اثرات متقابل باکتری‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium japanicum*) بر شاخص‌های رشد، غده‌بندی و جذب برخی عناصر غذایی در سویا

لعیا راثی‌پور و ناصر علی‌اصغرزاده[۱]

چکیده

برخی میکروارگانیسم‌های خاک توانایی انحلال فسفات‌های کم محلول را دارند. فسفر نقش مهمی در تغذیه گیاه و تثبیت نیتروژن در لگوم‌ها ایفا می‌کند اثرات متقابل سه گونه از باکتری‌های حل کننده فسفات (Phosphate Solubilizing Bacteria) (PSB) و باکتری (*Bradyrhizobium japanicum*) بر عملکرد و جذب N ، P ، K و شاخص‌های غده‌بندی در سویا (*Glycin max* L. CV. Harcor) در شرایط گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل شامل چهار سطح باکتری حل کننده فسفات (بدون باکتری M_0، M_1 (*Pseudomonas putida*) ،M_2 (*Aeromonas hydrophila*) ،M_3 (*Pseudomonas fluorescens*))، دو سطح باکتری (*Bradyrhizobium*) (بدون باکتری B_0 و با باکتری B_1) و سه سطح کودفسفره (صفر= P_0 ، ۲۹= P_1 و ۵۸= P_2 میلی‌گرم سوپر فسفات تریپل بر کیلوگرم خاک) در چارچوب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. موقع برداشت، وزن خشک بخش هوایی، وزن دانه در بوته، تعداد، وزن تر و وزن خشک گره‌های ریشه‌ای و غلظت N ، P ، K در بخش هوایی گیاه اندازه‌گیری شد باکتری‌های حل کننده فسفات وزن خشک، درصد فسفر، پتاسیم، نیتروژن بخش هوایی گیاه، تعداد، وزن تر و وزن خشک گره‌های ریشه‌ای را به‌طور معنی‌دار افزایش دادند. (*Bradyrhizobium*) بر تمام شاخص‌های ذکر شده و وزن دانه در بوته تأثیر معنی‌دار و مثبت داشت. اثرات متقابل دو فاکتور فوق بر وزن خشک، درصد فسفر و نیتروژن بخش هوایی گیاه معنی‌دار شد. افزایش سطح کود فسفره وزن خشک، درصد فسفر و وزن دانه در بوته گیاه را به طور معنی‌دار افزایش داد. بیشترین مقدار فسفر در بخش هوایی گیاه در بالاترین سطح کود فسفره(P_2) وجود داشت ولی وزن خشک بخش هوایی گیاه در سطح P_1 و در حضور باکتری (*Pseudomonas putida*) تفاوت معنی‌داری با سطح P_2 آن نداشت.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل کننده فسفات، *Bradyrhizobium japanicum*، فسفر، سویا، غده‌بندی

مقدمه

بهره‌گیری از موجودات مفید خاکزی به منظور بهبود وضعیت حاصل‌خیزی خاک، افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و تأمین سلامتی گیاه از مهم‌ترین شیوه‌های علمی برای کمک به پایداری تعادل سیستم زنده خاک و جلوگیری از خطر تراکم آلاینده‌های شیمیایی در محیط زیست، محسوب می‌شود. در بسیاری از خاک‌های ایران به دلیل بالا بودن pH و فراوانی یون کلسیم، به رغم فراوانی برخی عناصر غذایی مانند فسفر، مقدار

