بررسی توان حل فسفات معدنی و آلی جدایه های ریزوبیومی همزیست با گیاه عدس *(Rhizibium leguminosarum* bv. *viciae)*

مهدی زارعی، ناهید صالح راستین، حسینعلی علیخانی و ناصر علی اصغر زاده

به ترتیب : دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشجوی دوره دکتری (ومربی)دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

مقدمه

چهل درصد از اراضی زیر کشت جهان به علت محدودیت مقدار فسفر قابل دسترس برای گیاهان زراعی،عملکرد پایینی دارند(۷).برای جبران این کمبود از کودهای شیمیایی استفاده می شودکه علاوه برآثار تخریب زیست محیطی،دارای بازدهی پایین در خاکها(خصوصا خاکهای آهکی) می باشند.بعلاوه تولید این کودها مستلزم صرف هزینه زیاد است که برای اکثر کشورها مقرون به صرفه نیست.برای برطرف کردن این نقائص و مشکلات لازم است که از استراتژیهای مناسبی برای تشدید حلالیت وجذب فسفر از طریق شناسائی منابع فسفر،بررسی فرایندها ومکانیسم های معدنی شدن وحلالیت اشکال نا محلول، تسریع وتنظیم این فرایندها و ارائه برنامه هایی برای استفاده بهینه وپایدار از منابع موجود، متناسب با شرایط آگرواکولوژیک بهره ببریم. امروزه میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات به منظور تولید کودهای بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته اند.این میکروارگانیسم ها قادرند فسفات را از ترکیبهای معدنی و آلی نامحلول آزاد کرده و باعث غنی شدن خاک گردند. توانایی حل فسفات های نامحلول توسط بسیاری از سویه های ریزوبیومی نیز به اثبات رسیده است(۲،۳،۶).ریزوبیومها علاوه برتوان تثبیت نیتروژن وتوان انحلال فسفرو تامین این دو عنصر مهم وحیاتی در رشد وتغذیه گیاه ،در تولید سایر عوامل محرک رشدگیاه نیز موثر هستند و به دلیل وجود تکنولوژی تولید انبوه مایه تلقیح، به عنوان کود بیولوژیک محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Bacteria or PGPB) دارای اهمیت بسیار زیادی در کشاورزی پایدار می باشند(۱).این تحقیق به منظور ارزیابی توان حلالیت ترکیبهای معدنی والی فسفر توسط جدایه های ریزوبیومی همزیست با گیاه عدس بومی خاکهایی از ایران می باشد که می تواند به استفاده کاربردی از این باکتریها درسطح وسیع منتهی گردد.

مواد و روشها

۱- جداسازی، تهیه کشت خالص وشناسائی جدایه ها: گره های ریشه از مزارع زیرکشت عدس اطراف کرج، قزوین، زنجان و اقلید فارس جمع آوری شدند. در مواردی که گیاه در اواخر دوره رشد و گره ها در حال از بین رفتن بودند از خاکهای مزارع نمونه برداری شد وبعد از کاشت گیاه عدس ،نمونه های گره تهیه گردید.جداسازی باکتریها از گره های ریشه ای،تهیه کشت خالص و آزمون های لازم برای شناسایی ریزوبیوم بر اساس روشهای استاندارد انجام گرفت(۵،۹).

