بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

گرایش میکروبیولوژی

عنوان:

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از منابع محیطی

استاد راهنما:

دکترحسین معتمدی

اساتید مشاور:

دکتر حسین نجف زاده ورزی

دکترمحمد محمدی

نگارنده:

شعله عالی‌وند

شهریور ۹۳

"به نام خداوند علم و قلم"

سپاس و ستایش کردگار یکتایی که ذات بیکرانش آکنده از علم و دانش است، او که به بشر آموخت بیاموزد و بیاموزاند تا به سر انگشت معرفت، پرده از اسرار هستی بردارد و با روشنایی دانش، از ظلمت جهل و نادانی رهایی یابد، اکنون با استعانت از درگاه ایزد منان گامی دیگر از زندگیم را پشت سر نهادم با خضوع و فروتنی تمام بر خود واجب می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی خود را تقدیم کسانی کنم که طی این مدت مرا یاری دادند.

از پدر و مادر عزیزم که در طول تمام مراحل زندگی یاور و پشتیبانم بودند، آنانکه وجود پر از مهرشان و گرمی نگاهشان سرمایه‌های جاودان زندگی‌ام است، صمیمانه تشکر می‌کنم و خواهران و برادران عزیزم که همیشه خالصانه محبت‌شان را نثارم کردند، زندگی سرشار از آرامش را از درگاه خداوند متعال برایشان آرزو دارم.

از استاد ارجمند، جناب آقای دکتر حسین معتمدی که راهنما و روشنگر اصلی من در انجام این پژوهش بودند، جناب آقای دکتر حسین نجف‌زاده ورزی و جناب آقای دکتر محمد محمدی که در سمت مشاور بهره فراوان از راهنمایی‌هایشان برده‌ام و اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر محمد رعایایی اردکانی و جناب آقای دکتر محمد شفیعی که زحمت داوری پایان‌نامه را عهده‌دار شدند، کمال قدردانی و سپاس را دارم. سپاسگذارم از مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی جناب آقای دکتر سید منصور سیدنژاد که شاگردی ایشان افتخار من است. یک دنیا سپاس از "سرکار خانم تریکان" کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی و "سرکار خانم کیانی" کارشناس محترم آزمایشگاه فارماکولوژی که در مسیر انجام پژوهش مرا یاری نمودند.

سپاسگذارم از دوستان بسیار عزیزم، گل‌تاج موسایی،فاطمه محمودصالح، ندا حقیقت‌خواه، سولماز رفیعی، اعظم فروزان، مهدیه صانعی، مریم جاسم‌پور، آمنه بختیاری، کبری بویری، مریم ابراهیمیان، ندا مهرآور، مریم منادی، فاطمه یعقوب‌زاده، مرضیه جلالی، هومان احسنی و امیرتاج بخش و تمام کسانی که حتی برای لحظه‌ای یاور من در اتمام این رساله بودند.

شعله عالی‌وند

تابستان ۹۳

تقدیم به

پدرم

که دیگر نیست

و تنها افسوس من در لحظه لحظه عمرم

نبود اوست

و

مادرم

که تنها چیزی که از او دیدم

عشق بود و

مهربانی و صبوری ...

چکیده

نام خانوادگی : عالی‌وند	**نام:** شعله	**شماره دانشجویی:** ۹۰۳۴۲۰۷
عنوان پایان نامه : جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از منابع محیطی		
استاد راهنما: دکتر حسین معتمدی		
استاد مشاور: دکتر حسین نجف‌زاده ورزی و دکتر محمد محمدی		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته:** زیست شناسی	**گرایش:** میکروبیولوژی
دانشگاه : شهید چمران اهواز	**دانشکده:** علوم	**گروه :** زیست شناسی
تاریخ فارغ التحصیلی : ۹۳/۶/۳۰		**تعداد صفحه: ۱۳۶**

