحت شرایط سترون به کمک سوزن پلاتین از کشت تازه باکتری مقداری برداشته شد و به طور عمودی در وسط لوله‌های حاوی محیط کشت تلقیح گردید. رشد منحصر به خط تلقیح نشانه غیرمتحرک بودن باکتری می‌باشد (۱). جهت تعیین نوع متابولیسم باکتری (اکسایشی یا تخمیری) از آزمون OF استفاده شد. جهت انجام این آزمون از محیط کشت نیمه جامد Hughand leifsons of based medium استفاده گردید. از محیط تهیه شده به میزان۵ میلی لیتر درون لوله‌های استریل توزیع شد و سپس هر جدایه بوسیله سوزن پلاتینی به محیط نیمه جامد در دو تکرار تلقیح گردید. بر روی یکی از تکرارها پارافین استریل شده به میزان یک میلی لیتر اضافه گردید و لوله‌ها در دمای مناسب نگهداری شدند. معرف موجود در محیط در pH پایین تر از ۶ به رنگ زرد و در pH بالای ۷/۶ به رنگ آبی در می‌آید (۲۴). امکان تولید آنزیم فسفاتاز باکتری آزمون گردید. برای انجام این آزمون از محیط PDP Nutrient Agar استفاده گردید. باکتری با روش لکه گذاری روی سطح محیط کشت تلقیح و به مدت ۵–۳ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. تولید آنزیم فسفاتاز توسط باکتری سبب ایجاد هاله صورتی رنگ در اطراف کلنی می‌شود (۱).

شناسایی گونه‌های فلاوباکتریوم با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک انجام شد. آزمون‌های تولید ایندول، توانایی استفاده از منابع کربوهیدراتی، هیدرولیز اسکولین، توان رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و احیاء نیترات در این رابطه مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمون تولید ایندول از محیط نیمه جامد SIM که حاوی سوبستراهای تریپتوفان و پپتون می‌باشد، استفاده شد. باکتری‌ها به صورت کشت عمقی در محیط تلقیح و سپس نگهداری شدند. ایجاد هاله قرمز رنگ روی محیط پس از اضافه شدن معرف کواکس نشانه مثبت بودن آزمون می‌باشد. از باکتریهای *E.coli* به عنوان شاهد ایندول مثبت و از *Enterobacter sp.* به عنوان شاهد ایندول منفی استفاده شد (۲۱). به منظور سنجش توان باکتری‌ها در استفاده از منابع کربوهیدراتی از آزمون فنل رد استفاده شد. در این آزمون از قندهای ترهالوز، مانیتول و مالتوز استفاده شد. ارزیابی باکتریها بر اساس زرد شدن (فنول رد مثبت) و یا قرمز شدن (فنول رد منفی) رنگ محیط پس از چهار هفته انکوباسیون صورت گرفت (۲۴). در آزمون بایل اسکولین بعد از تلقیح باکتری‌ها به محیط کشت، لوله‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ظهور رنگ تیره در نیمی از آگار مورب بعد از گذشت ۴۸– ۲۴ ساعت به عنوان اسکولین مثبت و در مقادیر کمتر از نصف به عنوان منفی در نظر گرفته شد (۲۴).

به منظور بررسی توانایی رشد سویه‌ها در دمای۴۲ درجه سانتی‌گراد یک لوپ از کشت خالص باکتری به صورت مخطط بر روی محیط کشت FIM کشت و در دمای۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. رشد روزانه باکتری و اندازه و شکل کلونی تا روز دهم مورد بررسی قرارگرفت (۲۱). برای انجام آزمون احیای نیترات از محیط NB استفاده گردید. باکتری‌ها به محیط کشت مایع تلقیح و ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ظهور رنگ صورتی در اثر افزودن معرف نشانه واکنش منفی و در غیر اینصورت مثبت در نظر گرفته شد (۲۱).

