Evaluation of some solid and liquid media to screening local bacterial isolates for solubilizing inorganinc phosphate

تقييم كفاءة بعض من الاوساط الزرعية الصلبة والسائلة في غربلة عزلات بكتيرية محلية مذيبة للفوسفات اللاعضوي

خلود عبد الاله محمد وصفاء عبد الرحيم محمود ومحمد عبد الرحيم محمود وحازم جاسم عبد الوهاب

قسم الاحياء المجهرية التطبيقية/ مركز التقانات الغذائية والاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة:

يهدف البحث الحالي الى تحديد كفاءة عدد من الاوساط الزرعية الصلبة والسائلة في قابليتها على غربلة وانتخاب عدد من العزلات البكتيرية المحلية لاذابة الفوسفات اللاعضوي. تمت غربلة 60 عزلة بكتيرية مختلفة لقابليتها على اذابة الفوسفات اللاعضوية وباستخدام خمس اوساط زرعية صلبة مختلفة، وقد أظهرت النتائج وجود اختلافات من حيث كفاءة العزلات البكتيرية على اذابة الفوسفات اللاعضوية حيث تبين ان 50% من العزلات البكتيرية تعطي هالة شفافة مقاسة على الوسط AYG الصلب خلال 72 ساعة بينما انخفضت النسبة المئوية للعزلات المذيبة للفوسفات على الاوساط الصلبة الاخرى حيث اعطى وسط بيكوفيسكايا PVK نسبة 26% ووسط NBRIYP نسبة 20% ونسبة 13% لوسط NBRIY. لم يلاحظ تغيير في عدد العزلات المذيبة للفوسفات عند اضافة صبغة البروموفينول الزرقاء بينما ادت الى وضوح وسهولة في التحري عن العزلات المذيبة. كما اوضحت الدراسة الى ان هناك اختلافا كبيرا في نتائج الغربلة بين الوسط AYG الصلب وبين الوسط AYG السائل حيث ظهر ان 100% من العزلات البكتيرية هي مذيبة للفوسفات اللاعضوي على الوسط السائل مع انخفاض ملحوظ في الارقام الهيدروجينية للوسط لتنخفض من 6.8 الى 3.6 لاحد العزلات البكتيرية، وقدر الفوسفات الذائب للعزلات بين 320-36 جزء بالمليون لافضل العزلات البكتيرية المنتخبة.

الكلمات المفتاحية: اوساط صلبة، اذابة الفوسفات، تحري عن الفسفور

Abstract :

This research aimed to determine the efficiency of some agar media and broth for screening of inorganic phosphate solubilizing bacterial isolates. Sixty bacterial isolates were screened for their ability to solubilize phosphate using five culture agar media, differences were recognized upon agar media in which 50% of total isolates gave halo zone on AYG agar plate after 72 hours while only 26%, 20% and 13% of bacterial isolates solubilized phosphate for PVK, NBRIP and NBRIY respectively. Bromophenol blue dye caused only easer detecting for halo zone without change the percentage of solubilizing bacteria. This research indicated a difference between agar media and broth in which 100% of bacterial isolates gave detectable soluble phosphorous on AYG broth with decreasing in pH of broth which reached to3.6 for KP6.5. Soluble phosphorous determined to 62- 320 ppm for the best solubilizing isolates.

Key words: agar media, phosphate solubilization, detecting of phosphorous.

المقدمة :

