جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات و بررسی برخی از فاکتورهای تحریک‌کنندگی رشد آن‌ها

الهام عرب عامری [۱]،محسن علمایی [۲]، رضا قربانی نصرآبادی [۳]، سید علیرضا موحدی نائینی [۲]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک،۲- دانشیار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،۳- استادیار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده
پتاسیم یکی از عناصر غذایی ضروری پرمصرف برای گیاهان است که نقش مهمی در رشد و نمو آن‌ها ایفا می‌کند. باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات (Silicate Dissolving Bacteria) به گروهی از باکتری‌ها گفته می‌شود که با استفاده ازروش‌های ویژه‌ایی چون ترشح اسیدهای آلی، باعث تبدیل پتاسیم غیرقابل استفاده به شکل‌های قابل استفاده برای گیاه می‌شوند. در این تحقیق به‌منظور تعیین حضور و میزان کارآیی این باکتری‌ها تعداد ۱۲ نمونه از خاک‌های ریزوسفری مزارع گندم استان گلستان مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد ۴۴ جدایه با استفاده از محیط اختصاصی الکساندروف به عنوان باکتری‌های سیلیکاتی جداسازی شدند. براساس بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی این باکتری‌ها از جنس سودوموناس و برخی دارای ویژگی‌هایی نزدیک به گونه سودوموناسپوتیدا بودند. پس از خالص‌سازی آزمایشی جهت اندازه‌گیری حلالیت پتاسیم از کانی موسکویت در محیط کشت الکساندروف و حلالیت فسفر از ترکیب ماده‌ی تری‌کلسیم‌فسفات در محیط کشت NBRIP مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیشترین و کمترین انحلال پتاسیم در زمان ۹۶ساعت به میزان ۶/۳۶ و ۹/۷ میلی‌گرم بر لیتر و مقدار فسفر حل شده در زمان ۷۲ به میزان ۵/۳۰۸ و ۲۹ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

واژگان کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات، سودوموناس، PGPR

مقدمه
کاربرد کودهای زیستی به ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاه، مهم‌ترین راهبرد در مدیریت تلفیقی تغذیه گیاهی برای سیستم کشاورزی پایدار می‌باشد. مصرف کودهای زیستی بدون نگرانی از اثرات سوء زیست‌محیطی غالبا موجب بهبود شرایط فیزیکی شیمیایی و زیستی خاک‌ها شده و افزایش حاصلخیزی و باروری اراضی را به دنبال دارند. علاوه بر این، کاربرد روش‌های زیستی برای تولید بیشتر می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های کیفیت خاک و در نهایت کشاورزی پایدار، به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک شود. پتاسیم یکی از عناصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان زراعی می‌باشد و در حفظ فعالیت آنزیم‌ها، حفظ تورژسانس سلول، افزایش فتوسنتز، کمک در انتقال قند و نشاسته، کمک در جذب نیتروژن و برای سنتز پروتئین ضروری است. علاوه بر متابولیسم گیاه، پتاسیم باعث بهبود کیفیت محصول می‌شود. زیرا پتاسیم در پر کردن دانه، وزن دانه، افزیش مقاومت به بیماری نقش داشته و علاوه بر آن منجر به افزایش مقاومت گیاه در مقابل استرس‌های محیطی می‌شود (طباطبایی ۱۳۸۸). گرچه کمبود پتاسیم مثل کمبود نیتروژن و فسفر گسترده نیست اما بسیاری از خاک‌ها که در ابتدا از نظر این عنصر غنی بودند به علت برداشت متوالی محصول، رواناب، آبشویی و فرسایش خاک با کمبود این عنصر مواجه شده‌اند (شنگ و هانگ ۲۰۰۲). هو و همکاران (۲۰۰۶) دو سویه از باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم را از خاک جداسازی کرده، این دو سویه به طور معناداری قادر به آزادسازی پتاسیم از کانی پتاسیم‌دار موجود در محیط کشت الکساندروف بودند. ساگمارن و جانارتانم (۲۰۰۷) باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم را از خاک، سنگ‌ها و نمونه‌های معدنی جداسازی کردند و تاثیر این باکتری‌ها را در آزادسازی پتاسیم از ارتوکلاز، میکروکلین و میکای مسکوویت مطالعه کردند. هان و همکاران (۲۰۰۵) تاثیر باکتری های حل‌کننده پتاسیم و فسفر را بر رشد گیاه بادنجان بررسی کرده و باعث افزایش قابلیت استفاده پتاسیم و فسفر در خاک و بهبود رشد گیاه می‌شوند.
هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات از ریزوسفر گیاه گندم و بررسی توان حل‌کنندگی پتاسیم و فسفات نامحلول می‌باشد.

