دوازدهمین کنگره علوم خاک
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)

بررسی کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات بر غلظت فسفر و برخی عناصر کم مصرف در نهال‌های پسته

بنت‌الهدی نوروزی[1]، عبدالرضا اخگر[2]، احمد تاج‌آبادی‌پور[3]، وحید مظفری[2]
1-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
2-استادیاران دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
3-دانشیار دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
آدرس پست الکترونیکی: noroozi_24@yahoo.com

چکیده

به منظور تعیین توانایی باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر پسته در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، تعداد 40 جدایه از ریزوسفر نهال‌های پسته کاشته شده جداسازی و سپس به صورت تصادفی خالص‌سازی شدند. نتایج نشان داد که همه جدایه‌ها دارای توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول بودند. هم‌چنین کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت King B و بررسی خاصیت پرتوافشانی فلورسنس آن‌ها نشان داد که 8 جدایه در گروه سودوموناس‌های فلورسنت قرار گرفتند. آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل 6 سطح فسفر (0، 30، 60، 90، 120 و 150 میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک از منبع اسید فسفریک) و 4 سطح باکتری (شاهد قدیم بدون تلقیح باکتری، شاهد جدید با کود فسفره از منبع اسید فسفریک و بدون تلقیح باکتری، دو سطح با تلقیح باکتری P16 و P40) بودند. نتایج بیانگر این بود که تلقیح باکتری باعث افزایش معنی‌دار غلظت مس و منگنز در اندام هوایی نسبت به شاهد قدیم شد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل کننده فسفات، پسته، سودوموناس فلورسنت

مقدمه:

با توجه به اهمیت اقتصادی پسته که از محصولات کشاورزی درآمدزای کشور محسوب می‌شود، نقش و اهمیت تحقیق در راه افزایش راندمان تولید این محصول بیش از پیش مشخص می‌گردد (پناهی و همکاران، 1381). فسفر جزئی از ترکیب ساختمانی مولکول‌های بزرگ از جمله اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و آدنوزین‌تری‌فسفات می‌باشد، از این‌رو در فرآیندهایی از قبیل ذخیره و انتقال انرژی، فتوسنتز، کنترل واکنش‌های آنزیمی، انتقال کربوهیدرات‌ها شرکت می‌کند؛ لذا، گیاه بدون آن نمی‌تواند به رشد خود ادامه دهد (خوش‌گفتارمنش و سیادت،1381). با توجه به واردات سالانه 500 هزار تن کود فسفاته، پیدا کردن روشی که بتواند از مصرف بی‌رویه این کود بکاهد، ضروری به نظر می رسد (سلیسپور و همکاران، 1379). امروزه از میکروارگانیسم‌هایی استفاده می‌شود که به طور مستقیم و غیرمستقیم باعث بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات از باکتری‌ها، جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* و از قارچ‌ها، جنس‌های *Aspergillus* و *Penicillium* می‌باشند که اسیدهای آلی مانند اسید گلکونیک، اسید اگزالیک و اسید سیتریک تولید می‌نمایند. اسید سیتریک و اسید اگزالیک با کلاته کردن و تشکیل کمپلکس‌های پایدار با کاتیون‌های آهن، آلومینیوم و کلسیم سبب آزاد شدن فسفات به داخل محلول خاک می‌شوند. اسید گلوکونیک و 2-کتواگزالیک با آزادسازی پروتون سبب

کاهش pH محیط و انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول می‌گردند (سلیسپور، 1382). با توجه به مصرف زیاد کودهای شیمیایی فسفره در اراضی کشاورزی بویژه باغ‌های پسته و باقی ماندن بخش قابل ملاحظه‌ای از این کود در خاک، بررسی کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات در افزایش جذب فسفر و کمک به رشد، هدف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