تحتاج النباتات الى العديد من العناصر المغذية لنموها ويأتي النتروجين في المرتبة الاولى من احتياج النبات يتبعه الفسفور حيث يعدان من المغذيات الرئيسية والتي تؤثر على نمو وتطور النبات. توجد في التربة خصوصا مناطق الجذورالعديد من الاحياء المجهرية ذات القدرة على اذابة الفوسفات العضوية واللاعضوية والمتوفرة في التربة بشكل غير متاح للنبات وتحويله الى فسفورذائب يستطيع النبات من امتصاصه. واستغلت تلك الاحياء المجهرية في تصنيع اسمدة حيوية صديقة للبيئة لاجل التقليل من اضافة الاسمدة الكيمائية التقليدية المستخدمة على نطاق واسع في تحسين انتاج المحاصيل الزراعية لتلافي بعض الاضرار نتيجة هذا الاستخدام (1,2,3,4). ولاهمية عزل الاحياء المجهرية المختلفة ذات القدرة على اذابة الفوسفات وتحديد الكفوءة منها وجدت وطورت العديد من الاوساط الزرعية الصلبة والسائلة للتحري عن الاحياء المجهرية المذيبة للفوسفات وقد اعتمدت طرق التحري باستخدام الاوساط الصلبة على تكوين هالة شفافة حول النمو البكتيري كدلالة على اذابة الفوسفات كما اعتمد البعض على اضافة بعض الصبغات كصبغة ازرق البرومو فينول لتيسير قراءة النتائج حيث تتكون هالة ذات لون اصفر نتيجة لانخفاض الارقام الهيدروجينية بعد استهلاك الكلوكوز المضاف الى الوسط الزرعي وانتاج الاحماض العضوية المختلفة منه (2و 5و 6)، وقد وجد لاحقا ان هذه الطريقة غير كافية لاعتمادها في عمليات التحري عن الاحياء المجهرية المذيبة للفوسفات لاختلاف نتائجها مع نتائج الاوساط السائلة ذات المكونات ذاتها (6). ولجأ كلا من Nautical و Sagervanshi (7و8) الى تغيير في مكونات وسط التحري من حيث مصادر الكربون والنتروجين وتراكيزها وحذف او استبدال بعض الاملاح المعدنية للحصول على نتائج افضل في اذابة الفوسفات، لذا هدف البحث الحالي الى اجراء المقارنة بين كفاءة خمس اوساط زرعية صلبة في التحري عن البكتريا المذيبة للفوسفات والمعزولة من الترب المحلية وتقدير الاختلاف بين الاوساط الصلبة ومثيله من الوسط السائل في قدرته على الكشف عن قدرة البكتريا في اذابة الفوسفات.

المواد وطرائق العمل:

نماذج التربة وعزل البكتريا:

جمعت عينات تربة من محيط جذور نباتات مختلفة لمحافظات بغداد وكربلاء والبصرة والسليمانية وبابل ووضعت العينات في اكياس بلاستيكية وحفظت في المختبر. تم وزن 10 غرام من كل عينة تربة وعلق في 100 مل ماء مقطر معقم وزرع 0.1 مل من المعلق على اوساط مختلفة شملت اكار السيدوموناس pseudomonas agar والمرق المغذيnutrient agar. كما تم وضع المعلق في درجة حرارة 80 سليزي لمدة 30 دقيقة لقتل الخلايا الخضرية وعزل البكتريا المكونة للسبورات بزرع 0.1 مل من المعلق المعامل على سطح اكار المرق المغذي وحضنت جميع الاطباق بدرجة حرارة 30 سليزي لمدة 18 ساعة واختيرت المستعمرات المفردة المختلفة من حيث المظهر واختبرت قابليتها على اذابة الفوسفات.

غربلة العزلات البكتيرية لاذابتها الفوسفات اللاعضوي في الاوساط الصلبة:

تم تحضير اربع اوساط زرعية صلبة مختلفة المكونات (8) وكما هو واضح في جدول (1) واضيفت صبغة البروموفينول الازرق الى وسط بيكوفيسكايا PVK للحصول على الوسط الخامس وكما هو وارد في Miliute(5)، وعقمت الاوساط الزرعية بجهاز الموصدة لمدة 20 دقيقة وبضغط 1.5 بار وصبت في اطباق وتركت لتتصلب. تمت زراعة العزلات المنتخبة بطريقة التخطيط على سطح الاوساط الخمسة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 30 سليزي لمدة سبعة ايام. تمت قراءة النتائج كل 24 ساعة بالتحري عن وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري وقياس قطر الهالة نسبة الى قطر النمو البكتيري. قورنت كفاءة الاوساط المستخدمة في التحري عن اذابة الفوسفات من خلال ظهور ووضوح الهالة الشفافة .