مواد و روش‌ها
نمونه‌برداری: به منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات نمونه‌برداری از خاک ریزسفری مزارع گندم استان گلستان صورت گرفت و تعداد ۱۲ نمونه به همراه ریشه از مزارع مختلف استان جمع‌آوری شد.
جداسازی و خالص‌سازی باکتری: از هریک از نمونه‌های خاک ۱ گرم به ۱۰۰ سی‌سی آب معمولی استریل شده در ارلن ۲۵۰ سی‌سی اضافه و ۱ ساعت شیک شد، وپس از تهیه سری رقت 10^{-4} و 10^{-5} یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به محیط کشت اختصاصی اسپربر تلقیح شد.ترکیبات موجود در محیط بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰Glucose,۵/۰ Yeast extract,۱/۰ $CaCl_2$,۲/۰$MgSO_4$.$7H_2O$,۵$Ca_3(PO_4)_2$می‌باشد (مهتا و نوتیال ۲۰۰۱). کلنی‌های هاله‌دار بعد از چندین بار تجدید کشت به منظور برآورد مقدار حلالیت پتاسیم به محیط کشت الکساندروف انتقال دادهشدند. شناسایی ایزوله‌ها براساس روش میکروسکوپی و رنگ آمیزی و آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بر روی جدایه‌ها صورت گرفت.

جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات از تست گرم، اکسیداز و کاتالاز استفاده شد

ویژگی‌های فیزیولوژیکی جدایه‌های *Pseudomonas* spp

به‌منظور شناسایی گونه جدایه‌ها، از آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مندرج در کتاب Bergey استفاده شد. برای این منظور، بر روی کلیه جدایه‌ها آزمون‌های رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، آزمون ذوب ژلاتین،تست مالات، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و استفاده از قند گلوکز انجام گرفت (گاردنر و همکاران، ۱۹۸۴)،توانایی ایجاد دنیتریفیکاسیون(رجب زاده و همکاران ۱۳۸۸).

آزمون‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه:

در این آزمایش، ۲ خصوصیت از ویژگی‌های PGPR شامل انحلال فسفات‌معدنی نامحلول وتوانایی انحلال پتاسیم نامحلول بر روی ۴۴ جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمون کمی توانایی انحلال پتاسیم نامحلول: از کشت تازه باکتری به وسیله لوپ فلزی کلونی باکتری، به ۲۵ میلی‌لیتر محیط King B مایع تلقیح شد. ترکیبات موجود در محیط بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰ میلی‌لیتر , , Glycerol۵/۱ , $MgSO_4.7H_2O$۵/۱ Pepton ۲۰ K_2HPO_4 می‌باشد (رسولی صدقیانی و همکاران ۱۳۸۴). پس از سپری شدن ۴۸ ساعت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف افزوده و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد.در زمان‌های ۷۲و ۹۶ ساعت، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن به وسیله دستگاه شعله‌سنج (فلیم‌فتومتر) غلظت پتاسیم اندازه‌گیری شد. ترکیبات محیط کشت الکساندروفبر حسب گرم در لیتر شامل: ۲ پودر میکا ,۰۰۲/۰ $FeCl_3$,۰۰۵/۰ $CaCO_3$,۱/۰ $MgSO_4.7H_2O$,۰/۰۴۵ $NaHMoO_4$ و ۵ ساکارز می‌باشد(ساوستین، ۱۹۷۱).

