بررسی توان تولید سیدروفور میکروبی و حلالیت فسفات های نامحلول توسط جدایه های *Azospirillum*

محمد حسین ارزانش[۱]، حسینعلی علیخانی[۲] ، کاظم خاوازی[۳] ، حشمت الله رحیمیان[۴]

[۱]استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، [۲]استادیار گروه مهندسی علوم خاک- دانشکده مهندسی آب و خاک - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، [۳]استادیار پژوهشی موسسه خاک و آب، [۴]استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات خاک و آب و استادگروه گیاهپزشکی – مجتمع آموزشی دانشگاه مازندران

مقدمه

جذب آهن و فسفر به دلیل بالابودن **pH** در اغلب خاک های کشور مشکل عمده بسیاری ازگیاهان زراعی است. در نتیجه هر عاملی که سبب افزایش حلالیت این دو عنصر در خاک تاثیر شود. می تواند روی جذب آنها توسط گیاهان تاثیر بگذارد . چندین گزارش از توانایی حل ن ترکیبات معدنی کم محلول و نامحلول فسفر مانند تری کلسیم فسفات،دی کلسیم فسفات، هیدرواکسی آپاتیت و سنگ فسفات توسط باکتری های مختلف وجود دارد که مهمترین آنها ***Agrobacterium، Achromobacter، Burkholderia، Rhizobium، Bacillus،Pseudomonas*** ***، Rhodococcus ، Azospirillum، Erwinia، Flavobacterium، Aerobacter،Micrococcus*** ***Azotobacter، Serratia*** و ***Arthrobacter*** هستند(**Rodriguez** و همکاران ، ۱۹۹۹). علاوه بر حلالیت فسفات های نامحلول بسیاری از میکروارگانیسم ها ازجمله ***Azospirillum*** می توانند در شرایط کمبود آهن سیدروفور تولید کنند. سیدروفور می تواند باعث افزایش جذب آهن توسط گیاهان شود. **Shah** و همکاران (۱۹۹۲) تولید سیدروفورهای نوع کاتکول[1] را در شرایط کمبود شدید آهن ، عامل اصلی بازدارندگی فعالیت بسیاری از قارچها توسط ***Azospirillum lipoferum*** گزارش کردند(**Winkelmann** و همکاران ، ۱۹۹۹ **Shah** و همکاران ، ۱۹۹۲)**.** لذا در این تحقیق به بررسی توان حلالیت فسفر نامحلول و توان تولیدسیدروفور توسط سویه های بومی ***Azospirillum*** بررسی گردید.

مواد وروش ها

در این آزمایش به منظور بررسی توان حلالیت فسفر نامحلول از ۲۱ جدایه بومی و ۴ جدایه خارجی شرکت **DSMZ** استفاده گردید. برای ارزیابی توان حلالیت فسفر نامحلول در سه آزمون جداگانه (توان حل فسفر نامحلول معدنی به روش کیفی ، حل فسفر نامحلول آلی به روش کیفی و حل فسفر نامحلول معدنی به روش کمی) بررسی گردید. در آزمون کیفی حل فسفات معدنی از محیط اسپربر(۱۹۵۸) به علاوه تری کلسیم فسفات استفاده شد. اندازه گیری کیفی توان حل فسفات های معدنی بر اساس اندازه گیری قطر کلنی و هاله (چهار تکرار در هر پلیت)در زمان های ۰، ۲۴ ، ۱۲۰ ، ۲۴۰، ۳۶۰ ، ۴۸۰ و۶۰۰ ساعت انجام شد .در نهایت مقایسه توان حل فسفات معدنی جدایه ها براساس نسبت قطر هاله به به قطر کلنی جدایه ها پس از ۲۵ روز کشت برروی محیط مذکور صورت گرفت . جدایه هایی که قطرهاله به قطر کلنی بزرگتری دارند ، به عنوان جدایه های برتر در نظر گرفته شدند.

