

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات متحمل به نمک، pHهای مختلف و گرما از خاک‌های ایران

ملبوی محمدعلی^{۱*}، اولیاء پرویز^{۲*}، ساروخانی الهه^۳، بهبهانی ماندانا^۴، دلجو علی^۵، مدنی حمید^۶ رادکیش ساکی مریم^۷، حمیده حسین زاده^۷
۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری صندوق پستی ۶۳۳۳-۱۴۱۵۵، ۲- دانشگاه شاهد، صندوق پستی ۷۴۳۵-۱۴۱۵۵-۳ بخش
میکروبیولوژی جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، ۴- دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۵- دانشکده کشاورزی، دانشگاه همدان، ۶- دانشکده
کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، ۷- شرکت زیست‌فناور سبز
** نویسنده مکاتبه کننده.

چکیده

با غربالگری نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران، ۲۲ جدایه باکتری حل‌کننده فسفات بدست آمد. دو جدایه به عنوان P5 و P7 بزرگترین هاله شفاف را در محیط کشت اسپربر حاوی فسفات نامحلول ایجاد نمودند. جدایه دیگر به عنوان P13 فعالیت فسفاتنازی بالایی از خود نشان داد. میزان رشد باکتریایی و فعالیت‌های حلالیت فسفات تحت شرایط محیطی مورد مطالعه قرار گرفت. در مجموع هر سه PSB قادر به مقاومت در برابر افزایش سطح دما، pH و غلظت نمک بالا بودند. باکتری‌های جدا شده به خوبی با ریزسازواره‌های موجود در خاک سازگاری داشتند. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، افزایش جمعیت P13 با ریشه گیاه سیب‌زمینی همبستگی معنی‌داری داشت، در صورتی که دو سویه دیگر معنی‌دار نبود. اثربخشی این باکتری‌ها بر عملکرد سیب زمینی در آزمایش‌های مزرعه‌ای آماری و مشاهده‌ای مورد مطالعه قرار گرفت و افزایش ۱۳ درصدی محصول به طور میانگین مشاهده گشت.

کلمات کلیدی: کود زیستی، باکتری حل‌کننده فسفات، سیب‌زمینی

مقدمه

فسفر یکی از مهمترین عناصر غذایی مورد نیاز برای رشد گیاهان می‌باشد و در تمامی موجودات زنده وجود دارد. گیاهان فسفر را فقط به شکل یون‌های HPO_4^{2-} و $H_2PO_4^-$ جذب می‌کنند. تا کنون از کودهای شیمیایی فسفات برای حل این مشکل استفاده شده است. ولی در عمل درصد بالایی از کودهای مصرفی با یون‌های خاک ترکیب و به صورت غیرمحلول و غیرقابل جذب در می‌آیند. باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات قادرند بر روی محیط‌های کشت حاوی فسفات تری‌کلسیم، آپاتیت یا سایر مواد نامحلول فسفر معدنی با منشاء طبیعی رشد نمایند. چنانچه این ترکیبات را به صورت سوسپانسیون در محیط کشت جامد اضافه کنیم، به راحتی می‌توان باکتری‌های حل‌کننده فسفات را از طریق مشاهده هاله شفاف ایجاد شده در اطراف کلنی شناسایی کرد. محققین متعددی توانسته‌اند با استفاده از این روش ریزسازواره‌های حل‌کننده فسفات را از منابع مختلف جدا نمایند. در این تحقیق، باکتری‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های ایران جدا شده و برخی ویژگی‌های آن‌ها بررسی شده است.^(۱)

مواد و روش‌ها

تعداد ۷۴ نمونه خاک از مناطق مختلف شامل نمونه خاک مزارع، بیابان، جنگل، باغ، مراتع و غیره جمع‌آوری شد. به منظور نمونه‌گیری، از عمق حدود ۱۰ سانتی‌متری برداشت شده و در درون ظرف سترون در پوش‌دار ریخته شد. مقدار یک گرم خاک برای ساخت سریال‌های رقت ۱۰ گانه (تا ۱۰-۱۰) تهیه شد. از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت اسپربر جامد.^(۲) حاوی ۲/۵ گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات تلقیح و به طور کامل در سطح پلیت پخش می‌شد. محیط‌های تلقیح شده یک هفته در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد. بعد از شناسایی کلنی‌های با هاله روشن، از آنها آنقدر

