جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از منطقه ریزوسفر ریشه برنج (مطالعه موردی: مزارع برنج شهرستان ساری)

اسماعیل بخشنده*[1]، حشمت‌اله رحیمیان[2]، همت‌اله پیردشتی[3]، قربانعلی نعمت‌زاده[4]، ولی‌اله بابایی‌زاد[5]، سید محمد علوی[6]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان
۲ و ۵- استاد و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳ و ۴- دانشیار و استاد گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۶- کارشناس‌ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* Email: Bakhshandehesmail@yahoo.com

چکیده

فسفر پس از نیتروژن مهم‌ترین عنصر ضروری در تغذیه گیاهان محسوب می‌شود. به‌طور کلی، بسیاری از ریزجانداران از جمله باکتری‌ها قادرند تا فرم‌های نامحلول فسفر را به فرم‌های قابل استفاده تبدیل کرده و در طول دوره رشد در اختیار گیاه قرار دهند. این مطالعه به‌منظور جداسازی، شناسایی و ارزیابی کارایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات منطقه ریزوسفر ریشه برنج در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. نتایج نشان داد که ۱۷ درصد ایزوله‌های جدا شده از ریزوسفر ریشه برنج قابلیت حل‌کنندگی فسفات (تری کلسیم فسفات) را در محیط کشت داشتند. نتایج تجزیه واریانس وجود اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد را بین ایزوله‌ها نشان داد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین بیانگر آن بود که بالاترین شاخص کارایی حل‌کنندگی فسفات متعلق به ایزوله‌های ۶۸ (۱۵۲/۷) و ۱۳ (۱۴۹/۱) و پایین‌ترین آن متعلق به ایزوله ۷۰ (۱۱۱/۴) بود. در ارزیابی ایزوله‌ها مشخص گردید که ایزوله ۱۳ جزء باکتری‌های گرم مثبت و بقیه ایزوله‌ها گرم منفی بودند. نتایج آزمون تولید رنگدانه فلورسانس نشان داد که تنها ۷ ایزوله توانستند روی محیط کشت کینگ B تولید فلورسانس نمایند. بررسی‌های تکمیلی جهت امکان استفاده از جدایه‌های حل‌کنندگی فسفات در دست بررسی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری حل‌کننده فسفات، برنج ، جداسازی، فلورسانس.

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن به عنوان دومین و مهم‌ترین عنصر مورد نیاز گیاهان و ریزجانداران بوده و بیشترین نقش آن در فرآیند تولید و انتقال انرژی است (فلاح نصرت‌آباد و همکاران، ۱۳۸۲). خاک علاوه بر محل استقرار گیاه به عنوان منبع بزرگ تأمین آب و مواد معدنی به خصوص فسفر برای گیاهان شناخته شده است، اما تنها بخش بسیار ناچیزی (حدود ۰/۱ درصد) از این عنصر برای گیاهان قابل استفاده می‌باشد (زیو و همکاران، ۲۰۱۱). علت آن را می‌توان تثبیت سریع این عنصر در خاک و تبدیل آن به ترکیبات نامحلول (از قبیل فسفات آهن، آلومینیوم، کلسیم و منیزیم) دانست. شکل‌های مختلف فسفر (آلی و معدنی) در خاک به وسیله خصوصیات طبیعی خاک شامل اسیدیته، کاتیون‌های محلول و تبادلی، نوع ذرات خاک و سطح آن‌ها کنترل می‌شود (فلاح نصرت‌آباد و همکاران، ۱۳۸۲). تأمین فسفر مورد نیاز گیاه از دو طریق استفاده از کودهای شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است. اما مقدار زیادی از فسفر موجود در کودهای شیمیایی بعد از مصرف در مزارع به آسانی تبدیل به ترکیبات نامحلول شده و از دسترس گیاه خارج می‌گردند. همچنین، کاربرد این نوع کودها افزایش هزینه تولید را به‌همراه خواهند داشت. در چند دهه اخیر کاربرد ریزجانداران حل‌کننده فسفات (از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها) در قالب کود زیستی به عنوان یک راه‌حل مناسب برای رفع این مشکل معرفی شد. در این بین، باکتری‌های حل‌کننده فسفات[1] (*PSB*) از اهمیت قابل توجهی برخوردارند. این باکتری‌ها از طریق اسیدی‌کردن، کلات کردن، تبادلی‌کردن و معدنی‌کردن قابلیت آزادسازی فسفر نامحلول و تثبیت‌شده توسط ذرات خاک را دارند (آرکاند و اسچنیدر، ۲۰۰۶). از مهم‌ترین انواع *PSB*ها می‌توان به جنس‌های *Bacillus, Pseudomonas, Erwinia, Agrobacterium, Serratia, Flavobacterium, Enterobacter, Micrococcus, Azotobacter, Bradyrhizobium, Salmonella, Alcaligenes, Chromobacterium, Arthrobacter, Streptomyces, Thiobacillus,* و *Escherichia* اشاره کرد (زیو و همکاران، ۲۰۱۱). از سوی دیگر، کارایی باکترهای حل‌کننده فسفات به تعامل بین باکتری و خصوصیات منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان وابسته است. در نتیجه برای جداسازی *PSB*ها می‌توان از باکتری‌های منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان، کلنی‌هایی با جمعیت بالا و استقرار مناسب را انتخاب نمود (آرژل و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین، هدف از این مطالعه مقدماتی، شناسایی، جداسازی و ارزیابی باکتری‌های حل‌کننده فسفات کارآمد و معرفی جهت بررسی‌های تکمیلی برای رفع مشکل کمبود فسفر گیاه برنج در خاک‌هایی با قابلیت استفاده فسفر پایین می‌باشد.

1. Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB)

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک

تعداد ۱۲ نمونه خاک در دی‌ماه سال ۱۳۹۱ از مزارع مختلف برنج شهرستان ساری (چهار نمونه از هر منطقه؛ مزارع برنج در جهت‌های شمال‌غربی، غرب و جنوب به‌طور جداگانه) با حداقل ۱۰ سال سابقه کشت برنج یا تناوب برنج و شبدر جمع‌آوری شد. از هر مزرعه چند بوته برنج باقی‌مانده از سال قبل به همراه خاک اطراف ریشه نمونه‌برداری و در کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفت. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

جداسازی باکتری

برای جداسازی باکتری‌ها، ابتدا پنج گرم خاک از هر نمونه به ۴۵ میلی‌لیتر آب نمک استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) سوسپانسیون شد. نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق تکان داده شد. در پایان، رقت‌های تا 10^{-4} در آب استریل حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیکلوهگزیمید تهیه شد. از این رقت ۶۵ میکرولیتر در دو تکرار بر روی محیط کشت آگار غذایی حاوی سوکروز (*NAS*) پخش شد. تشتک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جداسازی باکتری‌ها بر اساس اندازه، رنگ، ارتفاع کلنی ۴۸ ساعت بعد از زمان کشت انجام شد.

شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

برای شناسایی و ارزیابی باکتری‌های حل‌کنندگی فسفات جداسازی‌شده، هر ایزوله با سه تکرار روی محیط کشت *PVK*[1] (گلوکز ۱۰ گرم، تری‌کلسیم فسفات پنج گرم، سولفات آمونیوم ۰/۵ گرم، کلرید پتاسیم ۰/۲ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلریدسدیم ۰/۲ گرم، سولفات آهن ۰/۰۰۰۱ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۰۰۱ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم و آگار ۱۰ گرم در لیتر) کشت داده شد (پیکوفسکی، ۱۹۴۸). تشتک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز نگهداری گردیدند. برای شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از خصوصیات شفاف‌سازی محیط پیرامون کلنی آن‌ها استفاده شد. کارایی حل‌کنندگی[2] این باکتری‌ها از طریق نسبت قطر هاله شفاف[3] به قطر رشد کلنی[4] ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. هر چه عدد بدست آمده بزرگ‌تر باشد نشان‌دهنده کارایی بالاتر باکتری برای حل‌کردن تری کلسیم فسفات می‌باشد (راماچاندران و همکاران، ۲۰۰۳). بعد از شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات آزمایش‌های مقدماتی از قبیل آزمون هیدروکسید پتاسیم (۳٪) (ساسلو و همکاران، ۱۹۸۲)

1. Pikovskaya (PVK)
2. Solubilization efficiency
3. Solubilization diameter
4. Growth diameter

برای بررسی واکنش گرم باکتری‌ها انجام شد. همچنین، کشت روی محیط کشت کینگ B (کینگ و همکاران، ۱۹۵۴) و EMB به‌ترتیب برای شناسایی اولیه جنس‌های باکتری فلورسانس[1] و اینتروباکتر[2] انجام شد.