در آزمون حلالیت فسفات آلی مجدداً از همان محیط اسپربر(۱۹۵۸) استفاده گردید با این تفاوت که به جای ترکیب شیمیایی تری کلسیم فسفات، از یک منبع آلی محلول ۴۰ درصد اسید فیتیک به میزان ۲/۵ گرم در لیتر استفاده شد.

در آزمون کمی حل فسفات معدنی ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۲۵ میلی لیتر محلول اسپربر مایع تغییر یافته (۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم فروکتوزو نمک های پایه محیط کشت اسپربر) منتقل گردید. سپس نمونه ها برای مدت

[1] - Catechol

۱۲۰ ساعت برروی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.پس از آن **pH** نمونه ها قرائت شد.همزمان با قرائت **pH** سوسپانسیون باکتری ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی لیتر از محلول بالایی با ۳ میلی لیتر معرف آمونیم مولیبدات – وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه انکوباسیون نمونه ها در دمای آزمایشگاه ، میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج۴۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده ازKH_2PO_4 محاسبه شد.

برای ارزیابی توان تولید سیدروفور از پلیتهای **CAS – Agar** و از روش اصلاح شده **Alexander** و **Zubber** (۱۹۹۱) استفاده گردید. همچنین از جدایه ***P.putida* P168** از مجموعه کلکسیون سودوموناس های بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک وآب که از توان خوبی در زمینه تولید سیدروفور برخوردار است به عنوان شاهد استفاده گردید.

نتایج و بحث

براساس اندازه گیری نیمه کمی توان حل فسفات معدنی توسط سویه های ***Azospirillum*** روی محیط کشت **SP** از مجموع ۲۵ جدایه انتخابی تعداد ۱۰ جدایه***Azospirillum*** توانایی حل فسفات در محیط مذکور را داشتند. مقایسه میانگین قطر هاله به قطر کلنی در محیط اسپربر در جدایه های منسوب به گونه***A.lipoferum*** به طور معنی داری بیشتر از دیگر گونه ها بود.کمترین نسبت میانگین قطر هاله به قطر کلنی نیز مربوط به گونه .***A.irakense*** بود. فراوانی جدایه های بومی ***Azospirillum*** حل کننده فسفات های آلی نیز نشان داد که از ۲۹ جدایه ، ۲۰جدایه توانایی حل فسفات های آلی را داشتند. این مقدار۳۴/۵ در صد بیش از فراوانی مشاهده شده در گونه های با توانایی انحلال فسفات های معدنی بود. ارزیابی توان تولید سیدروفور در ۲۹ جدایه بومی ***Azospirillum*** نشان داد که بیش از نیمی از جدایه ها (۵۹درصد) قادر به تولید سیدروفور بودند. مقایسه میزان رشد و تولید سیدروفور در بین جدایه های بومی ***Azospirillum*** نیز نشان داد که از لحاظ میزان رشد روی محیط **CAS** – آگار و مقدار سیدرروفور تولیدی تفاوت وجود دارد. به طوری که بعد از ۴۸ ساعت بیشترین قطر هاله مربوط به جدایه های **AZ54** (۹/۱۳میلی متر) ، **AZ71** (۸/۱۲میلی متر) ، **AZ25** (۶/۱۳میلی لیتر) و **AZ8** (۶/۱۲میلی لیتر) بود. میزان تولید سیدروفور در جدایه های ***Azospirillum*** با گذشت زمان افزایش می یافت.

فهرست منابع

1. Alexander, D. B. , Zubberrer , D. A. (1991). Use off chrome azurol S reagents to evaluate sidrohpre production by rhizosphere bacteria. Biol.Fertil.Soils 12: 39-45.
2. Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften 91: 552– 555.
3. Shah, S., Rao, K.K., Desai, A. (1993). Production of catecholate type of siderophores by *Azospirillum lipoferum* M. Indian J. Exp. Biol.31:41–44.
4. Sperber ,JI (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust J Agric Res 9:778–781