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

Archive of SID
www.SID.ir

محلول و قابل جذب این عناصر، کمتر از مقدار لازم برای تأمین رشد مناسب گیاه است. روش متداول برای مقابله با این کمبودها استفاده از کودهای شیمیایی است که علاوه بر بهای زیاد و بازدهی کم، احتمال آلودگی‌های زیست محیطی را هم به دنبال دارند (۱۶). بنابراین ضرورت ایجاب می‌کند که راه‌حل‌های بیولوژیک برای رفع این مشکلات مورد توجه قرار گیرند. استفاده از میکروارگانیسم‌های خاکزی که توانایی انحلال فسفات‌ها و تبدیل آن به فسفر محلول را دارند، یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر، در خاک‌های قلیایی است (۲ و ۷). فسفر بعد از نیتروژن مهم‌ترین عنصر اصلی مورد نیاز گیاهان و میکروارگانیسم‌ها بوده و از نظر شیمیایی بسیار فعال می‌باشد. مهم‌ترین نقش این عنصر در گیاهان در فرایند تولید و انتقال انرژی است (۲). میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات موجود در خاک ضمن این‌که می‌توانند مصرف کودهای شیمیایی حاوی فسفات را کاهش دهند، باعث افزایش جذب فسفر در گیاهان می‌شوند(۲۴). تحقیقات انجام یافته در مورد اثرات متقابل بین حل‌کنندگان فسفات و باکتری (*Bradyrhizobium japanicum*) بیان‌گر رابطه سینرژیستی (Synergistic) بین آنهاست به‌عنوان مثال روزاس و همکاران (۲۲) در آزمایش مزرعه‌ای بر روی سویا، اثرات متقابل بین باکتری هم‌زیست (*Bradyrhizobium*) و باکتری حل کننده فسفات (*Pseudomonas putida*) را مورد بررسی قرار دادند. در کشور هند، نیز تأثیر باکتری حل کننده فسفات (*سودموناس استریاتا*) بر هم‌زیستی (*Bradyrhizobium*) با سویا و عملکرد آن مورد بررسی قرار گرفته است (۳۰). با توجه به اهمیت موضوع، به نظر می‌رسد شناسایی این میکروارگانیسم‌ها و به کارگیری آنها در تأمین فسفر گیاهان، از منابع نامحلول در خاک، کاملاً ضروری است. کارایی هم‌زیستی گیاه سویا با (*Bradyrhizobium japanicum*) از نظر تثبیت نیتروژن و جذب برخی عناصر نیازمند تأمین کافی فسفر می‌باشد. در این تحقیق تأثیر برخی گونه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات در تأمین فسفر و بهبود هم‌زیستی فوق‌الذکر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات از خاک

برای جداسازی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات، از خاک اطراف ریشه گیاهان شبدر، اسپرس، یونجه، سیر، گندم، کلزا و گوجه‌فرنگی واقع در ایستگاه تحقیقات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز نمونه‌برداری صورت گرفت نمونه‌های خاک به روش رقت‌های دهدهی با آب مقطر استریل تا 10^{-8} رقیق شدند (۲۰ و ۳۰) جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات از محیط کشت جامد استریل Pikoskaya درون ظروف پتری استفاده گردید (۲۷) پس از انکوبه کردن، کلونی‌هایی که در اطراف آنها هاله شفاف مشاهده شد به عنوان حل کننده فسفات انتخاب شدند (۸، ۱۳، ۱۵، ۲۰و ۲۹) و بدین ترتیب تعداد ۱۸جدایه حل کننده فسفات به‌دست آمد.

تعیین پتانسیل انحلال فسفات در جدایه‌ها

در محیط کشت مایع Pikoskaya، از هر جدایه با سه تکرار کشت صورت گرفت. ارلن‌های حاوی محیط تلقیح شده و شاهد در شیکر انکوباتور در تاریکی و با سرعت rpm ۹۰ و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند (۲۱). از سوسپانسیون‌های حاصل مقدار ۱۲ میلی‌لیتر برداشته و در دور rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. با این شرایط قارچ‌ها و باکتری‌ها و فسفات نامحلول از سوسپانسیون جدا شده و ته‌نشین گردیدند و اندازه‌گیری مقدار فسفات محلول در مایع صاف رویی و به طریقه کالریمتری (روش وانادات مولیبدات) صورت گرفت (۱۱). با توجه به جدول ۱ مؤثرترین جدایه‌های حل کننده فسفات براساس مقدار فسفات حل شده در واحد حجم و زمان از باکتری‌ها بودند. سه جدایه مؤثر از باکتری‌ها تا حد جنس و گونه در گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز براساس انجام برخی آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. جنس و گونه باکتری‌های شماره ۱۱(M_1)، ۴(M_2) و ۱۲(M_3) به ترتیب عبارت بود از: *Pseudomonas putida*، *Aeromonas hydrophila* و *Pseudomonas fluorescens*.