آزمون کمی توان حلالیت فسفات معدنی نامحلول: به‌منظور اندازه‌گیری میزان حلالیت فسفر در محیط مایع ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط NBRIPمنتقل گردید (Sangeeta ۲۰۰۱). سپس نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. سپس میزان حلالیت فسفر به وسیله میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر توسط باکتری با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف تری‌کلسیم‌فسفات محاسبه گردید. ترکیبات محیط کشت NBRIPبر حسب گرم در لیترشامل: ۱۰ گلوکز ,۵ $Ca_3(PO_4)_2$ ۲ $(NH_4)_2SO_4$,۱/۰ $MgSO_4.7H_2O$,۲۵/۰ KCl ,۲/۰ $MgCl_2.6H_2O$می‌باشد.

نتایج و بحث

کشت رقت‌های مختلف خاک بر روی محیط کشت اسپربر نشان داد که بعضی از این خاک‌ها حاوی باکتری‌های سیلیکاتی می‌باشند. مشخصات مرفولوژیک و بیوشیمیایی آزمایش‌های مختلف روی این باکتری‌ها در جدول زیر آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این باکتری‌ها از جنس سودوموناس می‌باشند. نتایج به دست آمده از آزمون‌های مربوط به جداسازی گونه در جدول ۱آمده است.

جدول ۱-آزمون مربوط به شناسایی و گروه‌بندی گونه‌های جنسsppPseudomonas

	شماره جدایه	تعداد جدایه	ذوب ژلاتین	رشد در دمای ۴ درجه رشد در دمای ۴۲ درجه	مالات	دنیتریفیکاسیون	اکسید از	توانایی تولید قند از اسید	گونه پیشنهادی
۱۵-۴۱-۲-۳-۳۷-۳۰-۷-۱۸-۴۳-۲۶--۲۳-۳۴-۲۹-۱۴-۸-۴۰-۴۲	۱۷	-	+	-	-	+	+	+	p.stutzeri
۳۲-۱۳-۱۲-۳۱-۲۰-۱-۱۶---۱۹-۱۷۳۹-۲۴	۱۱	-	-	+	-	-	*	*	P.putida
۴۴-۳۸-۳۵--۳۳-۲۸۶-۵-۳۶-۲۲-۲۵-۱۱-۲۷-۱۰-۹-۴-۲۱	۱۶	+	+	-	*	+	*	+	P.aeruginosa

* اندازه‌گیری نشده

اندازه گیری کمی حلالیت پتاسیم موجود در کانی مسکویت: با توجه به جدول ۲، بیشترین مقدار پتاسیم حل شده در زمان ۹۶ ساعت مربوط به جدایه ۲۴ و کم‌ترین مربوط به جدایه ۲۳ می‌باشد.