کلید واژه ها : باکتری‌های حل‌کننده فسفات، ریزوسفر، کودهای بیولوژیک، بهینه‌سازی

فسفر بعد از نیتروژن عنصر محدودکننده‌ی رشد گیاهان است و مقادیر قابل دسترس آن در خاک اندک می‌باشد. کودهای فسفاته بعد از استفاده به سرعت در نتیجه واکنش با کاتیون‌های Ca یا Mg در خاک‌های آهکی و Al یا Fe در خاک‌های اسیدی در محل مصرف تثبیت و از دسترس خارج می‌گردند. یکی از راه‌های تأمین فسفر موردنیاز گیاهان بهره‌گیری از توان زیستی خاک و استفاده از باکتری-های حل کننده فسفات می‌باشد. این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف مانند تولید و ترشح اسیدهای آلی و معدنی و ترشح آنزیم فسفاتاز باعث انحلال فسفات‌های معدنی و هیدرولیز فسفات‌های آلی می‌شوند. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های حل-کننده فسفات از منابع محیطی است. برای این منظور نمونه‌هایی از مزارع گندم، جو، باقلا، کلم، لوبیا، آفتابگردان، شبدر، سیر و حوضچه نمک جمع‌آوری شد. بعد از انجام مرحله غنی‌سازی و کشت در محیط اختصاصی دارای تری‌کلسیم‌فسفات به عنوان تنها منبع فسفات نامحلول، ۱۰۰ باکتری دارای هاله جداسازی شد. سپس با تعیین شاخص و راندمان حل‌کنندگی‌فسفات در جدایه‌ها، ۲۷ جدایه برتر انتخاب شدند. میزان فسفر آزاد شده در محیط اختصاصی مایع با استفاده از روش رنگ سنجی آسکوربیک‌اسید تعیین شد. از این۲۷ جدایه، ۴ جدایه که بیشترین توان حل‌کنندگی را داشتند، انتخاب شدند. قابلیت تثبیت نیتروژن، تولید هورمون اکسین و تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه‌ها بررسی شد. منحنی رشد چهار جدایه در مقادیر مختلف دما و pH رسم شد. همچنین اثر فاکتورهای pH، دما، منابع مختلف کربن و نیتروژن و دوره انکوباسیون بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط چهار جدایه بررسی شد. این جدایه‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تعیین سکانس ژن 16S rRNA تعیین هویت شدند. در نتیجه این تحقیق، چهار جدایه که بیشترین میزان حل‌کنندگی را داشتند متعلق به گونه‌های *Raoultella terrigenia*، *Pseudomonas protegens*، *Pseudomonas fluorescens* و *Enterobacter cloacae* تشخیص داده شدند. شرایط بهینه برای حل‌کنندگی فسفات برای جدایه *Raoultella terrigenia* عبارت بودند از: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۵، عصاره‌مخمر-آمونیوم‌سولفات و گلوکز به عنوان منبع نیتروژن و کربن در روز پنجم انکوباسیون ، برای جدایه *Peudomonas fluorescens* عبارت بودند از: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۵، اوره و گلوکز به عنوان منبع نیتروژن و کربن در روز سوم انکوباسیون، برای جدایه *Peudomonas protegens* عبارت بودند از: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷، اوره و گلوکز به عنوان منبع نیتروژن و کربن در روز پنجم انکوباسیون و برای جدایه *Enterobacter cloacae* دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۷، عصاره‌مخمر-آمونیوم‌سولفات و گلوکز به عنوان منبع نیتروژن و کربن در روز پنجم انکوباسیون. براساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که باکتری‌های جداسازی شده قابلیت مناسبی در حل‌کنندگی فسفات دارند و می‌توان از آنها در جهت تولید کودهای بیولوژیک و اهداف صنعتی مانند استخراج زیستی فسفر از سنگ فسفات استفاده کرد.