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه مایه تلقیح میکروبی از جدایه‌های مؤثر

جهت تهیه مایه تلقیح از سه جدایه باکتری، ابتدا آنها در محیط کشت مایع Pikoskaya به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و داخل شیکر انکوباتور تکثیر شدند و سپس تعداد باکتری در واحد حجم سوسپانسیون‌ها به روش کدورت سنجی با اندازه‌گیری OD در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (۱۰). سپس ۱۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌ها در زیر هود روی حامل میکروبی (Carrier) (مخلوط پیت و ورمی کولیت آسیاب شده به نسبت ۱ : ۱ وزنی که از غربال ۱۰۰ میکرونی عبور داده شده و استریل شده بودند) منتقل شدند و حامل‌های تلقیح شده جهت استقرار و سازگاری باکتری‌ها با محیط جدید به مدت یک هفته در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. pH عصاره اشباع حامل میکروبی ۷/۶، هدایت الکتریکی آن ۰/۵ دسی زیمنس بر متر و رطوبت اشباع وزنی آن ۱۵۹ درصد تعیین شد. براساس جمعیت باکتری موجود در سوسپانسیون‌ها و حجم افزوده شده به حامل‌ها، در نهایت به ازای هر گرم ماده حامل خشک تعداد $۳/۸ \times ۱۰^{۴}$ باکتری وجود داشت.

انتخاب و آماده‌سازی خاک

خاک مورد استفاده جهت آزمایش گلخانه‌ای از اراضی دانشکده کشاورزی واقع در کرکج انتخاب شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در جدول ۲ آمده است (۱). مقدار ۵۰۰ کیلوگرم از این خاک از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متر برداشته شد و پس از گذراندن از غربال ۴ میلی متری عمل پاستوریزه کردن در بخار آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد. خاک پاستوریزه شده به گلدان‌های پلاستیکی ۴ کیلوگرمی که با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی شده بودند، منتقل گردید. براساس میزان فسفر قابل جذب در خاک مورد آزمایش و توصیه کودی مربوط به سویا تیمارهای کود فسفره به خاک گلدان‌ها اعمال شدند (۳).

انجام تیمارها و طرح آزمایش

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و به صورت فاکتوریل در ۴ تکرار انجام شد. سه فاکتور مورد استفاده شامل چهار سطح باکتری حل کننده فسفات (بدون باکتری M_0، *Pseudomonas putida*) M_1، *Aeromonas hydrophila*) M_2، *Pseudomonas fluorescens*) M_3)، دو سطح باکتری (*Bradyrhizobium japanicum*) (بدون باکتری B_0 و با باکتری B_1) و سه سطح کود فسفره (صفر = P_0، ۲۹ = P_1 و ۵۸ = P_2 میلی‌گرم سوپرفسفات تریپل بر کیلوگرم خاک) بود. بذرهای سویا رقم هارکور، بعد از ضدعفونی با وایتکس ۱۰ درصد (هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند با در نظر گرفتن تیمارها، در عمق ۳ سانتی‌متری چهار عدد بذر سویا هر کدام به همراه یک گرم مایه تلقیح (*Bradyrhizobium*) پودری (مایه تلقیح (*Bradyrhizobium japanicum*) از بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب دریافت گردید.) و یک گرم مایه تلقیح باکتری حل کننده فسفات کاشته شد با هدف جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی و کاهش تبخیر از گلدان‌ها، سطح خاک هر گلدان با ۲۰۰ گرم شن استریل پوشش داده شد. گلدان‌ها در داخل گلخانه در معرض ۱۶ ساعت روشنایی با لامپ‌های بخار جیوه و فلورسنت و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۳۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد روز و ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد شب نگه‌داری شدند. هم‌زمان با آبیاری اول، سطوح کود فسفره به صورت محلول به خاک گلدان‌ها اضافه گردید. پس از اندازه‌گیری مقدار پتاسیم قابل جذب خاک و با توجه به جدول توصیه کودی برای سویا، نیازی به کود پتاسیم نبود (۳). در طول دوره رشد، با توزین گلدان‌ها، رطوبت خاک توسط آب معمولی تا رطوبت ۸۰ درصد ظرفیت زراعی نگه‌داری شد. پس از استقرار گیاهچه‌ها، تنک صورت گرفت و ۲ گیاه در هر گلدان نگه‌داری شد.

برداشت گیاه و اندازه‌گیری شاخص‌های موردنظر

گیاهان پس از گذشت حدود ۱۵ هفته و درحالی‌که بوته‌ها دارای غلاف بودند، برداشت گردیدند. اندام هوایی گیاهان از

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. میانگین انحلال فسفات در محیط کشت مایع توسط جدایه‌های مختلف (آزمون LSD)