۲- آزمون توان حلالیت فسفات معدنی وآلی جدایه های ریزوبیومی

الف- *فسفات معدنی*: برای ارزیابی توان حل فسفات معدنی جدایه های ریزوبیومی از چهار محیط کشت YMGA ,YGA YMA,ومحیط Sperber(Sp) با pH تنظیم شده روی ۷/۲ استفاده گردید.YMA رایجترین محیط کشت برای ریزوبیومها است که در این تحقیق با تغییراتی در نوع ترکیب فسفره و کربنه برای ارزیابی توان حل فسفات معدنی ایزوله ها بکار گرفته شد. ماده K_2HPO_4 این محیط با یک منبع فسفاتی نامحلول (تری کلسیم فسفات $(Ca_3(PO_4)_2)$ به مقدار $2.5\ gl^{-1}$ ومنبع پتاسیم KCl به مقدار $0.1gl^{-1}$ جایگزین گردید(YMA-TCP). منبع کربنی سه محیط کشت اول به ترتیب مانیتول، گلوکز و ترکیب این دو(۵۰٪ گلوکز+۵۰٪مانیتول) بود. محیط های کشت در شرایط سترون به مقدار ۱۵ میلی لیتر در ظروف پتری به قطر ۷/۵ سانتیمتر توزیع شدند. بعد از جامد شدن محیط، هر ظرف به۴ قسمت مساوی علامت گذاری شد و با استفاده از روش قطره گذاری، هر قسمت با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه در ۴ تکرار تلقیح گردید. ظروف پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و بعد از مدت ۱۰و ۳۰ روز قطر کلنی ها و قطر هاله های اطراف انها در هر تکرار اندازه گیری و متوسط چهار تکرار برای هر سویه تعیین گردید.

ب- *فسفات آلی*: در این آزمایش از محیط کشت IHP-Sperber با pH ۷/۲ استفاده شد. فسفرآلی در این محیط کشت، اینوزیتول هگزافسفات(۲/۵ گرم در لیتر) به جای $Ca_3(PO_4)_2$ به عنوان منبع فسفره بود. در شرایط سترون ۱۵ میلی لیتر ازاین محیط کشت در ظروف پتری به قطر۷/۵ سانتیمتر توزیع شدند. هرظرف در۴ تکرار با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر سویه به روش قطره گذاری کشت گردید. ظروف کشت در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند، و بعد از مدت ۱۰ و۳۰ روز قطر کلنی ها و قطر هاله های اطراف انها اندازه گیری و متوسط چهار تکرار برای هر سویه تعیین گردید.

نتایج و بحث

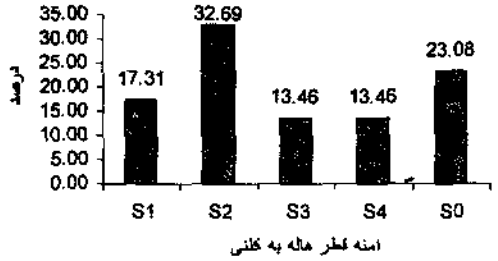
۱- *حل فسفات معدنی*: از ۵۲ جدایه مایه زنی شده بر روی محیط های کشت YMA تغییر یافته . هیچک از انها قادر به حل فسفات معدنی نبودند. رشد این باکتریها بر روی محیط کشت YMA-TCP نسبت به سایر محیط ها بهتر بود. تنها ۴ جدایه توانستندکه بر روی محیط کشت Sp هاله های ضعیفی در اطراف کلنی خود تشکیل دهند که مشخصات آنها در جدول (۱) امده است. همزمان با کشت جدایه ها روی محیط های مختلف از معرف برمو تیمول بلو(BTB) برای تعیین محدوده پ هاش سوسپانسیون هر جدایه استفاده گردید که رنگ این معرف در محیط اسیدی(زرد)،خنثی(سبز)وقلیایی(آبی) می باشد که نتایج این آزمون در جدول(۱)گزارش شده است.

۲- *حل فسفات آلی*: ۴۰ جدایه از ۵۲ جدایه ، قادر به حل فسفات الی روی محیط کشت IHP-Sp بودند.توان حلالیت بر حسب نسبت قطر هاله به کلنی(h/c) جدایه ها از شدید S1 (3.5< h/c<4.3)، نسبتا شدیدS2(2.5 <h/c<3.5)، متوسط S3(1<h/c<2.5)، ضعیف S4 (0< h/c<1) و بدون توان حل فسفات آلی(S0)، در شکل ۱ ارائه شده است.