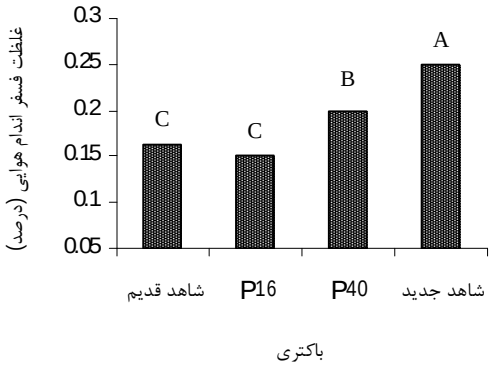
10گرم از خاک ریزوسفری به همراه مقادیری از ریشه نهال‌های پسته به آزمایشگاه منتقل شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف از هر رقت بر روی سطح محیط کشت پخش گردید. پس از رشد، باکتری‌ها انتخاب و خالص سازی شدند. در نهایت 40 باکتری از ریزوسفر پسته جدا گردید. باکتری‌ها در محیط TSB کشت داده شدند. سپس از سوسپانسیون باکتری به محیط کشت اسپربر منتقل گردید و پس از 120 ساعت تکان دادن، pH هر نمونه قرائت و بلافاصله سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و محلول رویی با آب مقطر و معرف آمونیوم مولیبدات- وانادات مخلوط گردید و میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. همه‌ی جدایه‌ها بر روی محیط کشت King B کشت داده شد و کلنی‌هایی که دارای خاصیت فلورسنت بودند به عنوان باکتری‌های فلورسنت مشخص گردیدند. آزمون گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل شش سطح فسفر (0، 30، 60، 90، 120 و 150 میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک از منبع اسید فسفریک) که از سال گذشته به گلدان‌ها داده شده بود و 4 سطح باکتری (18 گلدان قدیمی بدون تلقیح باکتری، 18 گلدان قدیمی با تلقیح باکتری P40 ، 18 گلدان قدیمی با تلقیح باکتری P16) بودند. در ضمن، به 18 گلدان جدید نیز سطوح فسفر فوق الذکر (بدون تلقیح باکتری) اضافه شدند. براساس آزمون خاک، عناصر غذایی لازم (روی، مس و آهن) به صورت محلول به گلدان‌ها اضافه و پس از رساندن رطوبت خاک به حد ظرفیت زراعی، گلدان‌ها در شرایط گلخانه نگهداری گردید. پس از کاشت بذرهای جوانه زده در گلدان‌ها هر بذر با سوسپانسیون باکتری، تلقیح و سپس رطوبت خاک با آب مقطر به حد ظرفیت زراعی رسانده شد. شش ماه پس از کاشت، برگ، ساقه و ریشه گیاهان جدا شدند و پس از شستشو و خشک کردن در آون، نوزین شدند. نمونه های پودر شده به روش خشک سوزانی خاکستر و با استفاده از اسید کلریدریک 2 نرمال به صورت محلول در آورده شدند. در عصاره بدست آمده، غلظت یون‌های مس و منگنز به‌وسیله دستگاه جذب اتمی و غلظت فسفر با دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین گردید. سپس پاسخ‌های گیاهی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و با انجام آزمون دانکن، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث:

جمعیت کل باکتری‌ها در نمونه‌های خاک ریزوسفری جدا شده از ریشه نهال‌های پسته از $2/1\times10^6$ تا $2/6\times10^7$ سلول به ازای هرگرم خاک متغیر بود. به عقیده ویپس[1] (1990) اکثر جمعیت میکروبی خاک می‌توانند با ریشه‌های گیاه رابطه همیاری داشته باشند، به‌طوری‌که تعداد آن‌ها می‌تواند حتی به بالاتر از 10^9 تا 10^{12} سلول در هر گرم خاک ریزوسفری برسد. نتایج حاصل از ارزیابی توانایی باکتری‌ها در حل فسفات‌های معدنی نامحلول نشان داد که همه جدایه‌ها از چنین توانایی برخوردار بودند. در بین جدایه‌ها بالاترین توانایی مربوط به جدایه‌های 15، 16، 32، 39 و 40 و میزان حلالیت فسفر از 109/2 تا 532/9 میلی‌گرم فسفر در لیتر متغیر بود. تغییرات pH محیط کشت نیز اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار کاهش pH (3/54) مربوط به جدایه 18 و کمترین مقدار (5/84) متعلق به جدایه 33 بود. پس از کشت 40 جدایه در محیط کشت