شماره جدایه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
مقدار فسفر انحلال یافته (میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت)	۳۶/۵^{cd}	۵۰/۱۱^{bc}	۱۳/۰۱^{fg}	۱۳۲/۳۹^{a}	۲۸/۵۸^{de}	۲۷/۰۴^{de}	۲۲/۲۹^{ef}	۱۲/۹۴^{fg}	۴۱/۳۴^{cd}	۳۷/۱۲^{cd}	۱۳۵/۳۶^{a}	۱۱۱/۲۸^{a}	۲۱/۱۱^{ef}	۵۲/۶۸^{bc}	۴۱/۰۹^{cd}	۱۰/۶۹^{g}	۳۲/۵۸^{de}	۶۳/۳۹^{b}

میانگین‌های با حروف غیرمشابه در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند $LSD_{0/05}$ = ۱/۲۴۴

جدایه‌های شماره ۴، ۱۱، ۱۲ با توجه به بالاترین پتانسیل انحلال فسفات برای شناسایی انتخاب شدند.

جدول۲. نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

FC (W/W, %)	کلاس بافت‌خاک	٪			میلی گرم بر کیلوگرم				کربن آلی (٪)	ECe (dS/m)	pH گل اشباع
		شن	سیلت	رس	Zn	Cu	Mn	Fe	K	P			
۱۲	لوم سیلتی	۲۷	۵۴	۱۹	۱	۱/۶	۳/۹	۳/۵۴	۳۶۰	۷/۲	۰/۴۶	۰/۶۱	۷/۷

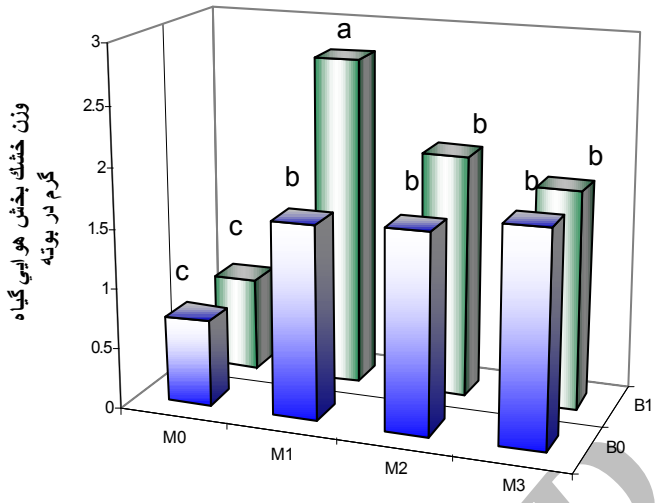
P : روش اولسن (بی کربنات سدیم ۰/۵ مولار و pH۸/۵)

K : استات آمونیوم (یک نرمال و pH ۷)

DTPA روش : Zn , Cu , Mn , Fe

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. اثر باکتری‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium*) بر وزن خشک بخش هوایی گیاه بر حسب گرم در بوته (آزمون توکی)

سطح خاک قطع شد و بعد از دوبار شستشو با آب مقطر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ثابت شدن وزن نمونه‌ها خشک شدند. پس از تعیین وزن خشک گیاه و آسیاب کردن آنها، یک گرم نمونه گیاهی در ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر و سپس در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک یک مولار حل گردید. محلول از کاغذ صافی عبور داده و بعد از شستشوی مواد باقی مانده بر کاغذ صافی با آب مقطر، حجم محلول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. فسفر با روش رنگ‌سنجی (وانادات- مولیبدات) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار نیتروژن کل نیز با روش کجلدال اندازه‌گیری گردید (۱۱). سیستم ریشه‌ای گیاهانی که دارای عامل (*Bradyrhizobium*) بودند، به دقت از داخل گلدان بیرون آورده و تعداد غده‌ها بعد از شستشو با آب مقطر شمرده شد. سپس غده‌ها با تیغ از ریشه جدا شده و وزن تر آنها تعیین گردید بعد غده‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده و وزن خشک آنها تعیین شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC صورت گرفت.

