شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در انحلال فسفات نامحلول در محیط جامد و مایع در دمای ثابت و متغیر

علیرضا فلاح نصرت آباد[۱]، آزاده صداقت[۲*]

[۱] دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۲] دانشجوی دکترای گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

باکتری‌های حل‌کننده فسفات قادرند فسفات‌های معدنی نامحلول را در محیط جامد و مایع حل کرده و مقادیری فسفر آزاد نمایند. این باکتری‌ها توانایی متفاوتی در دماهای مختلف دارند. هدف از انجام این تحقیق بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری‌ها در محیط جامد و مایع در دماهای مختلف می‌باشد. در این تحقیق تیمارها شامل ۱۱ باکتری (P43-1، P39، P9، P56-2، P60-2، P21-1، P3، P72-2، P55-2، P55-1 و P5) می‌باشند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر ساده باکتری، روز و اثرات متقابل باکتری و روز در تمام خصوصیات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در محیط جامد و مایع و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار است. در دمای ۴۰ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رشدی مشاهده نشد، بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات نسبت به افزایش دما حساس هستند و در دمای بالاتر رشدی نخواهند داشت و با گذشت زمان مقدار آزادسازی فسفر از محیط بیشتر و عملکرد باکترها در تولید هاله شفاف و کلنی افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، محیطجامد، براث، منطقه هاله

مقدمه

دو روش کیفی و کمی برای بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات ریزجانداران وجود دارد. در بررسی کیفی، ایجاد هاله شفاف و یا نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی در کشت جامد شاخص توانایی حل فسفات باکتری‌هاست (Liu و همکاران، ۲۰۱۵). در بررسی کمی که درکشت آبی و درون شیشه انجام می‌شود، مقدار فسفر محلول ، اندازه‌گیری و میزان آن به‌عنوان توانایی در حل فسفات معدنی گزارش می‌شود (Sinha and Paul، ۲۰۱۳). پژوهش‌گران نیز کاهش اسیدیته کشت مایع باکتری حل‌کننده فسفات را گزارش کردند (Spagnoletti و همکاران، ۲۰۱۷). Rashid و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که گاهی در زیستگاه دارای اسیدیته زیاد نیز حل کانی‌های فسفری رخ می‌دهد و این به کلاته شدن اسیدهای‌آلی با یون کلسیم در تری کلسیم فسفات وابسته است. Behera و همکاران (۲۰۱۷) هم‌بستگی مثبتی میان حل شدن فسفات و اسیدیته گزارش کردند. تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها قابلیت حل و معدنی کردن فسفر دارند. باکتری‌های خاکی که که می‌توانند فسفر غیرقابل حل را از طریق حلالیت و معدنی کردن به‌صورت قابل دسترس گیاه تبدیل می‌کنند، شامل Pseudomonas spp، Agrobacteriumspp و Bacillus circulans (Babalola and Glick, 2012b)، Azotobacter (Kumar و همکاران، ۲۰۱۴)، Burkholderia (Istina و همکاران، ۲۰۱۵) و غیره می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری‌ها در محیط جامد و مایع می‌باشد.

مواد و روش

آزمون فعالیت حل‌کنندگی فسفات با حضور ۱۱ گونه باکتری حل‌کننـده فـسفات در آزمایشگاه بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب روی محیط کشت اسپربر جامد (Sperber agar) انجام شد (اسپربر، ۱۹۵۸). هر باکتری روی پتری حاوی محیط کشت اسپربر به‌صورت لکه‌ای کشت داده شد و در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد به مدت چهارده روز در گرمخانه قرار داده شد و قطر کلنی و قطر هاله ظاهر شده در اطراف کلنی در طی ۱۴ روز و در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دهم و چهاردهم اندازه‌گیری شد. در مرحله‌ی بعدی قدرت ایجاد هاله ۱۱ باکتری فعال در سه دمای ۲۸، ۴۰، ۶۰ درجه‌ی

* ایمیل نویسنده مسئول: azadehsedaghat65@gmail.com

سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. آزمون فعالیت حل‌کنندگی فسفات معدنی تمامی جدایه‌ها روی محیط کشت اسپربر مایع (Sperber agar) هم انجام شد (اسپربر، ۱۹۵۸). pH و فسفر محلول (روش زرد مولیبدات وانادات) در روزهای اول، سوم، دهم و چهاردهم، با استفاده از روش طیف سنجی در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (اسپربر، ۱۹۵۸). محاسبات آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار آماری SAS (SAS Institute, 2000) انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید (استل، ۱۹۶۰).