نتایج و بحث

در مجموع ۱۰۰ عدد ایزوله باکتری از منطقه ریزوسفر ریشه برنج جداسازی و خالص‌سازی شد. جهت شناسایی اولیه جدایه‌ها، آزمون‌های اولیه معمولی انجام شد. توانایی باکتری‌ها برای حل‌کنندگی فسفات روی محیط کشت PVK مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۱۷ ایزوله قادر به حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات نامحلول در محیط کشت می‌باشند. نتایج تجزیه واریانس از نظر شاخص کارایی حل‌کنندگی فسفات در سطح احتمال یک درصد بین ایزوله‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین کارایی حل‌کنندگی فسفات متعلق به ایزوله‌های ۶۸ و ۱۳ به‌ترتیب با کارایی ۱۵۲/۷ و ۱۴۹/۱ و پایین‌ترین آن متعلق به ایزوله ۷۰ با کارایی ۱۱۱/۴ بود. نتایج آزمون هیدروکسید پتاسیم (۳٪) نشان داد که به استثنای یک ایزوله گرم مثبت، بقیه ایزوله‌ها گرم منفی بودند (جدول ۱). همچنین، پس از کشت ۴۸ ساعته ایزوله‌ها روی محیط کشت کینگ B نتایج حاکی از آن بود که تنها ۷ ایزوله توانستند تولید فلورسانس نمایند (جدول ۱). در ضمن هیچ یک از ایزوله‌ها روی محیط کشت EMB رنگ سبز متالیک تولید نکردند.

به‌طورکلی، ریزجانداران جداسازی‌شده از منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان ممکن است نسبت به ریزجانداران جداسازی‌شده از منابع یا مناطق دیگر بهتر با گیاه میزبان سازگاری داشته باشند، که علت آن را می‌توان به سازگاری باکتری‌ها با سیستم ریشه گیاه و شرایط محیطی منطقه نسبت داد (گوپالاکریشنان و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین، نتایج این مطالعه می‌تواند جهت معرفی مناسب‌ترین جدایه‌های باکتری‌های حل‌کننده فسفات به منظور امکان استفاده از آن‌ها در تولید کودهای زیستی قابل استفاده در مزارع برنج شمال کشور مورد استفاده قرار گیرد.

1. Fluorescence
2. Enterobacter

جدول ۱- مقایسه میانگین کارایی ایزوله‌های حل‌کننده فسفات جداسازی‌شده از منطقه ریزوسفر ریشه برنج و نتایج آزمون هیدروکسید پتاسیم (۳٪) و قابلیت تولید فلورسانس.

N	E	M	Gram	King B
۴۵	۱۳۰/۴	c-e	-	.
۱۳	۱۴۹/۱	ab	+	.
۹	۱۲۲/۷	c-f	-	.
۲۱	۱۳۶/۶	bc	-	+
۲۰	۱۳۲/۰	cd	-	.
۱۷	۱۲۰/۰	d-f	-	+
۲۳	۱۲۱/۱	d-f	-	+
۴۷	۱۳۳/۴	cd	-	+
۵۴	۱۲۸/۶	c-e	-	+
-	۷۰	۶۳	۶۸	۵۷
۳۶	۳۹	۷۹	۹۶	N
.	۱۱۱/۴	۱۲۱/۲	۱۵۲/۷	۱۱۶/۶
۱۲۴/۶	۱۳۱/۳	۱۲۴/۳	۱۲۳/۹	E
.	f	d-f	A	ef
c-f	c-e	c-f	c-f	M
.	-	-	-	-
-	-	-	-	Gram
.	.	.	.	+
.	.	+	+	King B

N: شماره ایزوله E: شاخص کارایی حل‌کنندگی فسفات M: حروف مقایسه میانگین به روش LSD

* وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

برخی از منابع مورد استفاده

فلاح نصرت‌آبادی ع رحیمیان ح راستین ن ص و ملکوتی م ج، ۱۳۸۲. بررسی پراکنش ریزجانداران حل‌کننده فسفات در تعدادی از خاک‌های استان گیلان، مجله علوم خاک و آب، ۱۷: ۱۷۶-۱۶۲.

Arcand MM and Schneider KD, 2006. Plant and microbial cased to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: A Review. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 78(4): 791-807.

Gopalakrishnan S, Humayun P, Kiran BK, Kannan IGK, Vidya MS, Deepthi K and Rupela O, 2010. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27: 1313-1321.

King EO, Ward MK and Raney DE, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44:301–307

Pikovskaya RI, 1948. Mobilization of Phosphate in Soil in Connection With Their Vital Activities of Some Microbial Species, Microbiologiya, 17:362-370.

Ramachandran K, Srinivasan V, Hamza S and Anandaraj M, 2003. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 325-331.

Suslow TV, Schroth MN and Isaka M, 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.

Urgel ME, Salido A and Ramos JL, 2000. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of Pseudomonas putida to Seeds. Journal of Bacteriology, 182(9): 2363-2369.

Zhu F, Qu L, Hong X and Sun X, 2011. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-6. [Doi:10.1155/2011/615032]