نتایج و بحث

وزن خشک بخش هوایی گیاه

طبق شکل ۱ تیماری که توأماً باکتری (*Bradyrhizobium*) و (*Pseudomonas putida*) را داشت (M_1B_1)، بیشترین وزن خشک را در بخش هوایی گیاه ایجاد کرد که از لحاظ آماری در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها و تیمار شاهد (M_0 B_0) داشت. سایر باکتری‌های حل کننده فسفات در هر سطح (*Bradyrhizobium*)، تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند. باکتری (*Pseudomonas putida*) دارای بیشترین قدرت انحلال فسفات بود (جدول ۳). تأثیر مثبت تلقیح توام گیاه با برخی از گونه‌های حل کننده فسفات با باکتری (*Bradyrhizobium*) روی وزن خشک بخش هوایی را می‌توان به اثر سینرژیستی بین آن دو مربوط دانست. یکی از مکانیسم‌های احتمالی این است که میکروارگانیسم حل کننده فسفات با انحلال فسفات نامحلول و افزایش مقدار فسفر در دسترس برای باکتری همزیست، باعث افزایش تثبیت نیتروژن در گره‌های ریشه‌ای و در نتیجه افزایش رشد گیاه و به‌خصوص بخش هوایی آن شده است. زیرا برای تثبیت نیتروژن، انرژی فراوان مورد نیاز است که با وجود فسفر کافی و ATP فراوان تأمین می‌شود (۱۸).

روزاس و همکاران (۲۲) در آزمایش مزرعه‌ای بر روی سویا، آثار متقابل بین باکتری همزیست سویا و (*Pseudomonas putida*) را که حل کننده فسفات بود، مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تلقیح توأم این باکتری‌ها افزایش معنی‌داری را در وزن خشک بخش هوایی گیاه به وجود می‌آورد. وسیول و

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳ . میانگین اثرات سطوح باکتری حل کننده و سطوح کود فسفره بر روی صفات مورد مطالعه در سویا (آزمون توکی)

صفات مورد مطالعه	باکتری حل کننده فسفات				سطوح کود فسفره		
	M_0	M_1	M_2	M_3	P_0	P_1	P_2
وزن خشک بخش هوایی (گرم در هر بوته)	۰/۷۵۴^{c}	۲/۱۷۹^{a}	۱/۸۳۳^{b}	۱/۸۰۳^{b}	۱/۴۹۵^{b}	۱/۶۵۳^{ab}	۱/۷۷۸^{a}
غلظت فسفر بخش هوایی (درصد)	۰/۱۸^{c}	۰/۲۷۶^{a}	۰/۲۳۳^{b}	۰/۱۹۹^{bc}	۰/۲۰۳^{b}	۰/۲۱۷^{b}	۰/۲۵^{a}
غلظت پتاسیم بخش هوایی (درصد)	۰/۳۱۷^{b}	۰/۴۰۸^{a}	۰/۳۵۴^{ab}	۰/۳۵۵^{ab}	–	–	–
غلظت نیتروژن بخش هوایی (درصد)	۲/۹۹۴^{c}	۳/۴۶۷^{ab}	۳/۶۸۶^{a}	۳/۳۱۶^{b}	–	–	–
وزن دانه در هر بوته (گرم)	–	–	–	–	۰/۷۹۱^{b}	۰/۹۰۶^{ab}	۱/۰۳۴^{a}
تعداد گره در ریشه هر بوته	۷/۹۱۷^{b}	۱۰/۸۳۳^{a}	۵/۸۳۳^{c}	۸^{b}	–	–	–
وزن تر گره به ازای تعداد گره در ریشه (گرم)	۰/۰۶۸^{b}	۰/۱۳۶^{a}	۰/۰۴۸^{b}	۰/۰۷۱^{b}	–	–	–
وزن خشک گره به ازای تعداد گره ریشه (گرم)	۰/۰۲^{a}	۰/۰۳۳^{a}	۰/۰۱۷^{a}	۰/۰۲^{a}	–	–	–

فقط میانگین صفاتی در جدول ارائه شده که تجزیه واریانس آنها معنی‌دار شده است.
میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر سطر از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند.

همکاران (۳۰) در بررسی تأثیر باکتری حل کننده فسفات (*Pseudomonas striata*) بر همزیستی (*Bradyrhizobium japanicum*) با سویا و صفاتی مانند گره‌زایی، وزن خشک گره‌ها و وزن خشک گیاه نشان دادند که تلقیح توأم دو باکتری سبب افزایش معنی‌داری در صفات ذکر شده می‌گردد. دلیپ و همکاران (۱۲) نیز نشان دادند که تلقیح توأم بذرهای نخود با (*Pseudomonas fluorescens*) و ریزوبیوم، که PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) می‌باشند، منجر به افزایش ارتفاع ساقه، طول ریشه و وزن خشک گیاه نسبت به تیمارهای شاهد می‌شود.

میانگین سطوح کود فسفر در جدول ۳ بیانگر این است که با افزایش سطح فسفر کودی تولید ماده خشک افزایش می‌یابد ولی دو سطح فسفر کودی یعنی P_1 و P_2 از لحاظ آماری و از نظر تولید ماده خشک، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. آراجو و همکاران (۵) نشان دادند که در دسترس بودن فسفر بیشتر توسط کوددهی در لوبیا باعث افزایش تثبیت نیتروژن در گیاه شده و مقدار برگ‌ها، سطح برگ و وزن خشک تمام قسمت‌ها به‌خصوص گره‌ها را افزایش داد.