عنوان	فهرست مطالب	صفحه

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- اهداف تحقیق ۴

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- فسفر ۶

۲-۱-۱- تاریخچه کشف فسفر ۶

۲-۱-۲- اشکال مختلف فسفر در طبیعت ۷

۲-۱-۲-۱- فسفر معدنی ۷

۲-۱-۲-۲- فسفر آلی ۸

۲-۱-۳- فسفات در ایران ۹

۲-۱-۳-۱- منابع و ذخایر فسفات آذرین ایران ۱۰

۲-۱-۳-۲- منابع و ذخایر سنگ فسفات رسوبی ایران ۱۰

۲-۱-۴- اهمیت فسفر ۱۰

۲-۱-۵- دسترسی فسفر در خاک ۱۱

۲-۱-۶- فسفر در گیاه ۱۲

۲-۲- کودهای شیمیایی فسفاته ۱۳

۲-۲-۱- معروف‌ترین کودهای شیمیایی فسفاته ۱۳

۲-۲-۱-۱- سوپرفسفات‌ها ۱۳

۲-۲-۱-۲- مونوآمونیوم‌فسفات ۱۴
۲-۲-۱-۳- دی‌آمونیوم‌فسفات ۱۴
۲-۲-۲- اثرات مصرف کودهای شیمیایی فسفاته ۱۴
۲-۳- کودهای زیستی ۱۵
۲-۳-۱- تاریخچه و موقعیت کاربرد کوهای بیولوژیک در جهان و ایران ۱۶
۲-۳-۲-ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور ۱۷
۲-۳-۳- مزایای کودهای بیولوژیک ۱۷
۲-۳-۴- مشکلات استفاده از کودهای بیولوژیک ۱۸
۲-۴- ریزوسفر ۱۹
۲-۴-۱- میکروارگانیسم‌های ریزوسفر ۱۹
۲-۴-۲- باکتری‌های افزاینده رشد گیاه ۲۰
۲-۴-۲-۱- عملکرد فعالیت PGPR ۲۱
۲-۵- میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات ۲۲
۲-۵-۱- باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۲۴
۲-۵-۲- اکتینومیست‌های حل‌کننده فسفات ۲۵
۲-۵-۳- قارچ‌های حل‌کننده فسفات ۲۵
۲-۵-۴- اهمیت میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات ۲۵
۲-۵-۵- رفتاربیولوژیکی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۲۶
۲-۵-۶- بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات ۲۷

۲-۵-۷- باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفات معدنی ۲۸
۲-۵-۸- باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفات آلی ۳۰
۲-۵-۹- مکانیسم عمل میکروارگانیسم‌های حل‌کننده‌ی فسفات ۳۲
۲-۵-۱۰- تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر افزایش بازده محصولات ۳۵
۲-۶- بهینه‌سازی ۳۷
۲-۷- مروری بر مطالعات دیگران ۳۸

فصل سوم: مواد و روش کار

۳-۱- مواد و وسایل ۴۵
۳-۱-۱- مواد مصرفی ۴۵
۳-۱-۲- وسایل و تجهیزات ۴۸
۳-۲- محیط‌های کشت، معرف‌ها و رنگ‌ها ۵۰
۳-۲-۱- محیط کشت‌های مورد استفاده ۵۰
۳-۲-۱-۱- محیط کشت غربال‌گری باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۵۰
۳-۲-۱-۲- محیط کشت Modified Pikovskaya's agar ۵۱
۳-۲-۱-۳- محیط کشت غربال‌گری باکتری‌های تولید کننده هورمون اکسین ۵۱
۳-۲-۱-۴- محیط کشت غربال‌گری باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن ۵۱
۳-۲-۱-۵- محیط کشت مورد استفاده برای غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۵۲
۳-۲-۲- روش تهیه رنگ‌ها، بافرها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ۵۳
۳-۲-۲-۱- تهیه معرف رنگی آسکوربیک اسید ۵۳

۳-۲-۲-۲- محلول آمونیوم مولیبدات ۵۳
۳-۲-۲-۳- محلول آنتی‌مونیل‌پتاسیم‌تارترات ۵۳
۳-۲-۳-۴- روش تهیه محلول سوبسترا مورد استفاده در سنجش آنزیمی ۵۳
۳-۲-۳-۵- روش تهیه بافر مورد استفاده در سنجش آنزیم فیتاز ۵۴
۳-۲-۳-۶- روش تهیه معرف رنگی مولیبدات ۵۴
۳-۲-۳-۷- محلول آمونیوم‌مولیبدات ۵۴
۳-۲-۳-۸- محلول آمونیوم‌وانادات ۵۴
۳-۲-۳-۹- معرف سالکوفسکی ۵۴
۳-۲-۳-۱۰- تهیه فازهای متحرک مورد استفاده در کروماتوگرافی لایه نازک ۵۵
۳-۲-۳-۱۱- تهیه آشکارسازی‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی لایه نازک ۵۵
۳-۲-۳-۱۲- تهیه رنگ کریستال ویوله ۵۵
۳-۲-۳-۱۳- تهیه محلول رنگی سافرانین ۵۶
۳-۲-۳-۱۴- تهیه محلول لوگل ۵۶
۳-۲-۳-۱۵- تهیه بافر TAE (5x) ۵۶
۳-۲-۳-۱۶- تهیه ژل آگارز یک درصد ۵۶
۳-۳- روش کار ۵۷
۳-۳-۱- نمونه‌برداری ۵۷
۳-۳-۲- غنی‌سازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۵۹
۳-۳-۳- جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۵۹

۳-۳-۴- تعیین شاخص (SI) و راندمان (PSE) حل‌کنندگی فسفات در سویه‌های جدا شده ۵۹
۳-۳-۵- تعیین میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۰
۳-۳-۵-۱- رسم منحنی استاندارد با KH_2PO_4 ..... ۶۰
۳-۳-۵-۲- روش سنجش فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۱
۳-۳-۵-۳- محاسبه فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۱
۳-۳-۶- اندازگیری تغییرات pH ۶۲
۳-۳-۷- بررسی قابلیت تثبیت‌کنندگی نیتروژن در جدایه‌ها ۶۲
۳-۳-۸- بررسی کیفی قابلیت تولید هورمون اکسین در جدایه‌ها ۶۲
۳-۳-۹- بررسی قابلیت تولید آنزیم فیتاز در جدایه‌ها ۶۲
۳-۳-۹-۱- روش سنجش آنزیم فیتاز ۶۳
۳-۳-۹-۲- محاسبه فعالیت آنزیم ۶۴
۳-۳-۱۰- بررسی تولید اسیدآلی توسط جدایه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک ۶۴
۳-۳-۱۰-۱- آماده سازی نمونه ۶۴
۳-۳-۱۰-۲- کاشت مستقیم نمونه بر روی صفحات کروماتوگرافی ۶۵
۳-۳-۱۰-۳- گسترش حلال ۶۵
۳-۳-۱۰-۴- آشکارسازی ۶۵
۳-۴- بهینه‌سازی ۶۶
۳-۴-۱- بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری ۶۶
۳-۴-۲- بهینه‌سازی شرایط حل‌کنندگی فسفات توسط جدایه‌های برتر ۶۶

۳-۴-۲-۱- آماده‌سازی مایه تلقیح ۶۷
۳-۴-۲-۲- اثر گرماگذاری بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۷
۳-۴-۲-۳- اثر pH بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۷
۳-۴-۲-۴- اثر منابع مختلف کربن بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۸
۳-۴-۲-۵- اثر منابع مختلف نیتروژن بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۸
۳-۴-۲-۶- اثر دوره انکوباسیون بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۶۸
۳-۵- نگه‌داری جدایه‌ها ۶۸
۳-۵-۱- نگه‌داری کوتاه مدت جدایه‌ها ۶۸
۳-۵-۲- نگه‌داری بلندمدت جدایه‌ها ۶۹
۳-۶- شناسایی جدایه‌های باکتری ۶۹
۳-۶-۱- شناسایی مولکولی ۶۹
۳-۶-۱-۱- استخراج DNA از باکتری با استفاده از کیت شرکت سیناژن ۶۹
۳-۶-۱-۲- بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده ۷۰
۳-۶-۱-۳- انتخاب پرایمرها ۷۰
۳-۶-۱-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۷۱
۳-۶-۱-۵- ترکیبات مخلوط و برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۷۱
۳-۶-۱-۶- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز ۷۳
۳-۶-۱-۷- تعیین توالی ژنوم 16S rRNA ۷۳
۳-۶-۲- شناسایی فنوتیپی ۷۳

۳-۶-۲-۱- مورفولوژی ۷۳

۳-۶-۲-۲- تست‌های بیوشیمیایی ۷۴

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- جداسازی و شناسایی باکتری‌ها ۷۶

۴-۲- تعیین شاخص(SI) و راندمان (PSE) حل‌کنندگی فسفات در جدایه‌ها ۷۸

۴-۳- گروه‌بندی جدایه‌ها براساس راندمان حل‌کنندگی فسفات ۸۰

۴-۴- رسم منحنی استاندارد با KH_2PO_4 ..... ۸۱

۴-۵- بررسی میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات و تعیین بهترین جدایه‌ها ۸۱

۴-۶- بررسی قابلیت تثبیت‌کنندگی نیتروژن در جدایه‌ها ۸۳

۴-۷- بررسی کیفی قابلیت تولید هورمون اکسین در جدایه‌ها ۸۴

۴-۸- بررسی قابلیت تولید آنزیم فیتاز در جدایه‌ها ۸۵

۴-۹- بررسی تولید اسیدآلی توسط جدایه‌ها ۸۶

۴-۱۰- رسم منحنی رشد جدایه‌های SF33، RW14، C322 و RK33 در محیط نوترینت براث برای تعیین دمای بهینه رشد ۸۷

۴-۱۱- رسم منحنی رشد جدایه‌های SF33، RW14، C322 و RK33 در محیط نوترینت براث برای تعیین pHبهینه رشد ۸۹

۴-۱۲- تأثیر دماهای مختلف بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۴ جدایه SF33، RW14، C322 و RK33 ۹۲

۴-۱۳- تأثیر pH بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۴ جدایه SF33، RW14، C322 و RK33 ..... ۹۳

۴-۱۴- تأثیر منابع مختلف کربن بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۴ جدایه SF33، RW14، C322 و RK33 ..... ۹۴

۴-۱۵- تأثیر منابع مختلف نیتروژن بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۴ جدایه SF33، RW14، C322 و RK33 ۹۵

۴-۱۶- تأثیر دوره انکوباسیون بر میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۴ جدایه SF33، RW14، C322 و RK33 ۹۶

۴-۱۷- شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۹۷

۴-۱۷-۱- شناسایی براساس تست بیوشیمیایی ۹۷

۴-۱۷-۲- شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های RK33، SF33، C322 و RW14 ۹۸

۴-۱۷-۲-۱- بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده ۹۸

۴-۱۷-۲-۲- نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تعیین توالی ۹۸

۴-۱۷-۳- شناسایی ۲۳ جدایه‌ی حل‌کننده فسفات دیگر براساس تست‌های بیوشیمیایی ۱۰۵

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱- بحث ۱۰۹

۵-۲- نتیجه‌گیری نهایی ۱۲۱

پیشنهادات ۱۲۲

منابع ۱۲۴

عنوان	فهرست جداول	صفحه

جدول ۲-۱- منابع فسفر معدنی در خاک ۸

جدول ۲-۲- باکتری‌های افزاینده رشد گیاهان ۲۰

جدول ۲-۳- میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات ۲۳

جدول ۲-۴- باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۲۴

جدول ۲-۵- باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی ۲۸

جدول ۲-۶- فعالیت حل‌کنندگی فسفات (میکروگرم در لیتر) برخی گونه‌ها از سوبستراهای مختلف ۳۰

جدول ۲-۷- باکتری‌های معدنی‌کننده فسفات ۳۲

جدول ۳-۱- مواد استفاده شده در این تحقیق ۴۵

جدول ۳-۲- محیط‌های کشت استفاده شده ۴۸

جدول ۳-۳- وسایل و تجهیزات استفاده شده ۴۸

جدول ۳-۴- محتویات محیط کشت مورداستفاده برای غربال‌گری باکتری‌های حل‌کننده فسفات ۵۰

جدول ۳-۵- محتویات محیط کشت مورداستفاده برای غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده اکسین ۵۱

جدول ۳-۶- محتویات محیط کشت مورداستفاده برای غربال‌گری باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن ۵۲

جدول ۳-۷- محتویات محیط کشت مورداستفاده برای غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۵۲

جدول ۳-۸- محل‌های مورد استفاده برای نمونه‌برداری ۵۸

جدول۳-۹- پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۷۱

جدول۳-۱۰- اجزا و مقادیر مطلوب در مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۷۲

جدول۳-۱۱- برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۷۲

جدول ۴-۱- نتیجه مقایسه شاخص و راندمان حل‌کنندگی فسفات در جدایه‌ها ۷۸

جدول ۴-۲- گروه‌بندی جدایه‌های حل‌کننده فسفات براساس راندمان حل‌کنندگی فسفات ۸۰

جدول۴-۳- نتیجه مقایسه فعالیت حل‌کنندگی فسفات ۲۷ جدایه ۸۲

جدول۴-۴- نتیجه مقایسه سنجش کمی آنزیم فیتاز ۸۵

جدول ۴-۵- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های حل‌کننده فسفات ۹۷

