ارزیابی توانایی انحلال فسفاتهای معدنی و آلی در برخی از باکتری های ریزوسفری خاکهای زیرکشت یونجه

شهلا پاشاپور[۱]، حسین بشارتی[۲] و محمود رضازاد باری[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، [۲]استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب تهران، خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، روبروی بیمارستان شریعتی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب،[۳]استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

مقدمه

بیش از ۷۵٪ از کودهای فسفری مصرف شده در خاکهای آهکی و قلیایی در اثر واکنش با یون های Ca^{+2} آزاد موجود در خاکه به اشکال کم محلول تر تبدیل می شود (۴). فسفر آلی حدود ۵۰ تا۸۰درصد از کل فسفر خاک را تشکیل می دهد و گیاهان قادر نیستند از این منابع فسفر استفاده کنند(۶). بسیاری از گونه های قارچ و باکتری جزء میکروارگانیسم های حل کننده فسفات (**PSM**) هستند و توانایی آنها در انحلال فسفر آلی و معدنی خاک موضوع بسیاری از مطالعات را تشکیل می دهد (۹). میکروارگانیسم های حل کننده فسفات با مکانیسمهای مختلف قابلیت دسترسی ریشه های گیاهان به فسفر را افزایش می دهند(۶). باکتری های ریزوبیوم که همزیستی تثبیت کننده ی نیتروژن را با لگوم ها برقرار می کنند، همانند بسیاری از باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه (**PGPR**) قادرند ریشه های گیاهان غیر لگومی را نیز اشغال نمایند(۳و۷) و رشد گیاه را تحریک کنند (۲). باکتری های ریزوبیوم قادرند فسفات های آلی (۱) و فسفات های معدنی (۲) را حل نمایند. هدف از این آزمایش ارزیابی توان حل کنندگی فسفات در باکتریهای ریزوبیومی جداشده از اراضی زیر کشت یونجه بود.

مواد و روش ها

از محیط کشت **Yeast Monitol Agar** (**YMA**) حاوی کنگورد برای جداسازی باکتری های ریزوبیوم استفاده شد و کشت خالص هر جدایه پس از چند نوبت تجدیدکشت بر روی همان محیط بدست آمد(۸). محیط اسپربر جامد (**glucose 10g; yeast extract 0.5g; $MgSO_4.7H_2O$ 0.32g; $CaCl_2$ 0.14g; $Ca_3(PO_4)_2$ 2.5g; Agar 15g; distilled water 1000ml; pH=7.2**) برای توانایی حل کنندگی فسفر معدنی باکتری ها استفاده شد. تمام باکتری ها مورد مطالعه در ۳ تکرار بر روی محیط کشت مذکور لکه گذاری شده و در دمای ۲۷°C به مدت ۷ روز انکوبات شدند. جدایه هایی که هاله های شفاف اطراف کلونی ها تشکیل داده بودند به عنوان حل کننده های فسفات انتخاب شده و نسبت قطر هاله به قطر کلونی آنها اندازه گیری شد. برای ارزیابی کمی حل کنندگی فسفات، باکتری های انتخاب شده در محیط اسپربر مایع کشت شدند. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محیط به مدت ۱۰ دقیقه با دور **g** ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده و میزان فسفر محلول با استفاده از روش آمونیوم مولیبدات و اسپکتروفتومتر تعیین گردید و **pH** نیز در مایع زلال رویی اندازه گیری شد. روش های کمی و کیفی مورد استفاده برای ارزیابی توانایی انحلال فسفات آلی مشابه روش اندازه گیری توان حل کنندگی فسفات معدنی بود، با این تفاوت که از ایتوزیتول هگزا فسفریک اسید (نمک کلسیم فیتیک اسید) به عنوان منبع فسفات آلی به جای تری کلسیم فسفات نامحلول($Ca_3(PO)_4$) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ۱۹ جدایه (۴۰٪) قادر به حل کردن فسفات معدنی بودند. بالاترین مقدار انحلال فسفات معدنی **g/ml** ۹۶,۴۱µ و کمترین مقدار آن **g/ml**۲۱,۸۶ بود (جدول۱).