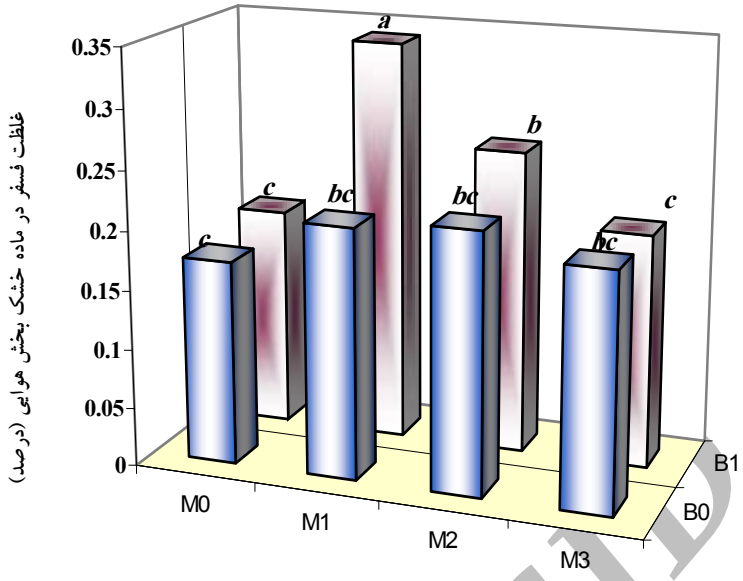
عمر (۱۹) اثرات کوددهی با سنگ فسفات و همزیستی توأم قارچ میکوریزی و قارچ‌های حل کننده فسفات را روی گندم مورد بررسی قرار داد. در این آزمایش معلوم شد که تلقیح توأم قارچ‌های حل کننده فسفات و قارچ میکوریز و کوددهی با سنگ فسفات عملکرد ماده خشک گیاهی را به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به تیمارهای بدون تلقیح و تلقیح تک‌تک آنها، افزایش می‌دهد.

غلظت فسفر در بخش هوایی گیاه

شکل ۲ نشان می‌دهد که صرف‌نظر از سطوح فسفر، تیمار باکتری (*Pseudomonas putida*) با (*Bradyrhizobium*) (M_1B_1)، بیشترین غلظت فسفر را در بخش هوایی ایجاد کرده و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (بدون حل کننده فسفات و بدون (*Bradyrhizobium*)) و سایر تیمارها در سطح احتمال پنج درصد داشت. به نظر می‌رسد که افزایش تثبیت نیتروژن در

Archive of SID

www.SID.ir

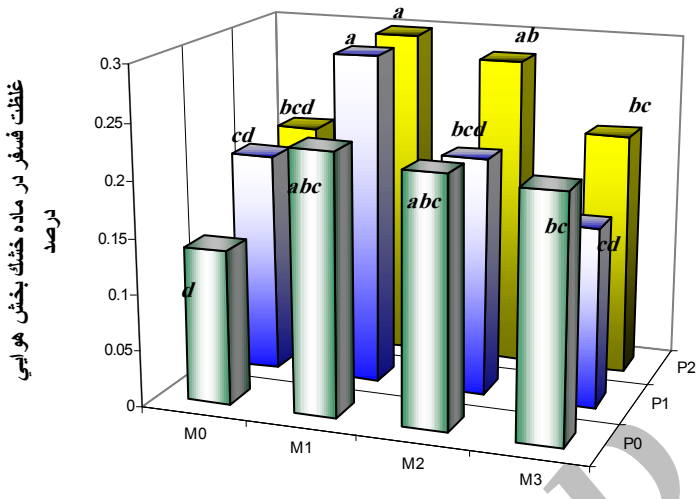


شکل۲. اثر توام باکتری‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium*) بر غلظت فسفر در بخش هوایی سویا (آزمون توکی)

گره‌های ریشه‌ای توسط باکتری هم‌زیست و یا مکانیسم‌های مربوط به خصوصیات PGPR در PSB و باکتری هم‌زیست باعث افزایش رشد گیاه شده است. نتایج آزمایش‌های چابوت و همکاران (۹) حاکی از آن است که (*Bradyrhizobium*) علاوه بر تثبیت نیتروژن می‌تواند به عنوان PGPR نیز تلقی شود و قادر به انحلال فسفات آلی و معدنی باشد. میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات نیز با انحلال فسفات، مقادیر زیادی فسفر محلول در اختیار گیاه قرار می‌دهند و چون گیاه رشد خوب و سیستم ریشه‌ای گسترش یافته دارد مقادیر بیشتری از فسفر محلول را جذب می‌کند. در واقع بین میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium*) اثر سینرژیستی وجود دارد. در آزمایشی مشخص شده است که تلقیح توأم ریزوبیوم، قارچ میکوریزی و ریزوباکتری‌های حل کننده فسفات در ریزوسفر یونجه باعث افزایش جذب فسفر و نیتروژن در این گیاه می‌شود (۲۸). شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین غلظت فسفر به باکتری (*Pseudomonas putida*) در سطح سوم کود فسفره (P_2) مربوط است و تیمار شاهد (بدون حل کننده فسفات و بدون کود فسفره) کمترین غلظت فسفر را در بخش هوایی ایجاد کرده است. تیمارهایی که فاقد باکتری حل کننده فسفات بودند، تفاوت معنی‌داری از نظر جذب فسفر با یکدیگر نداشتند. با وجود این، تیمار M_0P_2 نسبت به M_0P_1 غلظت فسفر بالاتری را در بخش هوایی گیاه ایجاد نمود. در سایر سطوح باکتری حل کننده فسفات نیز همان گونه که مشاهده می‌شود، هر باکتری در سطح P_2 نسبت به سطح P_1، سبب افزایش غلظت فسفر در گیاه شده است ($P<0/05$) ولی این افزایش برای باکتری (*Pseudomonas putida*) (M_1) ناچیز بود که می‌توان این گونه اظهار داشت که در تیمار باکتری (*Pseudomonas putida*)، مقدار ماده خشک بیشتر بوده، لذا به دلیل اثر رقت تغییر زیادی در غلظت فسفر دیده نمی‌شود در صورتی که مقدار جذب زیاد شده است. چابوت و همکاران (۸) اظهار داشتند در خاک‌هایی که مقدار کود فسفره کمتری دریافت کرده بودند تلقیح گیاهان با باکتری‌های حل کننده فسفات، جذب فسفر را افزایش نداد. در آزمایش حاضر (شکل ۳) تیمارهایی که کود فسفره دریافت نکرده و فقط دارای حل کننده فسفات بودند، غلظت فسفر در بخش هوایی گیاه تفاوت معنی‌داری با غلظت فسفر تیمار شاهد (M_0P_0) داشت لیکن این افزایش منجر به افزایش ماده خشک نشد. صالح و همکاران (۲۳) نشان دادند که قارچ‌های حل کننده فسفات، فسفر قابل دسترس را به طور معنی‌داری در خاک‌هایی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. اثر توام باکتری‌های حل کننده فسفات و سطوح فسفر کودی از نظر غلظت فسفر در بخش هوایی سویا (آزمون توکی)

که با سوپر فسفات تریپل کوددهی شده بودند، افزایش دادند. سینگ و کاپور (۲۶) نیز گزارش کردند که تلقیح میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات با سنگ فسفات یا بدون آن، باعث افزایش عملکرد باقلا می‌شود و جذب فسفر توسط گیاه نسبت به شاهد تلقیح نشده افزایش می‌یابد.