جدول۴-۶- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های حل‌کننده فسفات ۱۰۶

عنوان	فهرست شکل‌ها	صفحه

شکل ۲-۱- طرح شماتیک از تأثیر باکتری‌ها بر چرخه فسفات ۳۵

شکل ۲-۲- مکانیسم تحریک رشد گیاهان به‌وسیله میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات ۳۷

شکل ۳-۱- نمونه‌برداری از ریزوسفر مزرعه ۵۸

شکل ۴-۱- تشکیل هاله توسط جدایه حل‌کننده فسفات ۷۶

شکل ۴-۲- الف)تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی ب)هاله زردرنگ در اطراف کلنی در پاسخ به تولید اسید ۸۰

شکل ۴-۳- تصویر حل‌کنندگی تری‌کلسیم‌فسفات توسط جدایه C322 ..... ۸۳

شکل ۴-۴- الف)محیط دوبرینر فاقد نیتروژن ب)به دلیل حضور فعالیت اسیدی تغییر رنگ محیط از سبز به زرد ۸۴

شکل ۴-۵- مشاهده هاله صورتی در اطراف کلنی به دلیل تولید هورمون اکسین ۸۴

شکل ۴-۶- کروماتوگرافی لایه نازک ۸۶

شکل ۴-۷- کیفیت استخراج DNA ۹۸

شکل ۴-۸- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۹۹

شکل ۴-۹- نتیجه Blast جدایه RK33 ..... ۱۰۰

شکل ۴-۱۰- نتیجه Blast جدایه SF33 ..... ۱۰۰

شکل ۴-۱۱- نتیجه Blast جدایه C322 ..... ۱۰۱

شکل ۴-۱۲- نتیجه Blast جدایه RW14 ..... ۱۰۱

شکل ۴-۱۳- درخت فیلوژنتیکی سویه *Raoultella terrigenia* strain RK33 ..... ۱۰۲

شکل ۴-۱۴- درخت فیلوژنتیکی سویه *Pseudomonas protegens* strain SF33 ..... ۱۰۳

شکل ۴-۱۵- درخت فیلوژنتیکی سویه *Enterobacter cloacae* strain C322 ..... ۱۰۴

شکل ۴-۱۶- درخت فیلوژنتیکی سویه *psudomonas flourescens* strain RW14 ..... ۱۰۵

عنوان	فهرست نمودارها	صفحه

نمودار ۴-۱- منحنی استاندارد فسفات ۸۱

نمودار ۴-۲- منحنی رشد جدایه SF33 در دماهای مختلف ۸۷

نمودار ۴-۳- منحنی رشد جدایه RW14 در دماهای مختلف ۸۸

نمودار ۴-۴- منحنی رشد جدایه C322 در دماهای مختلف ۸۸

نمودار ۴-۵- منحنی رشد جدایه RK33 در دماهای مختلف ۸۹

نمودار ۴-۶- منحنی رشد جدایه SF33 در pHهای مختلف ۹۰

نمودار ۴-۷- منحنی رشد جدایه RW14 در pHهای مختلف ۹۰

نمودار ۴-۸- منحنی رشد جدایه C322 در pHهای مختلف ۹۱

نمودار ۴-۹- منحنی رشد جدایه RK33 در pHهای مختلف ۹۱

نمودار ۴-۱۰- میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط ۴ جدایه در دماهای مختلف ۹۲

نمودار ۴-۱۱- میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط ۴ جدایه در سه pH مختلف ۹۳

نمودار ۴-۱۲- میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط ۴ جدایه درحضور منابع مختلف کربن ۹۴

نمودار ۴-۱۳- میزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط ۴ جدایه در حضور منابع مختلف نیتروژن ۹۵

نمودار ۴-۱۴- اثر دوره انکوباسیون برمیزان فعالیت حل‌کنندگی فسفات توسط ۴ جدایه ۹۶

فصل اول

مقدمه و هدف