جدول(1): مكونات الاوساط الزرعية الصلبة المستخدمة في التحري النوعي عن اذابة الفوسفات اللاعضوي

مكونات الوسط(غم لتر$^{-1}$)	PVK	AYG	NBRIY	NBRIP
Glucose	10	20	10	10
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	1	0.5	0.1
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	0.5	0.1	0.25
Yeast extract	0.5	0.2	-	-
KCl	0.2	-	0.2	0.2
NaCl	0.2	-	0.2	-
$FeCl_3$	-	trace	-	-
$FeSO_4.7H_2O$	0.002	-	0.002	-
$MnSO_4.7H_2O$	0.002	trace	0.002	-
$MgCl_2.6H_2O$	-	-	-	5
$Ca_3(PO_4)_5$	5	5	5	5
pH	7	6.8	7	7

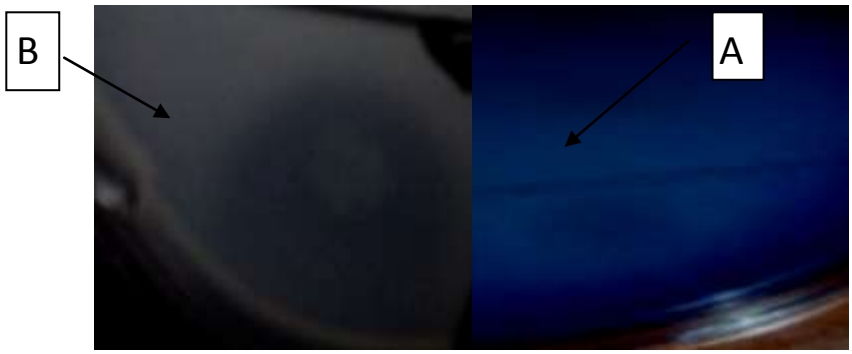
PKV=Pikovaskaya; NBRIYP=National Botanical Research Institute Phosphate ; NBRIY= modified NBRIYP

الغربلة النوعية والكمية لاذابة الفسفور اللاعضوي في وسط AYG السائل:

حضر وسط AYG السائل وضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.8 ووزع في دوارق سعة 250 مل وبواقع 1:5 من حجم الدورق المستخدم وتم تلقيح الوسط بعد تعقيمه بجميع العزلات الموجبة والسالبة في اذابة الفوسفات وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة دقيقة$^{-1}$ وبدرجة 30 سليزي ولمدة 72 ساعة. تمت قراءة الارقام الهيدروجينية للمزارع البكتيرية كل 24 ساعة وقيس تركيز الفسفور المتحرر في راشح المزارع البكتيرية بعد نبذها مركزيا وبسرعة 5000 دورة دقيقة$^{-1}$ ولمدة 15 دقيقة. قدر الفسفور الذائب (جزء بالمليون) باعتماد الطريقة اللونية لتكون اللون الازرق الناتج من تفاعل مولبيدات الامونيوم مع الفسفور وبوجود حامض الكبريتيك وحامض الاسكوربيك وباستخدام المنحنى القياسي للفسفور وكما جاء في Nahapetain (9).

النتائج والمناقشة:

تم اختيار 60 عزلة بكتيرية مختلفة المظهر من 13 نموذج تربة لمناطق جذور نباتات مختلفة من محافظات بغداد وكربلاء وبابل والسليمانية والبصرة واظهرت بعض من العزلات البكتيرية قدرة على اذابة الفوسفات غير الذائب في الوسط الصلب واختلفت قابلية العزلات المذيبة للفوسفات باختلاف الوقت والوسط الزرعي المستخدم حيث ظهرت هالات شفافة حول عدد من المستعمرات وعلى مختلف الاوساط وبعد 24 ساعة فقط من الحضن واستمرت الهالة بالاتساع لتصل قطراً ثابتاً بعد 72 ساعة وكما هو واضح في شكل (1).