1. Whipss

اختصاصی King B و بررسی پرتوافشانی فلورسنس آن‌ها، کلونی‌های با خاصیت فلورسنس مشخص شدند. تعداد 8 جدایه شامل جدایه‌های 9، 15، 16، 17، 18، 19، 38 و 40 دارای خاصیت مذکور بودند. سودوموناس‌های فلورسنت گروه مهمی از سودوموناس‌ها هستند که به‌واسطه‌ی توانایی‌شان در تولید رنگدانه‌های زرد-سبز محلول در آب به‌نام پیوردین‌ها که به‌عنوان سیدروفور عمل می‌کنند قابل شناسایی هستند (مایر[2] و همکاران، 1987). در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن کلنیزاسیون باکتری‌ها و توانایی آن‌ها در حل فسفات‌های معدنی دو باکتری سودوموناس فلورسنت P16 و P40، به منظور تلقیح بذرهای پسته انتخاب گردید. تلقیح باکتری P40 توانست فسفری که از سال قبل به گلدان‌ها اضافه شده و تقریباً به فرم نامحلول در آمده را تا حدودی به فرم قابل استفاده درآورد. احتمالاً این باکتری از طریق تولید اسیدهای آلی توسط این باکتری و اسیدی کردن محیط ریشه، فسفر نامحلول را حل کرده و سبب افزایش جذب آن توسط گیاه پسته و غلظت آن در اندام هوایی شده است (شکل1). کاراکورت[3] و همکاران (2010) بیان کردند که کاربرد باکتری ***Agrobacterium rubi A-18*** غلظت فسفر را در برگ‌های سیب افزایش داد. به عقیده آن‌ها این افزایش به علت حل شدن فسفات معدنی توسط تولید اسیدآلی بود.

