بررسی توان انحلال فسفاتهای نامحلول آلی توسط باکتریهای جنس آزوسپیریلوم بومی خاکهای ایران

غلامعباس اکبری، سید مهدی عرب، حسینعلی علیخانی، محمد حسین ارزانش و ایرج اله دادی
به ترتیب استادیار مجتمع آموزش عالی ابوریحان- دانشگاه تهران، دانشجوی کارشناسی ارشد مجتمع آموزش عالی ابوریحان- دانشگاه تهران، استادیار دانشکده کشاورزی کرج- دانشگاه تهران و اعضای هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب

مقدمه

سالهاست که باکتریهای جنس آزوسپیریلوم به عنوان عامل محرک رشد گیاه (PGPR) شناخته شده اند(7). این باکتریها را می توان از ریزوسفر بسیاری از گیاهان خانوادهٔ گرامینه (Gramineae) در مناطق معتدل و گرمسیری جداسازی و شناسایی کرد(3) .

فسفر یکی از سه عنصر پر مصرف و ضروری گیاه است که جزء ساختمانی تعدادی از ترکیبات حیاتی از قبیل ملکولهای انتقال دهندهٔ انرژی، ADP و ATP (آدنوزین دی فسفات و آدنوزین تری فسفات)، NADPH و ترکیبات سیستم انتقال اطلاعات ژنتیکی مثل DNA و RNA و فسفو لیپیدهای موجود در غشاء سلولی است.

بزرگترین منبع فسفر در جهان، سنگها و رسوباتی مانند آپاتیت هستند که فرمهای معدنی فسفر را در خاک تشکیل می دهند. بخش دوم فسفر خاک به صورت فسفر آلی درون بقایای آلی می باشد. در بسیاری از خاکها ممکن است فسفر آلی از حدود۵ تا ۹۵ درصد فسفر خاک را تشکیل دهد(8). گیاه نمی تواند مستقیماً فسفر آلی را جذب نماید، بلکه می بایست فسفر آلی ابتدا از طریق هیدرولیز مواد آلی بفرم معدنی تبدیل شود. انحلال فسفاتهای آلی در واقع همان معدنی شدن فسفرهای آلی می باشد. معدنی شدن اکثر ترکیبات آلی فسفره توسط آنزیم‌های فسفاتاز که فسفوهیدرولازها نامیده می شوند انجام می پذیرد (10). این آنزیم ها بر روی ترکیبات آلی فسفر خصوصاً استرهای اینوزیتول فسفات، همچنین فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک اثر گذاشته و موجب آزاد شدن اسید فسفریک از ترکیب فوق می‌شوند. فسفاتهای اینوزیتول به مقدار زیاد در مواد آلی خاک مانند انساج مرده گیاهان و حیوانات یافت می شوند. کرکند و همکاران (۱۹۹۳) وجود مقادیر قابل توجهی از آنزیمهای فسفاتاز فعال و دارای منشاء میکروبی را گزارش کردند. همچنین مشخص شد که فعالیت فسفاتازها بخصوص در منطقه ریزوسفر افزایش می یابد(12). محققین بسیاری وجود باکتریهای خاکزی دارای توان معدنی کردن فسفاتهای آلی را گزارش نمودند (1,4,9).

طرفدار و کلاسن (۱۹۸۸) فعالیتهای مختلفی را در محدودهٔ ریشه گیاهان مثل ذرت، جو و گندم مشاهده کرده اند که فعالیت فسفاتازها بخصوص در ریزوسفر و در PH حدود اسیدی تا خنثی بطور قابل توجهی افزایش می یابد(13). تحقیقات انجام شده نشان می دهد که باکتریهای خاکزی از قبیل جنسهای مختلف ریزوبیا (1)، اینتروباکتر، سراشیا، نیتروباکتر و کلبسیلا همچنین سودوموناس ها و باسیلوس (5) از جمله باکتریهای توانمند در تولید مقادیر قابل توجه آنزیم‌های فسفاتاز به حساب می آیند. براساس گزارش گریوز و وبلی (۱۹۶۵) حدود ۳۰ تا ۴۸ ٪ از میکروارگانیزمهای خاکهای قابل کشت، توانایی استفاده از فیتات های خاک را که بخش عمدهٔ فسفر آلی خاک را تشکیل می دهند، دارا هستند(4). قبل از آن در سال ۱۹۶۲ کاتزنلسون و همکاران نقش باکتریها را برای تبدیل فسفاتهای آلی به فرمهای معدنی قابل استفاده گیاه به اثبات رسانیده بود (6).