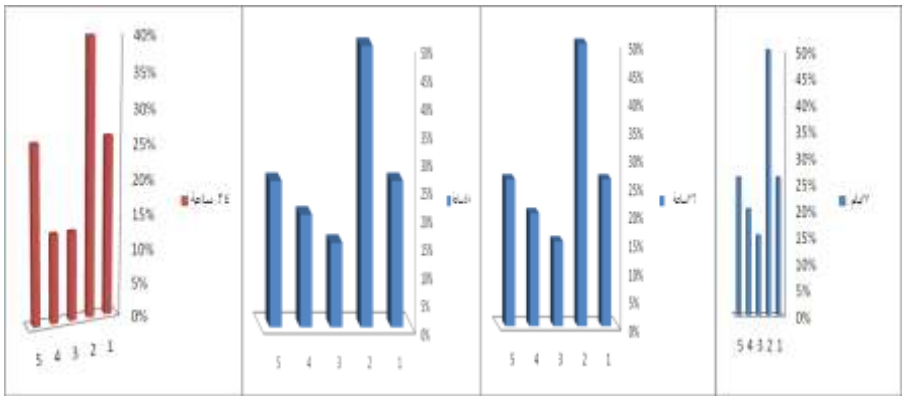


شكل(1): التحري عن اذابة الفوسفات على الوسط الصلب

A=(العزلة KP1.6 باستخدام وسط AYG الصلب والحضن لمدة 72 ساعة وبدرجة 30 سليزي)

B= العزلة KP1.6 باستخدام وسط PKA مع صبغة ازرق البروموفينول والحضن لمدة 72 ساعة بدرجة 30 سليزي)

بينت النتائج اختلاف كفاءة الاوساط المستخدمة في الغربلة النوعية لاذابة الفوسفات اللاعضوي حيث اعطت 50% من العزلات هالات شفافة حول نموها البكتيري على وسط AYG وكانت نسبة 40% من هذه العزلات مذيبة للفوسفات بعد 24 ساعة فقط بينما احتاجت 10% من العزلات الى وقت وصل الى 48 ساعة للاذابة واحتفظت 50% من العزلات المشمولة بالغربلة بنتائجها السالبة حتى بعد سبعة ايام من استمرار الحضن. كما اظهرت نتائج الوسط PKA مع او بدون صبغة البروموفينول الازرق ان 16 عزلة فقط اعطت فحصاً ايجابياً لاذابة الفوسفات وبنسبة 26% من العزلات البكتيرية ولم تؤثر اضافة الصبغة الى تغيير في نتائج التحري عدا وضوح اكثر قليلا في اظهار الهالة الشفافة وكما هو واضح في شكل (B 1). واعطت ثمان عزلات فقط هالات شفافة حول نموها على وسط NBRIY وبنسبة مئوية 13% من العزلات المنتخبة، وأوضحت نتائج الوسط NBRYP ان لزمن حضن العزلات تأثيرا على اذابة الفوسفات حيث ظهرت هالات شفافة حول نمو ثمان عزلات بكتيرية وبنسبة 13% بعد 24 ساعة فقط من حضن المزارع البكتيرية وازداد عدد العزلات المذيبة للفوسفات لتصل الى 12 عزلة وبنسبة 20% من مجموع العزلات ويوضح الشكل (2) النسب المئوية للعزلات المذيبة للفوسفات على الاوساط الخمسة وعلى فترات زمنية مختلفة.



1-وسط PKA 2-وسط AYG 3- وسط NBRY 4-وسط NBRYP 5= وسط PKA المدعم بصبغة ازرق البرومو فينول

شكل(2): النسبة المئوية للعزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات اللاعضوي باستخدام اوساط زرعية صلبة مختلفة

كما وجد اختلاف قابلية العزلات البكتيرية على اذابة الفوسفات اعتمادا على مكونات الوسط الزرعي المستخدم، حيث وجد ظهور وتطور الهالة الشفافة وبقطرهالة : قطر مستعمرة وصل الى 12: 2 ملم و 20: 11 ملم للعزلة KA8.3 والعزلة KA8.5 على الوسط AYG على التوالي مقارنة مع قطر 8:10 ملم و 9:10 ملم على وسط NBRIP وعدم تكون هالة على بقية الاوساط بينما كانت اقطار الاذابة للفوسفات متقاربة للعديد من العزلات الاخرى ومنها KA3.1 والعزلة KA4.3 وKA7.2 و KA9.2وكما هو واضح في جدول (2).