نگهداری جدایه‌ها

پس از شناسایی باکتریها و اطمینان از خلوص آنها، یک کلنی خالص از محیط کشت تازه هر باکتری در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت شیبدار NA کشت داده شد. این لوله‌ها به مدت ۲ تا ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از رشد کافی

در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

نتایج و بحث

کشت سری‌های رقت ۶۱ نمونه خاک ریزوسفری بر روی محیط کشت FIM منجر به جداسازی ۲۰۰ جدایه گردید. پس از بازکشت ۲۰۰ جدایه مذکور ۱۸۰ جدایه قادر به رشد بر روی محیط کشت مورد نظر بودند. رشد مناسب کلنی‌ها بر روی محیط کشت FIM نشان از صحت و توان آن برای جدا سازی اختصاصی فلاوباکتریوم دارد. توان باکتری‌های فلاوباکتریوم برای رشد بر روی محیط‌های حاوی کازئین هضم شده و یا ژلاتین هیدرولیز شده که با عصاره مخمر تقویت شده اند توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۲۰). از ۱۸۰ جدایه مورد بررسی ۱۰۰ جدایه از خصوصیات مرفولوژیک و رنگ پذیری مشابه فلاوباکتریوم‌ها برخوردار بودند. پس از کشت و بررسی ۱۰۰ جدایه مورد نظر روی محیط King B مشخص شد که هیچ یک از ایزوله‌ها توانایی ایجاد پیگمان رنگی روی محیط مذکور را نداشتند. نتایج آزمون کاتالاز و اکسیداز ۸۰ درصد از جدایه‌ها مثبت گزارش شد. هیچ یک از جدایه‌ها متحرک نبودند. ۶۱ جدایه قادر به تغییر رنگ و فعالیت متابولیک در لوله‌های آزمون OF حاوی پارافین (شرایط تخمیر) نبودند و لذا این جدایه‌ها بدلیل شباهت فرآیند تنفسی با باکتری‌های فلاوباکتریوم به عنوان جنس فلاوباکتریوم در نظر گرفته شده و برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند (جدول ۱). نتیجه آزمون فسفاتاز در تمامی این ۶۱ ایزوله مثبت گزارش گردید.

به منظور شناسایی گونه‌های فلاوباکتریوم، ۶۱ جدایه محرز از نظر جنس فلاوباکتریوم پس از انجام تست ایندول به دو گروه اصلیA (ایندول مثبت) و گروه B وC (ایندول منفی) تفکیک شدند. از بین ۶۱ باکتری جدایه های $F_{۲۰}$ و $F_{۲۱}$ ایندول مثبت و مابقی جدایه‌ها ایندول منفی بودند. در ارزیابی دو جدایه گروه A مشخص شد که این دو جدایه اسکولین مثبت و ترهالوز منفی بودند. این دو جدایه از نظر توان استفاده از مالتوز نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه $F_{۲۱}$ مالتوز مثبت و از گونه *F.indoltheticom* و جدایه $F_{۲۰}$ فنول مالتوز منفی و متعلق به گونه*F.balastinum* بود. از آزمون احیاء نیترات نیز جهت تایید آزمون مالتوز استفاده شد. جدایه $F_{۲۰}$ قادر به احیا نیترات بود و لذا متعلق به گونه *F.balastinum* و جدایه $F_{۲۱}$ از نظر توان احیا نیترات منفی و از گونه *F.indoltheticom* بود که نتایج حاصله با نتایج به دست آمده از آزمون مالتوز مطابقت داشت.

ارزیابی ۵۹ جدایه گروه B و C در توانایی استفاده از منبع کربوهیدراتی ترهالوز نشان داد جدایه‌های $F_{۱}$، $F_{۶}$، $F_{۷}$، $F_{۳۵}$، $F_{۴۶}$، $F_{۴۷}$، $F_{۴۸}$، $F_{۴۹}$، $F_{۵۰}$، $F_{۵۱}$، $F_{۵۲}$، $F_{۵۳}$، $F_{۵۶}$، $F_{۵۹}$، $F_{۶۰}$، $F_{۶۱}$ مثبت و متعلق به گروه *C* می‌باشند و مابقی جدایه‌ها ترهالوز منفی و متعلق به گروه B و از گونه *F.odoratum* می‌باشند. کلیه جدایه‌های متعلق به گروه C از نظر توان استفاده از مانیتول مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌های $F_{۱}$، $F_{۶}$،$F_{۷}$، $F_{۳۵}$، $F_{۴۶}$، $F_{۴۷}$، $F_{۴۸}$، $F_{۴۹}$، $F_{۵۰}$، $F_{۵۱}$، $F_{۵۲}$، $F_{۵۳}$، $F_{۵۶}$، $F_{۵۹}$، $F_{۶۰}$ مانیتول منفی و جدایه $F_{۶۱}$ مانیتول مثبت بود. آزمون رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد برای جدایه‌های مانیتول منفی انجام شد. نتیجه این آزمون تنها برای ایزوله $F_{۶}$ مثبت گزارش شد که از گونه *F.thalpophilum* بود. مابقی جدایه‌ها که قادر به رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد نبودند از نظر توان احیای نیتریت نیز مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه جدایه‌ها قادر به احیای نیتریت نبوده و متعلق به گونه *F. multivorum* بودند.