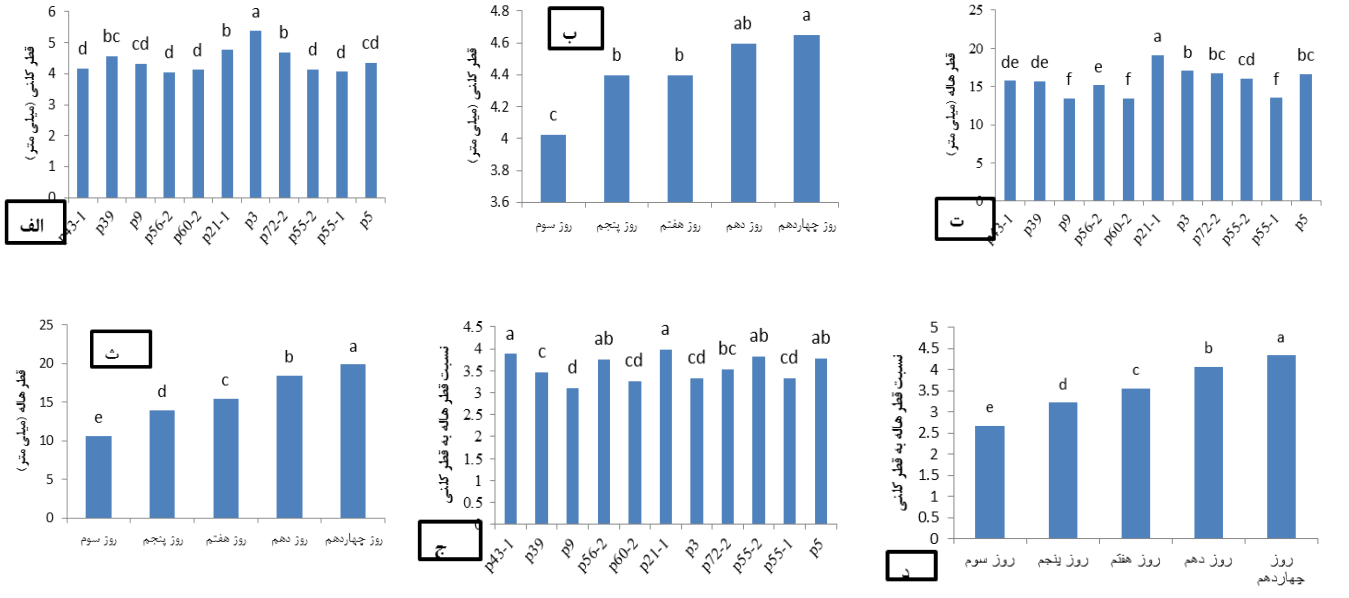
بحث و نتایج

الف- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان حل فسفات معدنی در محیط جامد

تمام باکتری‌های استفاده شده گرم منفی و به شکل باسیل (میله‌ای) بودند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده باکتری و روز در تمام صفات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار و اثر دوگانه باکتری و روز فقط بر قطر هاله (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار بوده است (نتایج نشان داده نشده است).