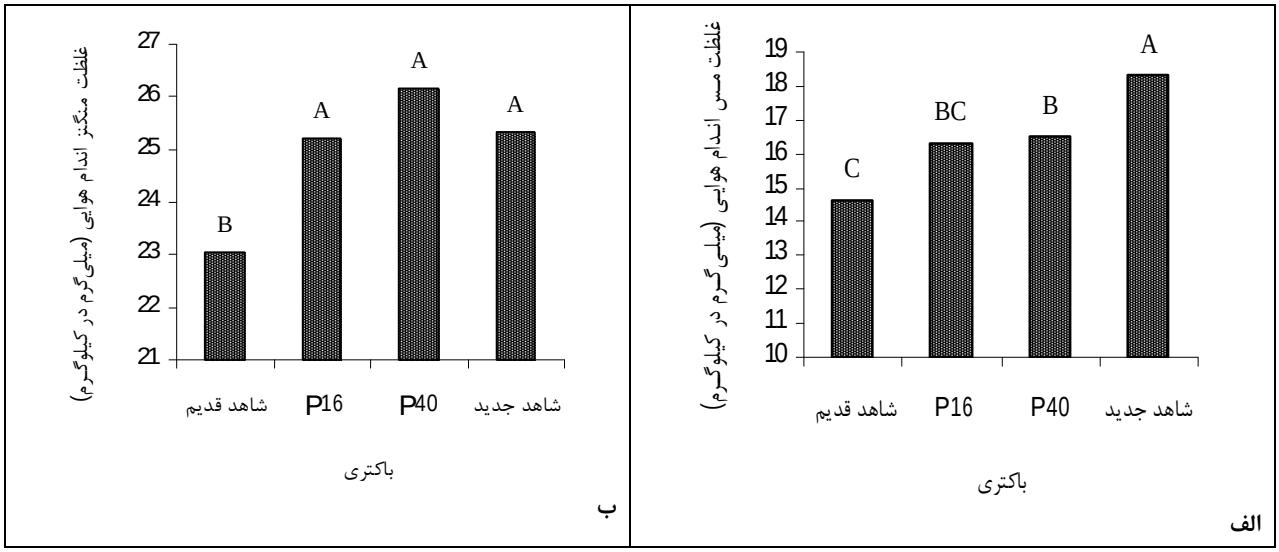


شکل1- تأثیر کاربرد باکتری برغلظت فسفر اندام هوایی نهال‌های پسته

نتایج مقایسه میانگین مربوط به تأثیر کاربرد باکتری بر غلظت مس اندام هوایی در شکل (2 الف) نشان می‌دهد که تلقیح هر دو باکتری باعث افزایش غلظت مس اندام هوایی نهال‌های پسته در مقایسه با شاهد قدیم شد که در تیمار تلقیح شده با باکتری P40 نسبت به شاهد قدیم افزایش غلظت مس اندام هوایی معنی‌دار و 11/41 درصد برآورد گردید. احتمالاً ترشح اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها از طریق کاهش pH خاک باعث افزایش قابلیت دسترسی عناصر میکرو از جمله مس شده است. کارلیداگ[4] و همکاران (2007) بیان کردند که باکتری *باسیلوس* M3، به دلیل تولید اسید آلی و کاهش pH خاک باعث افزایش میزان مس در برگ‌های سیب شد. مقایسه میانگین غلظت منگنز اندام هوایی نهال‌های پسته در تیمار با باکتری‌ها نشان داد که با کاربرد باکتری غلظت منگنز اندام هوایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل 2 ب) که بیشترین میزان آن در تلقیح با باکتری P40 بدست آمد. میزان افزایش غلظت منگنز در تیمار P40 نسبت به شاهد قدیم 11/92درصد بود. تیمارهای شاهد جدید و P16 نیز نسبت به شاهد قدیم به ترتیب 9/05 و 8/54 درصد افزایش نشان دادند. احتمالاً

2. Meyer
3. Karakurt
4. Karlidag

افزایش غلظت منگنز اندام هوایی نهال‌های پسته تلقیح شده با باکتری‌ها به دلیل آزادسازی اسیدهای آلی توسط آن‌ها می‌باشد که قابلیت استفاده عناصر میکرو مثل منگنز را افزایش می‌دهند. توران[5] و همکاران (2010) نیز گزارش کردند که تلقیح گندم با باکتری‌های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن باعث افزایش منگنز در برگ، دانه و ساقه گیاه به ترتیب 49/1، 121/2 و 120 درصد نسبت به شاهد (بدون تلقیح و بدون کود)، گردید.



شکل2- تأثیر کاربرد باکتری برغلظت مس و منگنز اندام هوایی نهال‌های پسته

منابع:

پناهی، ب.، ع. اسماعیل پور، ف. فربود، م. مؤذن‌پور و ح. فریور مهین. 1381. راهنمای پسته (کاشت، داشت و برداشت). وزارت جهاد کشاورزی، معاونت آموزش و تجهیز نیروی انسانی، انتشارات آموزش کشاورزی.

خوش‌گفتارمنش، ا. ح. و ح. سیادت. 1381. تغذیه معدنی سبزیجات و محصولات باغی در شرایط شور. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت امور باغبانی.

سلیسپور، م. 1382. مطالعه مزرعه‌ای اثر بخشی کودهای میکروبی فسفاته حاوی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات بر عملکرد کمی و کیفی ذرت. سومین همایش ملی توسعه کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی، تهران، ایران.

سلیسپور، م.، ع. بانیانی و م. کیانی راد. 1379. ارزیابی مزرعه ای کود فسفاته میکروبی و امکان جایگزینی آن با کودهای شیمیایی فسفری در زراعت پنبه. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد دوم، شماره 14. صفحه‌های 114 تا 120.

Karakurt H and Aslantas R, 2010. Effect of some plant growth rhizobacteria (PGPR) strains on plant growth and leaf nutrient content of apple. J. Fruit Ornamental Plant Res. 18(1):101-110.

5. Turan

Karlidag H, Esitken A, Turan M and Sahin F, 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Sci. Horti. 114:16–20.

Meyer JM, Halle F, Hohnadel D, Lemanceau P and Rateflarlvelo H, 1987. Siderophores of *Psedomonas* biological properties. *In:* Iron transport in microbes, plant and animals pp.18-205.

Turan M, Gulluce M, Cakmakci R, Oztas T and Sahin F, 2010. The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. 140-143.

Whipps JM, 1990. Carbon economy. *In:* J. M. Lynch (ed). The Rhizosphere. Jhon Wiley & Sons, New York. pp.59-97.