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری های جنس آزوسپیلریلوم

گیاهان خانوادهٔ غلات (Gramineae)، میزبان های اصلی باکتریهای جنس آزوسپیریلوم هستند. بدین علت تعداد ۸۰ نمونهٔ گیاهی از این خانواده (گندم، ذرت، جو، علف باغی، مرغ، چمن، چچم و...) از سطح استانهای تهران و خوزستان جمع آوری و ریشه ها جداسازی شدند. ریشه ها (بیشتر از قسمت تارهای کشنده، به دلیل احتمال بالای وجود باکتری) به قطعات ۲-۱ سانتی متری تقسیم شده و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. سپس در محیط کاملاً استریل در لوله های آزمایشی حاوی محیط نیمه جامد Nfb[1] و در انتهای لوله قرار داده شدند (در دو تکرار). پس ازسه روز محیط سبز رنگ به دو قسمت آبی رنگ (در بالا) و سبز شفاف (در پایین) تبدیل شده و هاله ای سفید رنگ به فاصله ۸-۴ میلی متر از سطح محیط نشاندهنده احتمال وجود باکتریهای جنس آزوسپیریلوم در نظر گرفته شد. نمونه هایی که در محیط Nfb (Semi-solid)[1] ایجاد هاله کرده بودند به محیط جامد CR [2] کنگورد دار منتقل شده و در انکوباتور در دمای ۳۴-۳۷°C به صورت واژگون قرارداده شدند. پس از ۱۰-۷ روز کلونی های مشکوک به آزوسپیریلوم (با مشخصات جذب کنگورد، چروکیده، خشک و زخم مانند با حواشی مضرس) شناسایی و مجدداً به محیط Nfb (مایع) منتقل شدند. با تشکیل مجدد هاله در لوله، به احتمال زیاد می توان گفت که کلونی مورد نظر Azospirillum است. پس از شناسایی و بازکشت های متوالی، کلونی‌ها خالص شده و در محیط کشت Nutrient agar به صورت اریب (Slant) کشت شده و در دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تفکیک گونه A. lipoferum از دیگر گونه‌ها

محیط نیمه جامد Nfb بدون اسید مالیک و حاوی گلوکز یکی از راههای تشخیص این گونه از دیگر گونه‌ها است. برای این منظور مقدار 7cc از محیط Nfb عاری از اسید مالیک به درون لوله های آزمایش ریخته و به میزان 0.7 ml از محلول گلوکز (آب مقطر 100

1- N- Free Semisolid Malate Broth
2- Congo Red Agar medium

$1g\ ml^{-1}$) استریل شده درون هر لوله اضافه شد . محیط کشت درون لوله ها را با باکتریهای خالص آزوسپیریلوم مایه کوبی نموده و نمونه هایی که در محیط هاله تشکیل دادند شناسایی شدند. به طور کلی باکتریهای آزوسپیریلوم از اسیدهای آلی مانند مالئات، لاکتات، پیروات و سوکسینات به عنوان منبع کربن استفاده می کنند. نوع قندهایی که گونه‌های آزوسپیریلوم مصرف می کنند می‌تواند در شناسایی آنها مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال گونهٔ برازیلنیس نمی تواند از قند گلوکز استفاده کند ولی گونهٔ لیپوفروم این قند را مصرف می کند. نوع قندهای مصرفی گونه های ایراکنس و آمازوننس بسیار مشابه بوده و هر دو گونه می توانند از قندهایی مثل ساکارز، لاکتوز مالتوز و تری هالوز استفاده کنند.

در مجموع تعداد ۶۰ ایزوله باکتری آزوسپیریلوم در این تحقیق استفاده شد که از این تعداد حدود ۳۰ جدایه از کلکسیون موسسه تحقیقات خاک و آب کشور و بانک ژن گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و مابقی از ریشه گیاهان گرامینه موجود در استانهای خوزستان و تهران جداسازی و خالص گردیدند. کلیه باکتری‌های جنس آزوسپیریلوم بر روی محیط جامد RC تجدید کشت و جوان شدند.