جدول۲-اندازگیری مقدار حلالیت پتاسیم در جدایه‌های مختلف باکتری

قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	شماره ایزوله	قرائت در ۹۶ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	شماره ایزوله
۹/۷	۶/۱۱	۲۳	۰/۲۹ ۶/۲۶	۱	
۶/۳۶	۵/۳۱	۲۴	۵/۱۴	۳/۱۲	۲
۵/۲۴	۹/۳۰	۲۵	۷/۱۲	۵/۱۱	۳
۱/۱۶	۵/۱۳	۲۶	۲/۱۹	۴/۱۶	۴
۴/۱۰	۲/۹	۲۷	۰/۲۱	۹/۱۸	۵
۳/۲۷	۷/۲۲	۲۸	۲/۱۹	۲/۱۵	۶
۲/۸	۸/۹	۲۹	۷/۱۷	۹/۲۰	۷
۸/۱۵	۵/۱۳	۳۰	۰/۱۹	۵/۱۷	۸
۶/۹	۵/۷	۳۱	۷/۲۰	۴/۱۹	۹
۱/۲۱	۸/۲۵	۳۲	۹/۱۹	۹/۱۸	۱۰
۵/۱۳	۹/۷	۳۳	۳/۲۵	۵/۲۱	۱۱
۸/۱۲	۷/۱۴	۳۴	۰/۱۴	۲/۱۲	۱۲
۳/۱۶	۰/۱۳	۳۵	۴/۲۰	۱/۱۹	۱۳
۹/۱۹	۶/۲۱	۳۶	۰/۱۸	۱/۱۶	۱۴
۲/۱۶	۷/۱۷	۳۷	۱/۲۱	۹/۱۸	۱۵
۹/۱۱	۳/۸	۳۸	۴/۱۸	۳/۱۶	۱۶
۲/۱۳	۲/۹	۳۹	۶/۱۳	۶/۱۱	۱۷
۸/۲۴	۵/۲۶	۴۰	۶/۱۴	۲/۱۳	۱۸
۷/۱۳	۴/۱۰	۴۱	۹/۱۴	۵/۱۵	۱۹
۸/۲۱	۶/۲۷	۴۲	۵/۱۸	۲/۱۹	۲۰
۳/۱۹	۶/۱۵ ۴۳	۴/۳۰	۳/۲۸	۲۱	
۵/۲۶	۲/۲۴	۴۴	۵/۱۰	۷/۷	۲۲

اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات‌معدنی : با توجه به جدول ۳ ، تمام ۴۴ جدایه توانایی انحلال فسفر را داشتند. بیشترین میزان انحلال فسفر در زمان ۷۲ ساعت بوده است و در این زمان بیشترین میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ۲۴ و کمترین میزان انحلال مربوط به جدایه شماره ۱۴ می‌باشد. از مجموع جدایه‌های مورد بررسی تعداد ۱۴ جدایه بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فسفر را در محیط مایع آزاد نمودند.

جدول۳-اندازگیری مقدار حلالیت فسفر در جدایه‌های مختلف باکتری

قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۴۸ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	شماره ایزوله	قرائت در ۷۲ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	قرائت در ۴۸ ساعت (میلی‌گرم در لیتر)	شماره ایزوله
۶/۱۸۴	۶/۱۹۹	۲۳	۱/۲۰۹	۲/۱۹۶	۱
۵/۳۰۸	۴/۲۵۱	۲۴	۹/۱۶۲	۷/۱۱۰	۲
۶/۱۹۳	۶/۱۸۴	۲۵	۶/۲۰۰	۵/۱۰۴	۳
۷/۹۷	۲/۱۰۶	۲۶	۵/۸۸	۱/۳۷	۴
۸/۴۰	۸/۳۷	۲۷	۶/۳۸	۰/۳۱	۵
۳/۲۷۷	۳/۲۲۴	۲۸	۰/۳۴	۵/۲۵	۶

۷	۹/۳۲	۰/۴۵	۲۹	۶/۹۸	۷/۸۰
۸	۱/۱۸۹	۱/۱۹۲	۳۰	۹/۴۹	۶/۵۰
۹	۰/۲۰۶	۶/۲۴۱	۳۱	۱/۱۰۰	۹/۱۲۰
۱۰	۵/۱۶۶	۱/۱۸۳	۳۲	۹/۱۴۶	۲/۱۶۲
۱۱	۶/۲۰۳	۶/۲۶۱	۳۳	۵/۱۲۰	۱/۱۰۰
۱۲	۴/۴۸	۰/۵۱	۳۴	۰/۱۹۳	۳/۲۲۱
۱۳	۰/۱۷۷	۱/۲۰۱	۳۵	۵/۶۵	۸/۶۳
۱۴	۳/۲۷	۰/۲۹	۳۶	۹/۱۴۹	۲/۱۳۸
۱۵	۵/۱۷۵	۷/۲۰۲	۳۷	۲/۵۰	۶/۹۲
۱۶	۲/۱۰۳	۷/۷۸	۳۸	۹/۱۲۱	۶/۱۳۳
۱۷	۲/۱۵۷	۰/۱۰۰	۳۹	۱/۱۴۴	۵/۲۱۸
۱۸	۶/۴۷	۵/۴۹	۴۰	۸/۱۳۱	۶/۲۰۰
۱۹	۰/۲۰۰	۰/۱۷۶	۴۱	۰/۷۹	۱/۱۰۰
۲۰	۵/۱۷۸	۶/۱۸۱	۴۲	۰/۱۷۷	۶/۱۸۰
۲۱	۲/۲۰۷	۸/۲۳۲	۴۳	۵/۱۰۹	۰/۹۸
	۲۲	۱/۲۴۱	۴/۲۶ ۴	۷/۲۰۵ ۴۴	۳/۲۵۳