کشت مجدد داده می‌شد تا به صورت خالص جداسازی شوند. برای تعیین قدرت حل‌کنندگی فسفات باکتری‌ها و مقایسه آنها با یکدیگر، از کشت‌های جوان در نرمال سالین سوسپانسیون با کدورت معادل یک مک فارلند تهیه شد. از این سوسپانسیون مقدار ۲۵ میکرولیتر به صورت دایره‌ای به قطر نیم سانتیمتر در مرکز محیط اسپریر تلقیح گردید و در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتیگراد در گرمخانه نگهداری گردید. توانایی تولید آنزیم فسفاتاز در حضور فسفات نامحلول و فسفات محلول مورد ارزیابی قرار گرفت. در حالت اول به محیط کشت اسپریر معمولی مقدار ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیب^۱ BCIP اضافه شد. سپس در زمانهای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت و یک هفته از نظر فعالیت آنزیم فسفاتاز مورد بررسی مشاهده‌ای قرار گرفت. اثر برخی از عوامل محیطی بر روی این باکتری‌ها بررسی شد. برای این منظور در یک سری آزمایشهای کمی و کیفی اثر شرایط مختلف دما (۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد)، NaCl و pH (۵، ۶، ۷ و ۸ و ۹) مورد بررسی قرار گرفت. از این باکتری‌ها برای تعیین میزان اثربخشی در آزمایش‌های مزرعه‌ای متعددی و در سطح مزارع کشور استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

۷۴ نمونه خاک از نظر پروفیل باکتریایی که قادر به محلول سازی ترکیبات فسفره باشند، مورد بررسی قرار گرفتند. از این خاک‌ها مجموعاً تعداد ۲۲ سویه باکتری جدا شد که خاصیت حل‌کنندگی فسفات داشتند و در غربالگری اولیه دارای هاله روشن ناشی از حل کردن فسفات نامحلول بودند. با توجه به اینکه قطر هاله ایجاد شده در سویه‌های مختلف، متفاوت بود، لذا با یک روش استاندارد قطر هاله شفاف حاصل از حل‌کنندگی فسفات در ۲۲ سویه جدا شده به صورت مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در بین باکتری‌ها، سویه‌های P5 و P7 وسیع‌ترین هاله شفاف را تولید می‌کردند.

بررسی فعالیت آنزیم فسفاتاز باکتری‌ها

در این تحقیق از سوبسترای مصنوعی BCIP استفاده شد. این سوبسترا قبل از هیدرولیز شفاف می‌باشد. لکن پس از فعالیت آنزیمی و هیدرولیز آن بنیان برموکلووایندولیل که به رنگ آبی می‌باشد از گروه فسفات جدا می‌شود. تیرگی رنگ آبی می‌تواند به عنوان شاخصی از میزان فعالیت فسفاتازی باشد در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری P13 بیشترین فعالیت فسفاتازی را نشان می‌داد که هم در محیط کشت واجد فسفات محلول و هم در محیط کشت واجد تری‌کلسیم فسفات به خوبی مشهود بود.

تأثیر شرایط مختلف محیطی

بررسی‌ها در کشت جامد و مایع نشان داد، سه باکتری مذکور دارای توانایی بقا در شرایط دمایی تا ۴۵°C و pH ۳ تا ۱۱ و غلظت‌های مختلف نمک NaCl تا ۵ درصد می‌باشند. در شرایط سخت مانند دمای ۴۵°C رشد باکتری‌ها متوقف می‌شود ولی نمی‌میرند. توانایی حل‌کنندگی فسفات نیز تابعی از شرایط محیطی بود، گرچه در کلیه شرایط این فعالیت کمابیش حفظ می‌گردید. باکتری‌های جدا شده به خوبی با ریزسازواره‌های موجود در خاک سازگاری داشتند.

بررسی اثر بخشی باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر رشد گیاه سیب‌زمینی

نتایج حاصل از نمونه برداری از خاک گلدان‌های حاوی سویه‌های P5، P7 و P13 نشان‌دهنده افزایش جمعیت هر سه باکتری در منطقه ریزوسفر می‌باشد که در سویه P13 در $p < 0.01$ معنی‌دار بود و نشان‌دهنده همبستگی نزدیک باکتری P13 به‌طور معنی‌دار با ریشه گیاه سیب‌زمینی می‌باشد. آزمایش‌های مزرعه‌ای نیز حاکی از اثربخشی این باکتری‌ها بود.