قد تتأثر قابلية اذابة الفوسفات اللاعضوي من قبل البكتريا على العديد من العوامل منها النوع البكتيري وانتاجها للعديد من الاحماض العضوية من خلال استهلاكها للسكريات المختلفة وقد اشار Nahas (10) ان انتاج الاحماض العضوية احد الميكانيكيات المهمة المتبعة من قبل البكتريا في اذابة الفوسفات كما اشارSadaf and Nuzhat (11) الى انتاج بعض المواد المخلبية مثل السايدروفور او انتاج بعض مواد الايض الاخرى والتي تساهم في اذابة الفوسفات اللاعضوي.

جدول (2): التحري عن اذابة الفوسفات اللاعضوي لعزلات بكتيرية محلية وباستخدام اوساط زرعية مختلفة

العزلة البكتيرية	قطر الهالة (ملم)				
	وسط PKA	**وسط AYG**	**وسط NBRIY**	**وسط NBRIP**	**وسط PKA +بروموفينول بلو**
KP1.1	-	10:12	-	-	-
KP 1.3	-	8:10	-	-	-
KP 1.5	-	8:14	-	10 :8	-
KP 1.6	8:10	-	8:10	10 :7.	8:10
KP 3.1	-	8 :6	-	8 :6	-
KP 3.3	-	-	-	8 :7	-
KP 3.5	-	8 :6	-	9 :8	-
KP 4.3	-	8.:7.	9 :8	-	-
KP 4.5	-	6 :7	-	-	-
KP 4.6	-	6 :8	-	-	-
KP 5.1	-	8 :7	-	-	-
KP 5.2	-	8 :6	-	-	-
KP 5.5	-	7 :8	-	-	-
KP 6.1	9 :8	8:10	-	8:10	9 :8
KP 6.3	8 :7	12 :15	-	5 :8	8.:7.
KP 6.4	8.:7.	-	-	-	0.7:0.8
KP 7.1	-	8:10	-	-	-
KP 7.2	-	6.:8.	-	6.:8.	-
KP 7.3	-	8.:12	-	8.:9.	-
KP 7.4	-	8:12.	-	7.:9.	-
KP 7.5	-	8:12	-	7.:9.	-
KP 7.6	-	8:10.	-	9.:7.	-
KP 8.1	-	8:10	-		-
KP 8.2	-	9:10.	-	-	-
KP 8.3	-	2:12.	-	8:10	-
KP 8.4	-	9 :8.	-	-	-
KP 8.5	-	11:20	-	9:10.	-
KP 8.6	-	9:10	-	-	-

KP 9.1	-	6:10.	-	8 :6.	-
KP 9.2	-	5:10.	-	8.:5.	-
KP 9.3	-	9:10	-	8:10.	-
KP 9.4	-	5:12.	-	8:11.	-
KP 9.6	-	6:12.	-	7:10.	-

يتضح من النتائج السابقة ان لمكونات الوسط الزرعي الصلب من تركيز سكر ونوع المصادر النتروجينية اللاعضوية والعضوية ووجود او غياب بعض الاملاح المعدنية تأثيراً ايجابياً او سلبياً على اظهار قابلية العزلات البكتيرية المختلفة في اذابة الفوسفات اللاعضوي حيث وجد ان وسط AYG اعطى افضل نسبة مئوية لاذابة الفوسفات اللاعضوي مقارنة مع الاوساط الاخرى حيث قد يكون لتركيز 20 غرام لتر$^{-1}$ من سكر الكلوكوز تأثيرا افضل من استخدام تركيز 10 غرام غرام لتر$^{-1}$ حيث يمثل سكر الكلوكوز مصدرا مهما للطاقة وتستغله البكتريا بصورة مباشرة في ايضها مما يؤدي الى انتاج الاحماض العضوية مختلفة التركيب مسببة انخفاض الارقام الهيدروجينية للاوساط المستخدمة، وان اضافة 1غرام من كبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني لاعضوي يعطي نتائج افضل من التراكيز الاقل والتي شملت 0.5 او 0.1 غرام لتر$^{-1}$ وذلك يتوافق مع ما اشار اليه illmer (12) الى ان العديد من البكتريا والفطريات تستطيع اذابة الفوسفات عند وجود الامونيوم كمصدر للنتروجين وان وجوده مهم لزيادة كفاءة اذابة فوسفات الصخور. كما وجد ان مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني عضوي وبتركيز 0.2 غرام لتر$^{-1}$ اثر بشكل ايجابي على فعالية البكتريا في اذابة الفوسفات، كما ان الاستغناء عن كل من ملح كلوريد البوتاسيوم وكلوريد الصوديوم وكبريتات الحديد وكلوريد المغنيسيوم اعطى نتائج افضل من اضافتها الى بقية الاوساط الصلبة المستخدمة. اختلفت هذه الدراسة مع ما وجده Sagravuishi(8) من ان الوسط PVK المعتمد بكثرة في التحري عن اذابة الفوسفات اللاعضوي والعضوي من قبل الاحياء المجهرية هو الافضل من بين الاوساط يتبعه الوسط AYG ثم NBRIY وقد يعزى سبب ذلك الى خصوصية العزلات المحلية واونواعها المختلفة والى نوع عينات الترب المحيطة بالجذور والتي تم عزل البكتريا منها.