محققین مختلف توانایی حل فسفاتهای آلی و معدنی را توسط انواع متعددی از ریزوبیومها گزارش نموده اند(۲،۳،۶). در این تحقیق از ۵۲ جدایه استفاده شده درآزمون حل فسفر معدنی اکثر انها(۹۲/۹۳٪)بر روی هیچ یک از محیط های کشت مورد استفاده، علائمی از توان حل فسفات نشان ندادند. در حالیکه استفاده از محیط حاوی معرف برمو تیمول بلو نشان داد که تمام این جدایه ها قادر به تولید اسید در محیط رشد خود هستند(جدول ۱) . این نتیجه می تواند به ویژگیهای ساختمان شیمیایی اسید تولید شده در محیط نسبت داده شود.(۴). هیچ یک از ۴ سویه ای که روی محیط Sp توان حل فسفات معدنی را نشان دادند در محیط کشت حاوی مانیتول ،گلوکز و یا ترکیب این دو چنین توانایی را ظاهر نساختند.تاثیر نوع منبع کربنی و همینطور نوع محیط کشت(جامد ومایع) و منبع فسفر بر روی توان حل فسفات باکتریهای غیر ریزوبیومی نیز گزارش شده است(۴،۸). در این تحقیق اکثر جدایه های ریزوبیومی همزیست با گیاه عدس(۷۶/۹٪) قادر به حل فسفر الی مورد استفاده(IHP)بودند (شکل ۱).

نتیجه گیری

در یک بررسی کلی، این نتیجه بدست آمد که سویه های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسه همزیست باگیاه عدس دارای توانایی بیشتری در حل فسفات آلی می باشند که حاکی از فعالیت قابل توجه آنزیم فسفاتاز در این سویه ها ست.



شکل۱- توزیع جدایه ها در درجات مختلف قطر هاله به کلنی

BTB test	نسبت قطر هاله به کلنی	میانگین قطر هاله (میلیمتر)	میانگین قطر کلنی(میلیمتر)	کد جدایه
زرد	1.46	9.5	6.5	31
زرد	1.30	12	9.25	32
زرد	1.32	12.5	9.5	33
زرد	1.24	12.75	10.25	37
زرد	0.00	0	3.75-10.5	بقیه ایزوله ها
سبز	0.00	0	0	شاهد
زرد- ابی	0 -1.46	0 -12.75	0 -10.5	دامنه

جدول ۱- تست کیفی حل فسفات معدنی

منابع مورد استفاده

۱- علیخانی،ح. و ن. صالح راستین، (۱۳۸۰) ضرورت تولید انبوه کودهای بیولوژیک محرک رشد گیاه(با تاکید بر باکتریهای ریزوبیومی)در راستای نیل به کشاورزی پایدار.ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور(مجموعه مقالات). تدوین کنندگان:کاظم خاوازی محمد جعفر ملکوتی. سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی. نشر اموزش کشاورزی.

2- Abd- alla,M.H. (1994).Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* phosphatases.Biol.Fertil.Soil 18:216-218.

3- Alikhani,H.A., N., Saleh-Rastin, and H., Antoun(2002)Phosphate solubilizing rhizobial strains native to iranian soils.Abstract Book, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilizing, Salamanca,Spain,16-19 july. CSIC.

4- Asea, P.E.A., R.M.N., Kuecy, and J.W.B., Stewat (1988) Inorganic phosphate solubilization by *Penicillium* species in solution culture and soil. Soil Biol.Biochem.20(4):459-469.

5- Beck,D.P., L.A., Materon, and F., Afandi (1993)Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. Technical Manual No.19 , ICARDA,Syria.

6- Chabot ,R., H., Antoun, and M.P., Cescas(1996)Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.Plant and Soi1184:311-321.

7- Igul,J.M. and C. Rodriguez-Barrueco, (2002) Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture. Abstract Book, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilizing, Salamanca,Spain,16-19 july. CSIC.

8- Nahas, E.(2002)Factors affecting the solubilzation of inosoluble phosphates. Abstract Book, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilizing, Salamanca,Spain,16-19 july. CSIC.

9- Vincent, J. M. (1970) A manual for the practical study of the Root- Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford.