



پانزدهمین همایش ملی برنج کشور

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری - پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

۱-۲ اسفند ۱۳۹۱

(محور چالش های تولید پایدار)

جداسازی باکتری های حل کننده فسفات از منطقه ریزوسفر ریشه برنج (مطالعه موردی: مزارع برنج شهرستان ساری)

اسماعیل بخشنده^{۱*}، حشمت اله رحیمیان^۲، همت اله پیردشتی^۳، قربانعلی نعمت زاده^۴، ولی اله بابایی زاد^۵،

سید محمد علوی^۶

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 و اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۶- کارشناس ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*Bakhshandehesmail@yahoo.com

چکیده

فسفر پس از نیتروژن مهم ترین عنصر ضروری در تغذیه گیاهان محسوب می شود. به طور کلی، بسیاری از ریزجانداران از جمله باکتری ها قادرند تا فرم های نامحلول فسفر را به فرم های قابل استفاده تبدیل کرده و در طول دوره رشد در اختیار گیاه قرار دهند. این مطالعه به منظور جداسازی، شناسایی و ارزیابی کارایی باکتری های حل کننده فسفات منطقه ریزوسفر ریشه برنج در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. نتایج نشان داد که ۱۷ درصد ایزوله های جدا شده از ریزوسفر ریشه برنج قابلیت حل کنندگی فسفات (تری کلسیم فسفات) را در محیط کشت داشتند. نتایج تجزیه واریانس وجود اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد را بین ایزوله ها نشان داد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین بیانگر آن بود که بالاترین شاخص کارایی حل کنندگی فسفات متعلق به ایزوله های ۶۸ (۱۵۲/۷) و ۱۳ (۱۴۹/۱) و پایین ترین آن متعلق به ایزوله ۷۰ (۱۱۱/۴) بود. در ارزیابی ایزوله ها مشخص گردید که ایزوله ۱۳ جزء باکتری های گرم مثبت و بقیه ایزوله ها گرم منفی بودند. نتایج آزمون تولید رنگدانه فلورسانس نشان داد که تنها ۷ ایزوله توانستند روی محیط کشت کینگ B تولید فلورسانس نمایند. بررسی های تکمیلی جهت امکان استفاده از جدایه های حل کنندگی فسفات در دست بررسی می باشد.

کلمات کلیدی: باکتری حل کننده فسفات، برنج، جداسازی.

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن به عنوان دومین و مهم ترین عنصر مورد نیاز گیاهان و ریزجانداران بوده و بیشترین نقش آن در فرآیند تولید و انتقال انرژی است (فلاح نصرت آباد 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 می باشد (زیو و همکاران، ۲۰۱۱). علت آن را می توان تثبیت سریع این عنصر در خاک و تبدیل آن به ترکیبات نامحلول (از قبیل فسفات آهن، آلومینیوم، کلسیم و منیزیم) دانست. شکل های مختلف فسفر (آلی و معدنی) در خاک به وسیله خصوصیات طبیعی خاک شامل اسیدیته، کاتیون های محلول و تبدالی، نوع ذرات خاک و سطح آن ها کنترل می شود (فلاح نصرت آباد و همکاران، ۱۳۸۲). تأمین فسفر مورد نیاز گیاه



از دو طریق استفاده از کودهای شیمیایی و زیستی امکان پذیر 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 می گردند. همچنین، کاربرد این نوع کودها افزایش هزینه تولید را به همراه خواهند داشت. در چند دهه اخیر کاربرد ریزجانداران حل کننده فسفات (از جمله باکتری ها و قارچ ها) در قالب کود زیستی به عنوان یک راه حل مناسب برای رفع این مشکل معرفی شد. در این بین، باکتری های حل کننده فسفات^۱ (*PSB*) از اهمیت قابل توجهی برخوردارند. این باکتری ها از طریق اسیدی کردن، کلات کردن، تبادل کردن و معدنی کردن قابلیت آزادسازی فسفر نامحلول و تثبیت شده توسط ذرات خاک را دارند (آرکاند و اسپنیدر، ۲۰۰۶). از مهم ترین انواع *PSB* ها می توان به جنس های *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Arthrobacter*, *Escherichia* و *Streptomyces*, *Thiobacillus*, (زیو و همکاران، ۲۰۱۱). کارایی باکتری های حل کننده فسفات به تعامل بین باکتری و خصوصیات منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان وابسته است. در نتیجه برای جداسازی *PSB* ها می توان از باکتری های منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان، کلنی هایی با جمعیت بالا و استقرار مناسب را انتخاب نمود (آرژل و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین، هدف از این مطالعه مقدماتی شناسایی، جداسازی و ارزیابی باکتری های حل کننده فسفات کارآمد و معرفی جهت بررسی های تکمیلی برای رفع مشکل کمبود فسفر گیاه برنج در خاک هایی با قابلیت استفاده فسفر پایین می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری خاک

تعداد ۱۲ نمونه خاک در دی ماه سال ۱۳۹۱ از مزارع مختلف برنج شهرستان ساری (۴ نمونه از هر منطقه؛ مزارع برنج د جهت های شمال غربی، غرب و جنوب به طور جداگانه) با حداقل ۱۰ سال سابقه کشت برنج یا تناوب برنج و شبدر جمع آوری شد. از هر مزرعه چند بوته برنج باقیمانده از سال قبل به همراه خاک اطراف ریشه نمونه برداری و در کیسه های پلاستیکی قرار گرفت. نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شدند.

جداسازی باکتری

برای جداسازی باکتری ها، ابتدا ۵ گرم خاک از هر نمونه به ۴۵ میلی لیتر آب نمک استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) سوسپانسیون شد. نمونه ها به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق تکان داده شد. در پایان، رقت های تا 10^{-4} در آب استریل حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سیکلوهگزیمید تهیه شد. از این رقت ۶۵ میکرولیتر در دو تکرار بر روی محیط کشت آگار غذایی حاوی سوکروز (*NAS*) پخش شد. تشتک ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جداسازی باکتری ها بر اساس اندازه، رنگ، ارتفاع کلنی ۴۸ ساعت بعد از زمان کشت انجام شد.



پانزدهمین همایش ملی برنج کشور

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری - پژوهشکده زنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

۱-۱۳۹۱ اسفند

(محرور جالش های تولید پایدار)

شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

برای شناسایی و ارزیابی باکتری‌های حل‌کنندگی فسفات جداسازی شده، هر ایزوله با سه تکرار روی محیط کشت PVK^1 (گلوکز ۱۰ گرم، تری‌کلسیم فسفات ۵ گرم، سولفات آمونیوم ۰/۵ گرم، کلرید پتاسیم ۰/۲ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۲ گرم، سولفات آهن ۰/۰۰۱ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۰۱ 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 ۵ روز نگهداری گردیدند. برای شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از خصوصیات شفاف‌سازی محیط پیرامون کلنی آن‌ها استفاده شد. کارایی حل‌کنندگی^۲ این باکتری‌ها از طریق نسبت قطر هاله شفاف^۳ به قطر رشد کلنی^۴ ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. هر چه عدد بدست آمده بزرگتر باشد نشان‌دهنده کارایی بالاتر باکتری برای حل‌کردن تری‌کلسیم فسفات می‌باشد (راماچاندران و همکاران، ۲۰۰۳). بعد از شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات آزمایش‌های مقدماتی از قبیل آزمون هیدروکسید پتاسیم (۰/۳٪) (ساسلو و همکاران، ۱۹۸۲) برای بررسی واکنش گرم باکتری‌ها انجام شد. همچنین، کشت روی محیط کشت کینگ B (کینگ و همکاران، ۱۹۵۴) و EMB به ترتیب برای شناسایی اولیه جنس‌های باکتری فلورسانس^۵ و اینتروباکتر^۶ 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 ۱ درصد بین ایزوله‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین کارایی حل‌کنندگی فسفات متعلق به ایزوله‌های ۶۸ و ۱۳ به ترتیب با کارایی ۱۵۲/۷ و ۱۴۹/۱ و پایین‌ترین آن متعلق به ایزوله ۷۰ با کارایی ۱۱۱/۴ بود. نتایج آزمون هیدروکسید پتاسیم (۰/۳٪) 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.

به‌طور کلی، ریزجانداران جداسازی شده از منطقه ریزوسفر ریشه گیاه میزبان ممکن است نسبت به ریزجانداران جداسازی شده 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 (گوپالاکریشن 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. Pikovskaya (PVK)
2. Solubilization efficiency
3. Solubilization diameter
4. Growth diameter
5. Fluorescence
6. Enterobacter



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

۴۵	۱۳	۹	۲۱	۲۰	۱۷	۲۳	۴۷	۵۴	N
۱۳۰/۴	۱۴۹/۱	۱۲۲/۷	۱۳۶/۶	۱۳۲/۰	۱۲۰/۰	۱۲۱/۱	۱۳۳/۴	۱۲۸/۶	E
c-e	ab	c-f	bc	cd	d-f	d-f	cd	c-e	M
-	+	-	-	-	-	-	-	-	Gram
.	.	.	+	.	+	+	+	+	King B
-	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.

منابع

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، جلد ۱۷، صفحه ۱۶۲ تا ۱۷۶.

Arcand MM and Schneider KD, 2006. Plant and Microbial Based to Improve the Agronomic Effectiveness of Phosphate Rock: A Review. *An Arcand Bras Cienc*; 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. *J Lab Clin Med*; 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]