همچنین گزارش‌های جمع آوری شده از ۷۷ مزرعه واجد قسمت‌های شاهد و تیمار از ۱۱ استان حاکی از این است که مصرف این باکتری‌ها (کود زیستی بارور-۲) به طور میانگین باعث ۱۳ درصد افزایش محصول شده است (جدول ۱).
جدول ۱ - خلاصه اطلاعات مربوط به افزایش محصول سیب‌زمینی در اثر استفاده از کود زیستی بارور-۲ در مقایسه با کود شیمیایی فسفات در استان‌های مختلف کشور می‌باشد.

ردیف	استان	تعداد گزارش	میانگین عملکرد در مزرعه شاهد (Kg/ha)	میانگین عملکرد در مزرعه بارور-۲ (Kg/ha)	میزان افزایش محصول (Kg)	افزایش محصول (درصد)
۱	آذربایجان شرقی	۸	۲۷۵۰۵	۳۲۷۰۴	۴۹۶۳	۱۸/۲
۲	آذربایجان غربی	۱	۲۳۰۰۰	۲۴۱۵۰	۱۱۵۰	۵
۳	اردبیل	۶	۲۷۱۶۷	۳۰۵۰۰	۳۳۳۳	۱۲/۸
۵	اصفهان	۲	۳۰۰۰۰	۳۳۰۰۰	۳۰۰۰	۱۳/۶
۶	چهارمحال و بختیاری	۱۰	۳۰۱۰۰	۳۱۴۷۵	۱۳۷۵	۵
۷	فارس	۳	۳۰۷۳۹	۳۳۹۶۴	۳۲۲۶	۱۰/۹
۸	کرمانشاه	۱	۲۴۰۰۰	۲۸۰۰۰	۴۰۰۰	۱۶/۷
۹	کردستان	۳	۳۰۰۰۰	۳۶۰۰۰	۶۰۰۰	۲۰
۱۰	مازندران	۱	۱۲۸۰۰	۱۸۸۰۰	۶۰۰۰	۴۶/۹
۱۱	مرکزی	۳۶	۲۹۵۶۷	۳۳۴۹۴	۳۹۲۸	۱۳/۵
۱۲	همدان	۶	۳۷۹۶۷	۴۰۹۱۷	۲۹۵۰	۸/۳
	میانگین کشوری		۲۹۵۸۵	۳۲۱۶۴	۲۵۷۹	۱۳

منابع:

- [1] Nautiyal, C. S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265-270.
- Igual, J. M., Valverde, A., Cervantes, E. and Velazquez, E. (2001) Phosphate solubilizing bacteria as inoculant for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie.* 21, 561- 568.
- [2] Sperber J.I. (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Agric Res.* vol.9: 778.

The isolation of phosphate solubilizing bacteria tolerant to salt, various pH and high temperature from Iranian soils

Malboobi MA¹, Owlia P², Sarokhani E³, Behbahani M⁴, Deljou A⁵, Madani H⁶, Radkish Saki M⁷, Hoseinzadeh H⁷

1. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, 2. Shahid University, 3. Applied Microbiology Group, Jahad Daneshgahi- Tehran Unit, 4. Isfahan Industry University, 5. Hamedan University, 6. Arak Islamic Azad University, 7. Green Biotech Inc.

Screening soil samples collected from various region of Iran, 22 phosphate solubilizing bacterial isolates were obtained. Two isolates, P5 and P7, produced the largest clear zone in minimal medium containing insoluble phosphate. Another isolate, P13, showed the highest phosphatase activity. The growth rates and phosphate solubilizing activities were studied under various environmental conditions. In general, all three isolates tolerated high temperature, various pH and high salt concentrations well. Bacterial isolates fitted well with other microorganism in the soil. In greenhouse experiment, P13 population was associated with the root exudates significantly, while this was insignificant for the other two isolates. The performances of these isolates were examined on potato yield in several field trials. In average, thirteen percent increase in the yield was achieved.

ارایه شده در پنجمین همایش بیوتکنولوژی - تهران - ۱۳۸۶