الف-۱-مقایسه اثر باکتری و روز بر قطر هاله، قطر کلنی و قطر هاله به قطر کلنی

مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و اثر اصلی روز را بر قطر کلنی در شکل ۱ (الف و ب) نشان داده شده است. در شکل ۱-الف ، مشاهده می‌شود باکتری p43-1، p56-2، p60-1، p55-2 و p55-2 اثر یکسان و مشابه و باکتری‌هایp39، p21-1 و p72-2 اثر یکسان و مشابه بر روی قطر کلنی اثر گذاشتند، ولی اختلاف معنی‌داری باهم ندارند. در بین این باکتری‌ها، باکتری p3 بیشترین اثر معنی‌داری بر قطر کلنی نشان داد. شکل (۱-ب) میانگین اثر اصلی روز را نشان می‌دهد که حداکثر قطر کلنی در روز چهاردهم می‌باشد. مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری، روز را بر قطر هاله در شکل ۱ (ت و ث) مشاهده می‌شود. نمودار مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله (شکل ۱-ت)، نشان داد که باکتری P_{21-1} بزرگترین قطر هاله را دارد. شکل ۱-ث، مشاهده می‌شود که در روز چهاردهم بزرگترین قطر هاله را داشتند. شکل۱ ج و د، به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر باکتری و روز را بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۱-ج، تیمار P_{21-1} بیشترین تاثیر را بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی داشته و در مورد اثر روز بر این صفت بیش‌ترین قطر هاله نسبت به قطر کلنی در روز چهاردهم مشاهده شد.



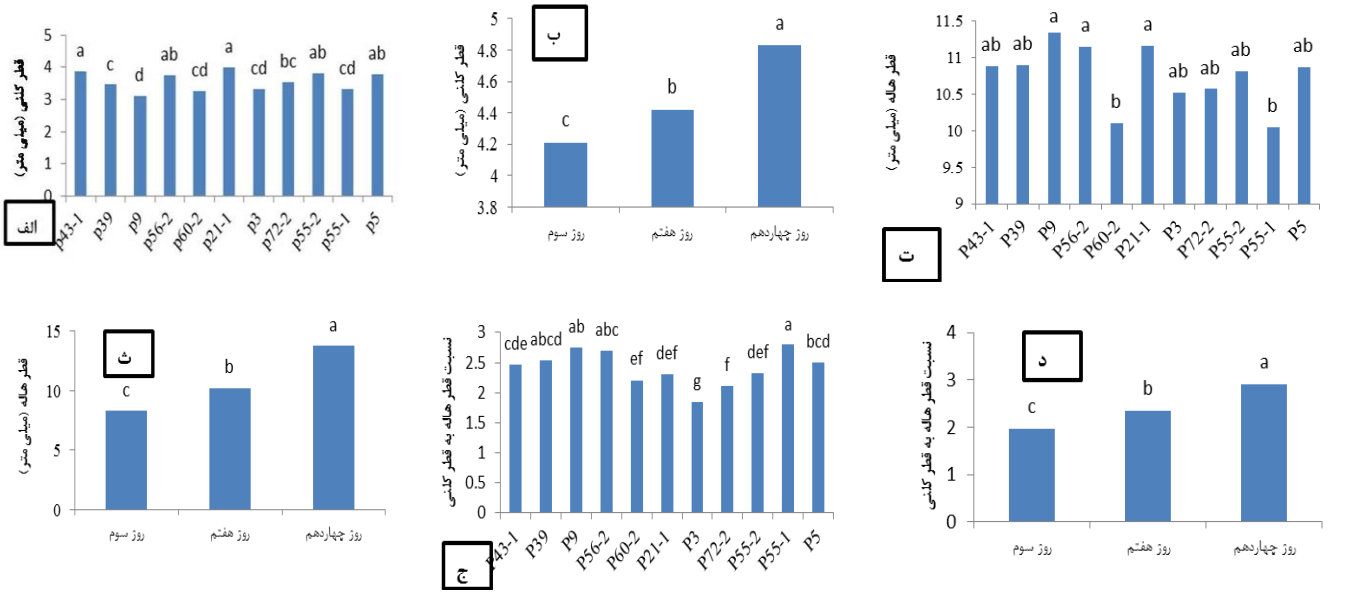
شکل ۱- الف) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر کلنی ب) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر کلنی ت) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر هاله ث) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر هاله ج) مقایسه اثر اصلی باکتری بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی د) مقایسه اثر اصلی روز بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی

الف-۲- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان حل فسفات معدنی در محیط جامد در درجه حرارت‌های مختلف

نتایج تجزیه واریانس نشان داد (نتایج نشان داده نشده است) اثر ساده باکتری، روز و اثرات متقابل باکتری و روز در تمام خصوصیات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار است. در دمای ۴۰ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رشدی مشاهده نشد. به‌وجود آمدن منطقه روشن اطراف کلنی میکروارگانیسم‌ها در پلیت نشان‌دهنده وجود میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است (فلاح، ۱۳۸۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود در مورد تاثیر روز، بالاترین قطر کلنی در روز چهاردهم بود و کمترین در روز سوم مشاهده شد و گذشت زمان اثر مثبتی بر بزرگ‌تر شدن قطر کلنی داشته است (شکل ۲-ب). بعضی گونه‌های باکتریایی توانایی معدنی کردن و حل کردن را به‌ترتیب برای فسفرآلی و غیرآلی دارند (Khiari and Parent, 2005). بیشترین تاثیر را باکتری P_{21-1} در روز چهاردهم و کمترین تاثیر را باکتری P_{55-1} در روز سوم بر قطر هاله داشته است. شکل ۲- ت و ث، به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر باکتری و روز بر قطر هاله نشان می‌دهند. بیشترین تاثیر را باکتری P_9 وکمترین تاثیر را باکتری P_{55-1} بر قطر هاله داشته است. و مشابه اثر روز بر قطر کلنی در اینجا هم قطر هاله در روز چهاردهم بیشترین مقدار و در روز سوم کمترین مقدار را نشان داده است. شکل ۲ (ج و د) به ترتیب اثر باکتری بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی و مقایسه اثر روز بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی در محیط جامد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد را نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۲-ج به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را باکتری‌های P_{55-1} و P_3 نشان دادند. در روز چهاردهم بیشترین و روز سوم کمترین تاثیر بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی مشاهده شد به‌طور کلی افزایش تعداد و تنوع میکروارگانیسم‌ها و اثرات متقابل جوامع میکروبی باعث افزایش تعداد و تنوع اسیدهای آلی موثر در فرایند انحلال فسفات‌های نامحلول می‌شود (Sharma, 2002).

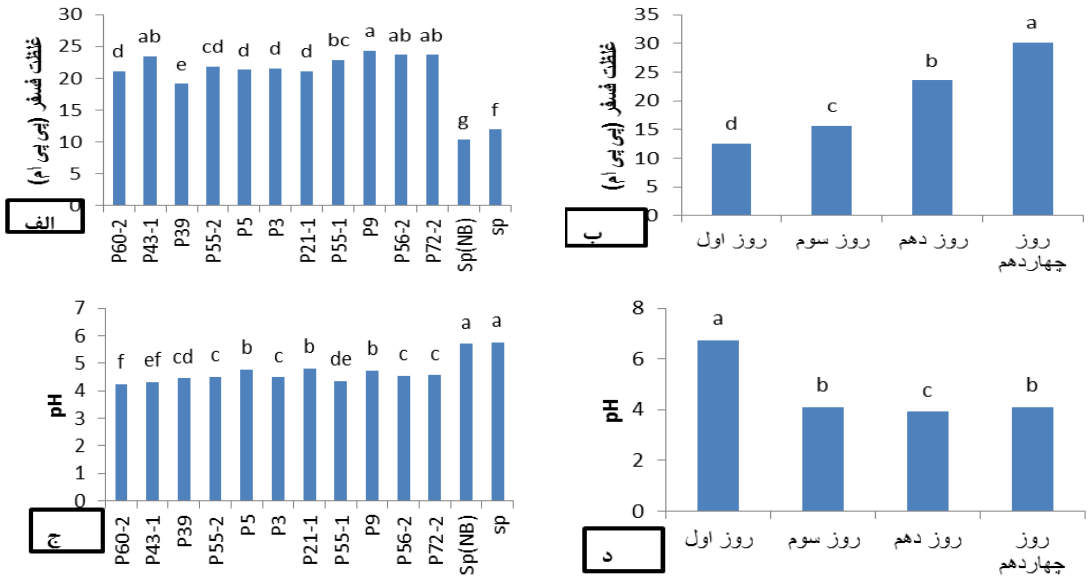
ب- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان آزادسازی فسفر در محیط مایع

نتایج تجزیه واریانس (نتایج نشان داده نشده است) اثر باکتری، روز و اثر متقابل باکتری و روز بر غلظت فسفر و pH معنی‌دار (در سطح احتمال یک درصد) شدند.