(جدول ۱)- نتایج آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های فلاوباکتریوم

شماره باکتری	Colony colour	Morphology	Catalase	Oxidase	Phosphatase	Motility	OF test	Indole	Esculin	Terhalose	Manitol	Maltose	NO_3 reduction	NO_2 reduction	Growth at 42°c	گونه شناسایی شده
F۱	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	F.multivorum
F۲	زرد–نارنجی	BS[1](-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F. Odoratum
F۳	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F. Odoratum
F۴	زرد–نارنجی	BM[2](-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F. Odoratum
F۵	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F. .Odoratum
F۶	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+	F. thalpophilum
F۷	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	F. multivorum
F۸	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F. odoratum
F۹	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F.odoratum
F۱۰	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F.odoratum
F۱۱	نارنجی	BS(-)	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	F.odoratum

1- Small Bacill
2- modrate Bacill

F۱۲	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۳	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۴	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۵	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۶	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۷	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۸	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۱۹	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۰	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−	F.balastinum
F۲۱	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−	F.indoltheticum
F۲۲	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۳	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۴	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۵	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۶	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۷	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۸	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۲۹	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۳۰	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۳۱	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۳۲	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	F.odoratum
F۳۳	زرد	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۳۴	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۳۵	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F .Multivorum*
F۳۶	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۳۷	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۳۸	زرد	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۳۹	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۰	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۱	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۲	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۳	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۴	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۵	زرد–نارنجی	BM(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۴۶	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۴۷	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۴۸	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۴۹	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۰	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۱	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۲	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۳	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۴	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum.*
F۵۵	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum.*
F۵۶	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	*F.multivorum*
F۵۷	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۵۸	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	*F.odoratum*
F۵۹	نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	*F.multivorum.*
F۶۰	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	*F. odoratum*
F۶۱	زرد–نارنجی	BS(-)	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	*F.yabuuchiue* یا *F.spiriuvorum*

در این تحقیق از ۶۱ جدایه محرز جداسازی شده جنس فلاوباکتریوم از ۶۵ نمونه خاک ریزوسفری بیشترین فراوانی مربوط به استان همدان (۷۰/۴) و کمترین فراوانی در استان آذربایجان غربی (بدون جدایه) بود. گزارشات ولاساک وهمکاران (۲۷) نشان داد که جمعیت باکتری‌های محرک رشد گیاه در ریزوسفر گیاهان مناطق مختلف متغیر می‌باشد. واسیوک وهمکاران (۲۶) ضمن تحقیقات خود

نتیجه گرفتند که فلاوباکتریومها در ریزوسفر غلات به ویژه گندم وجود دارند. وجود باکتریهای فلاوباکتریوم در ریزوسفر سایر گیاهان زراعی توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۱۰). بروز صفات محرک رشد گیاه توسط فلاوباکتریوم‌ها توسط محققین به اثبات رسیده است. کریچنر وهمکاران (۱۷) ضمن اشاره به وجود فلاوباکتریوم در ریزوسفر گندم و جو با تلقیح این باکتری افزایش عملکردی معادل ۵۰۰-۳۰۰ کیلو گرم در هکتار در این محصولات را گزارش کردند. نتایج آزمون‌های گلخانه ای سلطانی (۲) نشان داد که برخی جدایه‌های فلاوباکتریوم به لحاظ تأثیر مثبت بر شاخص‌های رشد گندم بهاره میتوانند بعنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه گندم در آزمایشهای مزرعه ای استفاده شوند.