۳- آزمون نیمه کمی توان حل فسفاتهای آلی

در اندازه گیری نیمه کمی توان حل فسفاتهای آلی نامحلول از محیط اسپربر (۱۹۵۸) اصلاح شده که در آن ترکیب شیمیایی تری کلسیم فسفات با یک منبع فسفر آلی به نام اینوزیتول هگزا فسفات یا فیتیک اسید جایگزین شده بود، استفاده گردید(11). میزان اینوزیتول هگزا فسفات مورد استفاده در این آزمایش برابر مقدار تری کلسیم فسفات استفاده شده در محیط اسپربر یعنی معادل ۲/۵ گرم در لیتر تعیین و مصرف گردید. انتخاب اینوزیتول هگزا فسفات به عنوان منبع فسفر آلی به این خاطر است که فیتاتها به عنوان فراوانترین انواع فسفر آلی موجود در خاک به حساب می آیند (2).

در این آزمایش برای هر جدایه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته شد. سطح هرظرف پتری به چهار قسمت مساوی تقسیم گردید وسپس مرکز هر یک از قسمتهای چهارگانه یک پلیت با مقدار تقریباً مساوی(۰,۷ میکرولیتر) از کشتهای تازه باکتری آزوسپیریلوم با جمعیت یکسان شده $۵ * ۱۰^{۷}$ تلقیح شد. در واقع در این آزمون برای بررسی توان حل فسفاتهای نامحلول هر جدایه باکتری، چهارتکرار (درون یک پلیت) در نظر گرفته شد. به منظور جلوگیری از خشک شدن محیط کشت، پلیتهای تلقیح شده با هر جدایه باکتری توسط نوارهای پارافیلم درزگیری شده و به مدت سه هفته درون انکوباتور (دمای ^{oc} ۳۳) قرار داده شدند. تمامی پلیتها در طی سه نوبت، یعنی یک، دو و سه هفته پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلونی های رشد یافته (Colony Diameter) (CD) و نیز هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (Halo Diameter) (HD) که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود به دقت اندازه گیری شدند. در نهایت نسبت هاله به کلنی (HD/CD) در تکرارهای چهارگانه، برای هر ایزوله آزوسپیریلوم محاسبه گردید. همچنین رنگ معرف مورد استفاده در آزمایش (Bromothymol Blue) (BTB) به همراه محیط کشت در PH های ۳/۰، ۳/۵، ۴/۰، ۴/۵، ۵/۰، ۵/۵، ۶/۰، ۶/۵، ۷/۰، ۷/۵، ۸/۰، ۱۰ و ۱۲ به منظور مقایسه های کیفی تغییرPH محیط در اثر تلقیح با باکتری، مشاهده و یادداشت گردید.

نتایج و بحث

در این تحقیق سعی شد از طیف وسیعی از گیاهان تیره گندمیان نمونه برداری صورت پذیرد. اولین نتیجه گیری در این تحقیق این است که فراوانی این باکتری و احتمال دستیابی به باکتریهای این جنس پایین و در حدود ۱۷٪ است که مستلزم صرف هزینه و زمان بالایی میباشد. نتایج حاصل از این آزمون به شرح زیر است:

احتمال وجود باکتری جنس آزوسپیریلوم در ریزوسفر گیاه ذرت بیشتر از گندم و گندم بیشتر از دیگر غلات سردسیری می باشد. احتمالاً این امر می تواند ناشی از نوع ترشحات ریشه گیاهان C4 (مانند ذرت، سورگوم، ارزن و ...) و همچنین شرایط مناسب اکولوژیکی برای باکتریهای این جنس در ریزوسفر غلات گرمسیری باشد(۳). در حدود ۶۴٪ از سویه های آزوسپیریلوم از گونه لیپوفروم تشخیص داده شدند که مطابق انتظار می باشد.