منابع

رجب‌زاده،ف.۱۳۸۸.جداسازي،شناسايي و به كارگيري باكتري Azospirillumspp. از باكتري‌هاي PGPRدر افزايش رشد برنج در شرايط گلخانه‌اي.پايان‌نامه كارشناسي ارشد. دانشكده علوم زراعي دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي گرگان.۱۴۲ص.

رسولی صدقیانی، ح.، خاوری، ک. رحیمیان، ح. ملکوتی، م. ج. و اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۴. بررسی تراکم جمعیت و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله خاک و آب. جلد ۱۹. شماره ۲. مؤسسه تحقیقات خاک و آب. تهران. ایران.

طباطبایی ج، ۱۳۸۸. اصول تغذیه معدنی گیاهان، چاپ اول. انتشارات دانشگاه تبریز.

Gardner, J.M., Chandler, J.L., Feldman, A.W. ۱۹۸۴. Growth promotion and inhabition by antibiotic-producing *Pseudomonasfluorescent* on citrus roots. Plant and Soil, ۷۷: ۱۰۳-۱۱۳.

Han, H.S., Lee, K.D., ۲۰۰۵. Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences ۱(۲):

Hu, XF., Chen, J., Guo, JF., ۲۰۰۶. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannumountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology and biotechnology ۲۲: ۹۸۳-۹۹۰.

Mehta, S., and Nautiyal, C. S. ۲۰۰۱. An efficient method for qualitativa screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiol. ۴۳: ۵۱-۵۶.

Sangeeta, M., Chandra, S. N. ۲۰۰۱. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. Current Microbiology Vol. ۴۳, pp. ۵۱-۵۶.

Savostin, P. ۱۹۷۱. Microbial Transformation of Silicates. Pflanzenernahr-bodenk. ۱۳۲: ۳۷-۴۵.

Sheng XF and huang WY, ۲۰۰۲. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria acientia. Agricultura sinica ۳۵: ۶۷۳-۶۷۷.

Sugumaran, P., Janarthanam, B., ۲۰۰۷. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural science. ۳:۳۵۰-۳۵۵.

Abstract

Potassium is one of the essential and macro nutrientsfor plantsthatplayan important role ingrowth anddevelopment.Silicate solubilizing bacteria is one of the groups of bacteriaspecial which techniques such as the secretion of organic acids, makes unusable potassium to usable forms for the plant. This study is to determine thepresence andeffectivenessof these bacteria that ۱۲ soils samples fromthe rhizosphere ofwheat fieldsin Golestan

provincewas assessedthata total of ۴۴ isolates using Aleksandrov environment assilicatebacteria were isolated. Based on the analysisof microscopicandbiochemical testsofthe bacteria that most of this bacteria are the genusPseudomonasputidaand some of them have a featuresthatweresoclose to this genus. After purification test to measure the solubility of the mineral muscovite potassium in the Aleksandrov medium and tricalcium phosphate material n the NBRIP medium was studied in vitro.The highest and lowest potassium dissolution was at ۹۶ hours by۳۶/۶ and ۷/۹ mg per liter respectively. The highest and lowest amount of phosphorus dissolved in ۷۲ hours is the amount of ۳۰۸/۵ and ۲۹mg per liter respectively.

Keywords: Silicate Dissolving Bacteria, Pseudomonas, PGPR