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گونه نشان داد که غالب فلاوباکتریومهای جدا شده از ریزوسفر گندم از گونه *F.odoratum* با فراوانی ۷۲ درصد بودند. این فراوانی می‌تواند به دلیل توان رقابتی بالا و کلونیزاسیون مؤثر این گونه در ریزوسفر گندم در مقایسه با سایر گونه‌ها باشد (۲۶). مطالعات گلخانه ای سلطانی (۲) نشان داد که گیاهان گندم تلقیح شده با *F.odoratum* از نظر میانگین وزن هزار دانه، طول خوشه و ساقه و ریشه، تعداد پنجه و تعداد خوشه با شاهد تلقیح نشده اختلاف معنی داری داشتند. هبار وهمکاران (۱۱) از اندام هوایی آفتابگردان *F.odoratum* را جداسازی کردند. این گونه تأثیر بسیار زیادی بر کنترل بیماری پوسیدگی ریشه آفتابگردان داشت. از بین جدایه‌های این تحقیق ۱۴ جدایه *F. multivorum* بودند که فراوانی ۲۲/۹ درصدی در بین گونه‌های شناسایی شده را داشتند. خالد و همکاران (۱۶) گزارش کردند که *F . multivorum* سبب افزایش رشد طولی ریشه (۱۷/۳درصد) وزن خشک ریشه (۱۳/۵درصد)، رشد قسمت هوایی (۳۷/۷ درصد)، وزن خشک جوانه (۳۶/۳درصد) گیاه گندم شد.

گونه‌های *F.indotheticum*، *F. thalpophilum*، *F.balastinhum* هر کدام با یک ایزوله فراوانی ۱/۶درصد را داشتند. کاتلن و همکاران (۷) با جدا سازی بیش از ۱۰۰۰ جدایه از خاک ریزوسفری و با روش آنالیز اسیدهای چرب متیل استر (FAME)، *F. indotheticum* را شناسایی کردند. این محققین در مطالعات گلخانه ای مشاهده کردند که این گونه سبب افزایش صفات زراعی سویا مانند وزن خشک قسمت هوایی، تعداد و وزن گره گردید.

منابع

۱- باقری خیرآبادی م. ۱۳۷۲. بررسی بیوتیپ‌های باکتری عامل پژمردگی سیب زمینی در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

۲- سلطانی طولارود ع. ۱۳۸۵. جداسازی، شناسایی و بررسی صفات PGP باکتریهای فلاوباکتریوم و سودوموناس های فلورسنت بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

3- Asghar H.N., Zahir Z.A. and Arshad M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of conola (*Brassica napus* L.). Australian Journal of Agricultural Research. 55:187-194.

4- Belimov A.A., Hontazeas N., Safronova V.I., Demchinshaya S.V., Piluzza G., Bulitta S. and Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L.czern.). Soil Biol. Biochem. 37:241-250.

5- Beniziri E., Baudoin E. and Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth–promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology. 11: 557-574.

6- Boven G.D. and Rovina A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth . Advances in Agronomy 66:1-102.

7- Cattelan A.J., Hartel P.G. and Fushrman J.J. 1999. Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth . Soil Sci. Soc. Am. J. 62: 1579-1555.

8- DeBoer S.H. and Copeman R.J. 1974. Endophytic bacteria flora in *Solanum tubersum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis.Can. J. Plant Sci. 54:115-122.

9- Giri S. and Patti B.R. 2004. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated Corynebacterium sp. and Flavobacterium sp. and their potential as biofertilizer. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 51: 47-56.

10- Gray J.K. and Smith F. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria as bio fertilizers. Plant and Soil. 255:571-586.

11- Hebbar, O., Berge, T. and Heulin, S.P. (1991). Bacterial antagonists of Sunflower *(Helianthus annuse L.*) fungal pathogens. Plant and Soil. 133:131-140.

12- Holmes B. 1991. The genera Flavobacterium, sphingobacterium, and weeksella. In; Balows, A., Truper, H., Dworking, M., Hader, W., and Scheifer, K. (eds). The Prokayotes: a hand book on the biology of bacteria, vol. 4, pp: 3620-3627, Spriger-Verlag, New York.

13- Holmes B., Owen R. and McMeekin T. 1984. Genus *Flavobacterium. In:* Krieg, N.R., and Holt, J.G.(eds) Bergys Mannual of Systematic Bacteriology. Vl. pp: 353-361, Williams and wikins, USA.