براساس اندازه گیری نیمه کمی توان حل فسفات آلی توسط سویه های آزوسپیریلوم بر روی محیط کشت اصلاح شده اسپربر، ازمجموع ۶۰ سویه باکتری، تعداد ۱۸ سویه (۳۰٪) توان حل فسفات از خود نشان دادند. در حدود نیمی از سویه های حل کننده فسفات، از گونه لیپوفروم بودند که توان بالای این گونه را در حل فسفات آلی مشخص می سازد. ماده معرف BTB با توجه به ویژگیهای مخصوص به خود که در PH های مختلف رنگهای بسیار متنوعی را ایجاد می کند، یکی از بهترین رنگهای معرف در محیطهای کشت به حساب می آید. در این آزمایش با به کارگیری این معرف مشخص شد که تمام کلونی های حل کننده فسفات رنگ محیط را از سبز (خنثی) به زرد (اسیدی) تغییر می دهند. این پدیده ممکن است به دلیل تولید اسیدهای آلی مانند اسیدگلوکونیک از منبع کربنی محیط یعنی گلوکز بوده باشد. بعلاوه نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که انحلال فسفات آلی توسط باکتری آزوسپیریلوم یک فرآیند زمان بر است، زیرا در قرائت اول (پس از۷ روز) ۱۸٪، در قرائت دوم (پس از ۱۴ روز) ۵٪ و در قرائت سوم (پس از ۲۱ روز) ۷٪ و در مجموع ۳۰٪ از باکتری ها هاله بی رنگ شفاف حاصل از حل فسفات آلی را در اطراف کلنی رشد یافته خود ایجاد کردند. براساس این نتایج و جداول تجزیه واریانس، در بین سویه‌های مختلف از نظر توان حل فسفات آلی تفاوت کاملا معنی داری وجود دارد. ولی میزان فسفر انحلال یافته با توجه به قطرهاله به کلنی در سه زمان متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند.

منابع مورد استفاده

1- Abd-Alla, M. H. .1994. Use of organic PHosPHorus by Rhizobium leguminosarum biovar. viciae PHosPHatases . Biol. Fertil. Soil, 18:216-218.

2- Dalal, R.C. 1977. Soil Organic PHosPHorus. Adv. Agron. 29: 83-117.

3- Döbereiner J Day JM. 1976. Associative symbioses and free-living systems. In: Newton WE, Nyman CJ (eds) Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman, pp. 518– 538.

4- Greaves, M.P.and D.M. Webley. 1965. A study of the breakdown of organic PHosPHates by microorganisms from the root region of certain pasture grasses. J. Appl. Bact. 28: 456-465.

5- Gügi, B. N.Orange,F.Hellio, , J.F Burini, C. Guillou, , Leriche, F. and Guespin-Michel, 1991.Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotropic bacteriumPseudomonasfluorescens.J.Bacteriol.

173:3814-3820.

6- Katznelson, H., E.A. Peterson, and Rovatt,.(1962) PHosPHate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of J.W plants. Can. J. Bot. 40:1181-1186.

7- Okon, Y. and C. A. Labandera-Gonza´lez. 1994. Agronomic applications of Azospirillum sp. 274–278. In M. H. Ryder, P. M. StePHens, and G. D. Bowen (ed.), Improving plant productivity with rhizosPHere bacteria. CSIRO Division of Soils, Adelaide, Australia.

8- Paul, E.A. and F.E Clark. 1988 Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London.:

9- Raghu, K.and I. C MacRae. 1966 Occurrence of PHosPHate-dissolving microorganisms in the rhizosPHere of rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bacteriol. 29:582-586.

10-Rodriguez, H. and R Fraga. 1999 PHosPHate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv.17: 319-339.

11-Sperber J.I. 1958 The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosPHere and soil. Aust. J. Agric. Res. 9: 778-780

12-Tarafdar, J. C., A Junk. 1987 PHosPHatase activity in the rhizosPhere and its relation to the depletion of soil organic PhosPHorus. Biol. Fertil. Soil, 3: 199-204.

Tarafdar, J.C. and N. Claassen. 1988 Organic PHosPHorus compounds as a PhosPhorus source for higher plants through the activity of PHosPHatases produced by plant roots and microorganisms. Biol. Fertil. Soil 5: 308-312.