شکل ۲- الف) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر کلنی، ب) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر کلنی، ت)مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله، ث) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر هاله، ج) مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی، د) مقایسه اثر روز بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی

شکل ۳ (الف و ب) به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و روز را بر غلظت فسفر نشان می‌دهند. باکتری P_9 بیش‌ترین تاثیر را بر غلظت فسفر داشت و کمترین تاثیر را باکتری sp(NB) نشان داد. در مورد زمان روز چهاردهم بالاترین اثر و روز اول کمترین اثر را داشته است. در واقع از روز سوم تا روز چهاردهم غلظت فسفر به آرامی افزایش یافته است. کشت‌های مخلوط میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات (باسیلوس، استرپتومایسس، پسودوموناس و غیره) در معدنی کردن فسفات آلی بسیار موثر هستند (Molla و همکاران، ۱۹۸۴). شکل ۳ (ج و د) به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و روز را بر pH نشان می‌دهند. بالاترین و کمترین pH را به‌ترتیب باکتری‌های sp و p_{60-2} نشان دادند. در مورد اثرات روز بالاترین pH در روز اول و پایین‌ترین در روز دهم می‌باشد. مقدار فسفر محلول و pH آن در طی ۱۴ روز از کشت باکتری‌ها در محیط حاوی تری‌کلسیم‌فسفات اندازه‌گیری شد که فسفات محلول در طی ۱۰ روز، افزایش و سپس کاهش داشت و با افزایش فسفر pH کاهش یافت(Taha et al, 1969). ارتباط مشخصی بین کاهش در مقدار pH، افزایش فعالیت فسفاتاز و فسفر قابل‌دسترس در محیط کشت مایع پیکووسکایا وجود دارد (Schoebitz و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به شکل ۳-د pH در روز دهم کاهش و در روز چهاردهم دوباره افزایش یافته است و با pH در روز سوم در یک سطح قرار گرفته‌اند. کیوسی (۱۹۸۳) در پژوهش خود دریافت که چهار جدایه باکتریایی که توانایی حل کردن فسفات را در PDYA داشتند توانایی بسیار کمتری در محلول حاوی سنگ فسفات از خود نشان دادند. pH محیط در تمام موارد کاهش داشته ولی هیچ رابطه‌ای بین کاهش pH و افزایش فسفر آزاد شده وجود نداشت .بین میزان فسفر انحلال یافته و pH محیط همبستگی منفی وجود دارد (r^2=۰/۸۲)، به طوری که با افزایش میزان انحلال، pH محیط بیشتر کاهش می‌یابد (مراد خانلو و همکاران، ۱۳۹۰).



شکل ۳- الف) مقایسه اثر باکتری بر غلظت فسفر ب) مقایسه اثر روز بر غلظت فسفر ج) مقایسه اثر باکتری های حل کننده فسفات بر pH د) مقایسه اثر روز بر مقدار pH

نتیجه گیری

در بررسی قدرت باکتری‌ها درانحلال فسفات در محیط جامد مشخص شد که در روز چهاردهم قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی بالاتر است. بررسی توانایی انحلال فسفات توسط باکتری‌های حل کننده فسفات در محیط جامد در دماهای ۲۸ و ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد نیز بررسی شد که در دماهای ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیچ رشدی مشاهده نگردید و این ممکن است به‌دلیل از بین رفتن این باکتری‌ها در درجه حرارت‌های بالاتر باشد. در محیط مایع مشخص شد که در روز چهاردهم بیشترین غلظت فسفر را داشتیم و در محیط مایع شاهد یعنی محیط مایع

اسپربر بدون باکتری و محیط مایع اسپربر همراه با محیط مایع نوترینت براث بدون تلقیح باکتری بالاترین pH مشاهده شد. تیمار P_{56-2} در روز چهاردهم تاثیر زیادی بر غلظت فسفر در محیط مایع داشته و تیمار P_{21-1} در روز اول بیشترین pH را نشان داده است.