أظهرت نتائج المقارنة بين اذابة الفوسفات اللاعضوي في الوسط الصلب AYG ومثيله السائل الى ان العزلات المنتخبة جميعها ادت الى اذابة الفوسفات اللاعضوي وتحرر الفسفور في الوسط السائل وبنسبة 100% مع ملاحظة انخفاض في الارقام الهيدروجينية للوسط السائل كما بين قياس تركيز الفسفور المتحرر ان العزلات ذات النتائج الايجابية على الوسط الصلب هي الاكثر اذابة للفوسفات حيث وصل تركيز الفسفور الى 320 جزء بالمليون من قبل العزلة PK9.2 مقارنة مع اذابة الفوسفات من قبل العزلات التي اعطت اختبارا سالبا على الوسط الصلب حيث وصل اعلى تركيز للفسفور المتحرر الى 209 جزء بالمليون للعزلة البكتيرية KP6.2 وسجلت العزلات تفاوتا في انخفاض الارقام الهيدروجينية وتراكيز الفسفور الذائب وكما هو واضح في جدول (3) حيث يلاحظ وجود علاقة بين انخفاض الارقام الهيدروجينية وتحرر الفوسفور في بعض العزلات منها KP9.2 و KP7.3وKP6.2 وKP6.4 وKP6.5 و6.6، كما لوحظ في هذه الدراسة ان العزلات ذات الاذابة المنخفضة للفوسفات اللاعضوي سجلت ارقاما هيدروجينية اعلى من غيرها ومنها العزلات KP3.2 وKP4.1 وKP6.1 بينما لوحظ ان بعض العزلات قد تلجأ الى اليات اخرى في اذابة الفوسفات اللاعضوي اضافة الى انتاجها للحوامض العضوية وانخفاض الارقام الهيدروجينية وكما هو واضح للعزلات KP8.3 وKP1.2 وKP3.4 وKP4.5 و KP KP6.3 قد يعزى الاختلاف بين الاوساط الصلبة والسائلة للتحري عن اذابة الفوسفات اللاعضوي من قبل الاحياء المجهرية الى نوع الكائن المجهري المستخدم والى اسلوب تغذيته واستغلاله لمصادر الطاقة والاليات المتبعة في اذابة الفوسفات، كما ان الكائن المجهري يكون في تماس مباشر مع مكونات الوسط الزرعي السائل مما يسهل من عملية انتشار المواد المنتجة من قبل الكائن المجهري الى الوسط السائل وهذا يتفق مع كل من Chen (13) و Asuming- Brempong (2) حيث اشارا الى اختلاف الارقام الهيدروجينية للوسط المستخدم في اذابة الفوسفات اللاعضوي مع اختلاف انواع العزلات البكتيرية المستخدمة كما وجدا اختلافات في اهمية وتأثير انخفاض الارقام الهيدروجينية على اذابة الفوسفات حيث بينا ان تحرر الفسفور الذائب من قبل بعض العزلات البكتيرية يكون مقترنا مع الانخفاض الكبير في الرقم الهيدروجيني بينما تؤدي بعض العزلات الاخرى الى اذابة عالية للفوسفات بمعزل عن انخفاض الرقم الهيدروجيني واستطاع Vazquez (3) من استخلاص وتحديد انتاج احدى عشر حامض عضوي اضافة لزيوت طيارة ذات اهمية في اذابة الفوسفات اللاعضوي من قبل عزلات بكتيرية مختلفة.