14- Holmes B. 1983. The taxonomy of the genus *Flavobacterium* . in: Leclerc , H.(ed). Gram –negative bacteria of medical and public health importance: taxonomy – identification – applications.(proceedings of symposium, lille, May 25 to 27, 1983). Les edition INSERM. 114: 273-94.
15- Holt J.G. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
16- Khalid A., Arshad M. and Zahir A.Z. 2004. Screening plant growth- promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology. 96: 473- 480.
17- Kirchner M.J., Wollum A.G. and King L.D. 1993. Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems. Soil. Sci. Soc.Am. J. 57:129-1295.
18- Kloepper J. W. and Schroth M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishs. Proceeding of the International Conference on Plant Phathogenic Bacteria. 2:879-882.
19- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. Nature. 178: 703-708.
20- Krieg N.R. and Holt J.G. 1984. Bergey s Manual Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
21- Lelliott R.A. and Stead D.E. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.Blackwell Scientific Publication, U.K. 215 pp.
22- Mac Faddin J.E. 2000. Biochemical Tests For the Identification of Medical Bacteria. Lippincott Williams & Wilkins. 912pp.
23- Pishchik V.N., Vorobyev N.L., Chernyaeva I.I., Timofeeva S.V., Pleozhemyak V.A., Alexeer Y.V. and Lukin S.M. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. Plant and Soil. 243:173-186.
24- Schaad N.W**.** 2001. Laboratory guide for identification of plant phathogenic bacteria 3rd Ed.APS Press.
25- Shenin Y.D., Kruglikavo L.F., Vassyuk L., Kozhemyakov A.P., Popova T.A. and Tchebotar V.K. 1995.New metabolite with fungistatic activity produced associative nitrogen-fixing bacteria beloning to genus *Flavobacterium* in:Tikhonovich, I.A.,Provorov, N.A., Romanov,V.I. and Newion,W.E. (Eds) . Nitrogen Fixation: Fundamentals and Application.Kluwer Academic Publishers**.**
26- Vassyuk l.F., Popova T.A., Tehebotar V.K. , Kaltchitsky A.E. and Ivanov N.S. 1995 .Assocative diazotrophs of different systematic groups and their effect on productivity of agricultural crops. In:Polsinelli,M.,Materassi,R. And Vincenzini,M.(Eds). Nitrogen Fixation Klower Academic Publichers.
27- Vlassak K., Holmes L.V., Duchatesu L., Vaderleyden J. and De Mot R. 1992. Isolation and characterization of fluorescent Psedomonas associated with the roots of rice and banana growth in Srilanka. Plant and Soil. 145:51-63.

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 2, May-Jun 2010, p. 254-261

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۳۸۹، ص. ۲۶۱-۲۵۴

Isolation and Identification of the Different Species of *Flavobacterium* from the Rhizosphere of Wheat Cultivated in the Different Regions of Iran

S. Rafiee[1*] – H. Asadi Rahmani[2]

Abstract

Among rhizospheric bacteria, great attention has been paid to the group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), and their role in increasing the growth and health of plants. Therefore, it is used largely as inoculum all over the world. The rhizospheric bacterium, which has the genus of *Flavobacterium*, and promotes plants growth, has been studied in recent years. In the present research, 65 samples of rhizospheric soil were taken to isolate *Flavobacterium* from the rhizosphere of wheat cultivated in different regions of Iran. To isolate, cultivate, and preserve *Flavobacterium*, different and diverse formulations such as ATCC 647, 65 ATTC M1, and M_1 Medium, which were recommended for this bacterium, were used for the development of a new specified culture media (FIM). Sixty-one isolates attributed to *Flavobacterium* were isolated and purified using specified culture medium (FIM). The genus and species were identified through microscopic, physiological and biochemical tests. The results obtained from our tests indicated that there are 5 species *F. multivorum, F.odoratum, F. thalpophilum, F.balastinum* and *F. indoltheticum* in the rhizosphere of wheat. Among the isolated species, *F.odoratum* showed the most frequency (72 percent), and the *F. thalpophilum* and *F. balastinum* and *F. indoltheticum* possessed the least frequency (1.6 percent).

Keywords: Flavobacterium, PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), Rhizosphere, Wheat

1- InstructorScientific and Practical Center of Agriculture, Education Pardise, Kashan
(* - Corresponding author Email: Rafiei1740@gmail.com)
2- Assistnt prof., Research Institute of Soil and Water, Soil Biology Group. Tehran