منابع

فلاح نصرت آباد، ع.ر. ۱۳۸۲. بررسی پراکنش میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های استان گیلان و اثربخشی آن‌ها در عملکرد گندم و برنج. پایان نامه دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۴ ص.

مرادخانلو، د.س.، علیخانی، ح.ع. و علی عبادی نهاری، ع.۱۳۹۰. ارزیابی توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی توسط باکتری های ریزوبیومی. اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه.

Babalola, O.O. and. Glick, B.R. 2012. Indigenous African agriculture and plant associated microbes: current practice and future transgenic prospects." Scientific Research and Essays, 28, 2431-2439.

Behera, BC., Yadav, H., Singh, SK., Mishra, RR., Sethi, BK. and Dutta, SK. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of Serratia SP. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15, 169-178.

Istina, I.N., Widiastuti, H., Benny, J. and Antralina, M. 2015. Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake." Procedia Food Science, 3, 426-435.

Khiari, L. Parent, L., E. 2005. Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry swin e manure can. J. soil sci. 85: 75-87.

Kumar, K., Chitralekha, N.D. and Debabrata, D. 2014. Cell growth kinetics of Chlorella sorokiniana and nutritional values of its biomass." Bioresource technology, 167, 358-366.

Liu, Z., Li, YC., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, JS., Zhang, M. 2015. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Applied Soil Ecology, 96, 217-224.

Molla, M. A. Z., Chowdhury, A.A., Islam, A. and Hoque, S. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant soil,78, 393-399.

Paul, D. and Sinha, SN. 2013. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. Advances in Applied Science Research, 4, 409-412.

Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F.2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan of Jurnal Biological Science, 7, 187-196.

Sharma, A. K. 2002. Bio-fertilizers for sustainable agriculture. Agrobios Indian publications. 456 pp.

Spagnoletti, FN., Tobar, NE., Fernandez, Di., Pardo, A., Chioccchio, VM. and Lavado, RS. 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium iron and aluminum phosphates. Applied Soil Ecology, 111, 25-32.

Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res,9, 778-781

Steel, R.D. and Tore, J.H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw-Hill, Toronto, 481 pp.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Investigation of the Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Solubility of Insoluble Phosphate in a Solid and Liquid Culture medium at different temperatures

Alireza Fallah Nosratabad[1], Azadeh Sedaghat [*2]

[1] Associate Professor of Soil Biology Research, Soil and Water Research Institute, Research, Education and Agricultural Extension Organization, Karaj, Iran

[2] Ph.D Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Due to the high pH of soils in Iran, the absorption of nutrients by plants, especially the absorption of phosphorus is difficult. The purpose of this study was to investigate the solubility of phosphate by bacteria in solid and liquid Culture media at different temperatures. In this research, the treatments included 11 bacteria (P43-1, P39, P9, P56-2, P60-2, P21-1, P3, P72-2, P55-2, P55-1 and P5). The results of analysis of variance showed the simple effect of bacteria, day and the interaction between bacteria and day on all characteristics of colony diameter, halo diameter and halo diameter to colony diameter in solid and liquid medium at 28 ° C (at a probability level of 1%) is significant. Growth was not observed at 40 ° C and 60 ° C. Therefore, the results of this study showed that phosphate solubilizing bacteria are sensitive to temperature increase and do not grow at higher temperatures and the results of this study showed that the amount of phosphorus release from the medium increased over time and the bacterial function increased in the production of transparent halo and colony

Keywords: Phosphate Solubilizing Bacteria, Solid, Broth, Halo zone

[*] Corresponding author, Email: Azadehsedaghat65@gmail.com