

بررسی برخی از خاکهای ایران بمنظور یافتن باکتریهای اسپوردار حل کننده فسفات معدنی نامحلول و مقایسه اثر نوع محیط کشت بر توان حل فسفات ندا محمدی و جعفر علی اولاد

فوق لیسانس علوم خاک دانشگاه تهران و کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ایلام

مقدمه

فسفر در تغذیه و رشد گیاهان اهمیت بسزایی دارد. وجود این عنصر در ساختار ژنتیکی موجودات زنده و نقش آن در انتقال انرژی کاملاً مشخص شده است. فسفر در تمامی خاکها، اکثر سنگها و آبها همچنین در بقایای گیاهی و جانوری وجود دارد. متأسفانه بیشتر منابع فسفر به فرمهای قابل دسترس برای گیاه نمیباشند. همچنین استخراج و تبدیل آن به فرمهای قابل استفاده گیاهی با صرف مقادیر زیادی انرژی و هزینه همراه است. در اکثر خاکهای ایران به دلیل بالا بودن pH و فراوانی یون کلسیم، به رغم فراوانی برخی عناصر غذایی مانند فسفر مقدار و فرم محلول و قابل جذب این عنصر، کمتر از مقدار لازم برای تأمین رشد مناسب گیاه است. عملکرد بالا و منافع بیشتر از دلایل عمده اهمیت فسفر برای کشاورزان و تمایل آنها به استفاده از کودهای فسفوری برای تولید محصولات زراعی است (۳ و ۴). میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات به گروه نامتجانسی از میکروارگانیسمها اطلاق می شود که به عنوان اجزاء مکمل چرخه فسفر، قادرند از طریق مکانیسمهای مختلف، فسفر را از منابع نامحلول آزاد کنند. باکتریهای حل کننده فسفات شامل جنسهای سودوموناس، باسیلوس، ریزوبیوم، برخلدريا، آکروموباکتر، آگروباکتریوم، میکروکوکوس و ائروباکتر می باشند که جمعیت آنها در خاک ریزوسفیری به طور قابل توجهی بالاتر و از آنها اغلب با نام phoshate-Solubilizing PGPR یاد شده است (۱ و ۲).

گامهای نخستین برای تشخیص میکروارگانیسمهای حل کننده فسفات (PSM)، با استفاده از روش ارزیابی کیفی برداشته شده است. در این روش میکروارگانیسم مورد نظر بر روی محیط کشت جامد دارای منبع فسفات نامحلول تلقیح و تا زمان رسیدن به رشد مناسب، در انکوباتور قرار داده می شود. تشکیل منطقه شفاف در اطراف کلونی میکروبی نشان دهنده توان انحلال فسفات می باشند (روش ساده تشکیل هاله). گیاهان، میکروارگانیسمها و حتی جانوران در تجزیه آنزیمی و انحلال غیرآنزیمی انواع ترکیبات آلی و معدنی فسفر نقش دارند، که در بین آنها نقش فرآیندهای میکروبی و پس از آن مکانیسمهای گیاهی اهمیت بیشتری دارند.

مواد و روش ها

ابتدا به میزان ۳ تا ۴ گرم از نمونه خاکهای بعضی از استانهای کشور مانند خوزستان، گیلان و مازندران موجود در بانک خاک دانشکده کشاورزی کرج جمع آوری گردید. سپس حدود ۴۵ نمونه خاک از منطقه ریزوسفر گیاهان گندم و جو در مزرعه دانشکده کشاورزی کرج جمع آوری گردید. به منظور آزمون توان حل فسفات باکتریهای اسپوردار مقدار معینی از نمونههای خاک (هر دو سری نمونهها) به میزان ۱ گرم توزین گردید که شامل ۱۲۰ نمونه خاک از بانک خاک و ۴۰ نمونه خاک از مزرعه دانشکده که در مجموع ۱۶۰ نمونه خاک بودند، و آزمایشات لازم بر روی آنها انجام گرفت. مناطق شفاف به وجود آمده در اطراف توده میکروبها حاکی از شدت حلالیت فسفات در ظرف می باشد. محیط کشت مورد استفاده برای کشت نمونههای مورد آزمایش با اضافه کردن ۱۳ گرم N.B در یک لیتر آب مقطر و بعد ۱۴ - ۱۳ گرم N.A که به آنها اضافه می شود تهیه می گردد. برای بررسی توان حل فسفات، میزان ۲/۵ گرم تری کلسیم فسفات نیز در محیط کشت تهیه شده، اضافه می شود که به عنوان منبع فسفات معدنی نامحلول می باشد. سپس از برخی از نمونهها (۳۰ نمونه خاک از بانک خاک و ۱۰ نمونه خاک از مزرعه دانشکده) به صورت تصادفی انتخاب گردید و مراحل تلقیح به صورت ذکر شده در بخشهای قبل در مورد آنها نیز انجام شد. سپس محیط کشت اسپربر با pH تنظیم شده روی ۷/۲، که یک محیط برای ارزیابی توان حل فسفات می باشد تهیه گردید. نمونههای اخیر بر روی این