جدول(3): التحري عن اذابة الفوسفات اللاعضوي من قبل بعض العزلات البكتيرية المحلية وباستخدام الوسط AYG السائل

رمز العزلة	قطر الهالة : قطر النمو البكتيري على وسط AYG الصلب(ملم)	الرقم الهيدروجيني لوسط AYG السائل	الفسفور الذائب (جزء بالمليون)
KP9.2	5:10	4	320
KP7.3	8:12	4.4	250
KP8.3	2:12	4.7	210
KP1.2	-	4.8	145
KP1.5	-	4.3	134
KP2.4	-	4.2	114
KP3.2	-	5.3	61
KP3.3	-	4.2	60.8
KP3.4	-	4.8	156
KP3.6	-	4.4	60.8
KP4.1	-	5	63
KP4.2	-	5.1	61
KP4.5	-	5.8	115
KP8.6	-	5	67
KP6.1	-	5.2	36
KP6.2	-	4	187
KP6.3	-	4.5	154
KP6.4	-	4.1	108
KP6.5	-	3.6	209
KP6.6	-	4	196

ويتضح مما تقدم امكان استخدام الاوساط الصلبة كخطوة اولى في التحري عن العزلات المذيبة للفوسفات عند غربلة عزلات كثيرة يصعب معها استخدام الاوساط السائلة، وغربلة العزلات السالبة على الوسط الصلب باستخدام الوسط السائل وذلك لتقييم كفاءة جميع العزلات في اذابة الفوسفات كما يجب تقييم وتحديد احتياجات العزلات البكتيرية للحصول على الظروف المثلى من مواد مغذية واملاح وظروف بيئية للحصول على افضل اذابة للفوسفات وذلك لاختلاف كفاءة البكتريا باختلاف مكونات الوسط الزرعي المستخدم.

المصادر:

1- Whitelaw, M. A; Harden, T.J. and Bender, G. L. (1997). Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* spnov. Australian Journal soil research, 35: 291- 300.

2- Assuming- Prempong, S. and Aferi, N. K.(2014). Isolation of phosphate solubilizing bacteria fromtropical soil. Global Advanced Research Journal Agricultural Science, 3(1): 008- 015.

3- Vazquez, P.; Holguin, G.; Puente, M. E.; Lopez- Cortes, A. and Bashan, Y.(2000). Phosphate- solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in semiarid coastal lagoon. Biology Fertility of Soils, 30: 460- 468.

4- Mardad, I, Serano, A. and Soukri, A.(2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from Moroccan mineral phosphate deposit. African Journal of Microbiology Research, 7(8):626- 635.

5- Miliute, I. and Buzaite, O. (2011). IAA production and other olant growth promoting trais of endophytic bacteria from apple tree. Biologija, 57(2): 98- 102.

6- Gupta, R.; Singal, R.; Shankar, A.; Kuhad, R. C. and Saksena, R. K. (1994). A modified plate assayfor screening phosphate solubilizing microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 255- 260.

7- Nautical, C. Shekhar. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. FEMS Microbiology letters, 170: 265- 270.

8- Sagervanshi, A.; Kumari, P.; Nagee, A. and Kumar, A. (2012). Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from anand agriculture soil. International Journal of Life Science and Pharma Research, 2(3): L245- L-255.

9- Nahapetain, A. and Bassiri, A.(1975). Changes in concentration of phytate phosphorous, Magnesium, calcium, and zinc in wheat during maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23(6):1179-1184.

10- Nahas, E.(1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12:567- 572.

11- Sadaf, S. and Nuzhat, A. (2008). Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indogenous bacterial isolates. African Journal of Biotechnology, 7(10):1543- 1549.

12- Illmer, P.; Schinner, F.(1992). Solubilization of hardly- soluble AIPO4 with P- solubilizing microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 24: 389- 395.

13- Chen, Y. P.; Rekha, P. D.; Arun, A. B.; Shen, F. T.; Lai, W. A. and Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 34: 33-41.