جدول۱. فعالیت های حل کنندگی فسفات آلی و معدنی در باکتری های مورد مطالعه

باکتری ها*	حل کنندگی فسفات معدنی			حل کنندگی فسفات آلی		
	غلظت فسفات محلول (µg/ml)	pH محیط	قطر هاله/ قطر کلونی (cm)	قطر هاله/ قطر کلونی (cm)	غلظت فسفات محلول (µg/ml)	pH محیط
Rm1	-	-	-	1.2	1.66	6.20
Rm2	24.67	5.33	1.67	2.15	81.42	4.4
Rm5	28.32	5.82	1.26	1.41	24.28	5.42
Rm6	22.12	5.86	1.34	2.3	94.28	4.97
Rm7	-	-	-	1.10	7.14	5.91
Rm8	66.43	5.15	1.41	-	-	-
Rm9	-	-	-	1.46	41.42	5.36
Rm10	-	-	-	1.20	12.85	5.82
Rm11	92.96	4.48	1.86	-	-	-
Rm13	69.77	5.5	1.42	-	-	-
Rm15	21.86	5.21	1.86	-	-	-
Rm16	95.67	5.53	1.45	-	-	-
Rm19	94.7	5.44	1.67	2.13	80	4.60
Rm22	80.86	5.45	1.39	-	-	-
Rm25	71.73	5.53	2.56	1.51	42.85	5.40
Rm26	72.52	5.86	1.34	-	-	-
Rm30	-	-	-	1.44	58.57	5.12
Rm31	86.21	5.29	1.26	1.21	8.57	5.82
Rm32	62.24	5.43	1.11	-	-	-
Rm38	-	-	-	1.97	77.14	4.94
Bv1	82.22	4.33	1.9	2.97	144.28	4.15
Bv2	85.72	4.36	2.01	2.71	127.14	4.30
Rm42	96.41	4.67	1.2	-	-	-
Rm43	84	5.86	1.5	-	-	-
Rm44	82.85	5.04	1.3	2.16	82.85	4.86
دامنه	21.86 - 96.41	4.33 – 5.86	1.11 – 2.56	1.2- 2.97	1.66 – 144.28	4.15 - 6.20
میانگین	69.54	5.21	1.56	1.79	58.96	5.15

هالدر و کاکرابارتی (۱۹۹۳) جدایه هایی از ریزوبیوم لگومینوساروم معرفی کردند که توانستند مقادیر بالایی از فسفات معدنی را حل نمایند.

جدایه **Bv1** مقدار **pH** محیط را از ۷,۲ به ۴,۳۳ کاهش داد و فعالترین جدایه در کاهش **pH** محیط بود. از میان جدایه ها ، ۱۵ جدایه (۳۲٪) قادر به انحلال فسفات آلی بودند (جدول۱).

این نتایج نشان می دهد که بسیاری از ریزوبیوم ها قادرند فسفات آلی و معدنی را حل نمایند و به عنوان باکتری های **PGPR** شناخته شده اند (۹). در مجموع، علاوه بر اثرات مفید ریزوبیوم ها بر لگوم ها و غیر لگوم هایی که در تناوب بعد از لگومها کشت می شوند، از ریزوبیوم ها می توان بعنوان باکتریهای محرک رشد گیاه نیز استفاده نمود(۲).

*(نام جدایه های بدون توان حل کنندگی فسفات در جدول ذکر نشده است

منابع

[1] Abd-Alla, M.H., 1994. Use of organic phosphorus by Rhizobium leguminosarum bv. viciae phosphatases. Biol. Fertil. Soils 8, 216–218.

[2] Antoun, H.A., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., Lalande. R. 1998 Potential of Rhizobium and radyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: effect on radishes (Raphanus sativus L.). Plant Soil 204, 57–67.

[3] Chabot, R., Antoun. H., Kloepper. J.W., Beauchamp, C.J., 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2767–2772.

[4] Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. Am. J. Altern. Agric. 1, 51–57.

[5]] Halder, A.K., Chakrabartty, P. K., 1993. Solubilization of inorganic phosphate by Rhizobium. Folia Microbiol. 38, 325–330.

[6] Richardson, A.E., 2001 Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant Physiol. 28, 897–906.

[7] Schloter, M., Wiehe, W., Assmus, B., Steindl, H., Beke, H., Höflich, G., Hartmann., A., 1997. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting Rhizobium leguminosarum bv. trifolii R39 studied with monosporic polyclonal antisera. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2038–2046.

[8] Vincent,J.,,M. 1970A. Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP. handbook 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford. .

[9] Whitelaw, M.A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Adv. Agron. 69, 99–151.