محیط کشت به صورت سطحی کشت شدند. سپس هر کدام از ظروف کشت شده حاوی N.A و هم ظروف حاوی اسپربر به صورت وارونه در انکوباتور در دمای $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۸ - ۶ روز قرار داده می‌شوند، تا اینکه باکتری‌ها وارد فاز اسپورزایی شدند. مشاهده منطقه شفاف در اطراف کلونی‌های میکروبی، نشان دهنده توانایی حل فسفات می‌باشد.

نتایج و بحث

پس از طی مدت زمان لازم، از حدود ۱۶۰ نمونه‌ای که بر روی محیط (N.A) حاوی تری‌کلسیم فسفات کشت شدند ۱۳٪ از کل نمونه‌ها حل فسفات نشان دادند. اما در مورد محیط کشت اسپربر از ۳۰ نمونه بانک خاک، ۹ نمونه و از ۱۰ نمونه مزرعه دانشکده، ۸ نمونه توان حل فسفات نشان دادند یعنی منطقه شفاف در اطراف کلونی میکروبی به وجود آمد. که در کل از ۴۰ نمونه مورد آزمایش تعداد ۱۷ نمونه (۴۰٪ از کل نمونه‌ها) مثبت ارزیابی شدند. با توجه به نوع محیط کشت مورد استفاده در آزمایش و نتایج حاصله می‌توان این طور استنباط نمود که محیط کشت مناسب در مورد ارزیابی توان حل فسفات سویه‌های ریزوبیومی محیط کشت **Sperber** می‌باشد و محیط N.A که یک محیط کشت عمومی می‌باشد در این مورد مناسب نیست.

پس از انتخاب باکتری‌هایی که در حلالیت فسفات از توانایی بالایی برخوردار هستند، آنها را در مخلوط غذایی پیکواسکایا برای مدت ۱۸ - ۷ روز در حرارت $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد کشت داده و سپس با یک ناقل ضد عفونی شده مناسب (مثل خاک پیت، پودر لیگنیت) مخلوط می‌شوند. مخلوط آماده شده برای مدت یک هفته در سینی‌های بزرگ با درب‌های پوششی مناسبی در حرارت $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. سپس ماده تلقیحی تهیه شده در پاکت‌های پلاستیکی با گنجایش ۳۰۰ گرم بسته‌بندی شده و تا زمان مصرف در حرارت ۲۰ - ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. معمولاً، ماده تلقیحی تهیه شده باید هر چه زودتر (ظرف یک ماه) برای تلقیح بذرها به همان طریقه ماده تلقیحی ریزوبیوم استفاده شود. اطلاعات موجود درباره چگونگی رشد و طول عمر میکرو ارگانیسم‌های مؤثر در حلالیت فسفات در ماده تلقیحی دارای ناقل کافی نبوده و کارهای تحقیقاتی خیلی بیشتری را در این رابطه طلب می‌نماید.

منابع

۱. بهبهانی، م.، ملبوبی، م.، ع. و اولیاء، پ. ۱۳۸۰. فسفات باکتری‌های حل‌کننده فسفات جدا شده از خاک‌های ایران. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران (مجموعه مقالات). موسسه تحقیقات اصلاح و نهال بذر، کرج، ایران.
۲. صالح راستین، ن. ۱۳۸۱. کودهای بیولوژیک. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور (مجموعه مقالات). تدوین کنندگان: کاظم خاوازی - محمدجعفر ملکوتی. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.
3. Igual, J. M. and Rodriguez - Barrueco, C. 2002. Phosphate solubilizing bacteria as inculants for agriculture. Abstract Book first International meeting on microbial phosphate solubilization, Salamanca, spain, 16 - 19 July.
4. Miyasaka, S.C. and Habte, M. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Commun. Soil Sci. plant Anal* 32(7&8):1101-1147.