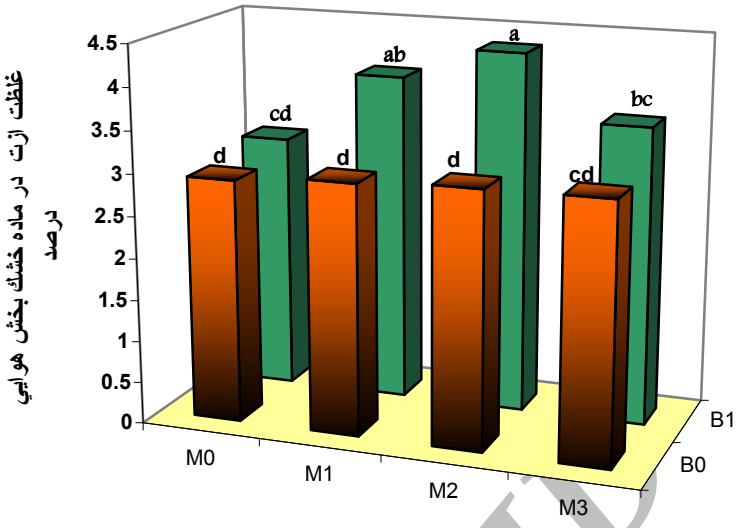
غلظت نیتروژن در بخش هوایی گیاه

با توجه به شکل ۴ تیمارهای دارای (*Bradyrhizobium*) و باکتری حل کننده، بیشترین مقدار نیتروژن را در بخش هوایی داشتند و کمترین درصد نیتروژن مربوط به تیمار شاهد (بدون باکتری حل کننده فسفات و بدون (*Bradyrhizobium*)) بود و بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. اگر چه درصد نیتروژن در تیمارهای بدون باکتری (*Bradyrhizobium*) در هر یک از باکتری‌های حل کننده از نظر آماری (به جزء M_3) تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی کمترین درصد نیتروژن مربوط به M_0B_0 و بیشترین درصد آن مربوط به M_3B_0 بود. غلظت بیشتر نیتروژن در M_0B_1 نسبت به M_0B_0، تأثیر مهم‌تر فاکتور (*Bradyrhizobium*) را نسبت به حل کننده فسفات مشخص می‌کند. با توجه به این‌که در این آزمایش از کود نیتروژن‌دار استفاده نشده بود، لذا افزایش غلظت نیتروژن در بخش هوایی گیاه ناشی از تثبیت نیتروژن توسط باکتری هم‌زیست در گره‌های ریشه‌ای تیمارهای دارای باکتری بود. تأثیر توام باکتری حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium*) بر غلظت نیتروژن گیاه را می‌توان به رابطه سینرژیستی بین آنها مربوط دانست. در تحقیقی که تورو و همکاران (۲۸) انجام دادند، مشخص شد که تلقیح هم‌زمان ریزوبیوم و ریزوباکتری‌های حل کننده فسفات و قارچ میکوریزی در ریزوسفر یونجه باعث افزایش معنی‌دار نیتروژن در گیاه می‌شود. در آزمایشی نیز تحریک قابل ملاحظه رشد و گره‌زایی ریشه سویا توسط تلقیح توأم آزوسپریلوم و (*Bradyrhizobium*) گزارش شده است. در این آزمایش آزوسپریلوم به‌عنوان PGPR بود و محققین افزایش رشد گیاهی و گره‌زایی ریشه سویا را به افزایش تشکیل ریشه‌های موئین، جذب آب و مواد معدنی و تثبیت نیتروژن توسط آزوسپریلوم و آثار سینرژیستی بین دو باکتری مربوط دانستند (۱۷).

غلظت پتاسیم بخش هوایی گیاه

با مقایسه تأثیر گونه‌های باکتریایی حل کننده فسفات بر غلظت پتاسیم در بخش هوایی گیاه (جدول ۳) معلوم می‌شود که بیشترین غلظت پتاسیم، حاصل عمل (*Pseudomonas putida*) است که بالاترین پتانسیل انحلال فسفر را نیز دارا بود. هر چند

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴. اثر توام باکتری‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium*) از نظر غلظت ازت در بخش هوایی سویا (آزمون توکی)

از نظر آماری بین تیمار شاهد و دو باکتری حل کننده فسفات دیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ولی کمترین غلظت پتاسیم، در تیمار شاهد (بدون حل کننده فسفات) اتفاق افتاد. این نتایج حاصل از تأثیر مثبت حل کنندگان فسفات بر جذب پتاسیم می‌باشد. از جمله مکانیسم‌های احتمالی می‌توان به دو مورد اشاره کرد: ۱- به‌عنوان PGPR با تولید هورمون‌های گیاهی سبب توسعه سیستم ریشه و افزایش سطح جذب می‌شوند. ۲- با تولید پروتون و سایدروفورها احتمالاً در رهاسازی K^+ از کانی‌ها مؤثر می باشند.

آزکون و همکاران (۶) گزارش کردند که باکتری‌های حل کننده فسفات می‌توانند با سنتز هورمون‌های گیاهی باعث افزایش رشد گیاهی شوند به این ترتیب که مراحل اولیه رشد گیاهی را تحت تأثیر قرار داده و ریشه حجم بیشتری از خاک را اشغال می‌کند و سطح جذب افزایش می‌یابد. در اکثر تحقیقات انجام یافته، تولید اسید از جمله مکانیسم‌های عمده انحلال فسفات توسط میکروارگانیسم‌ها ذکر شده است (۴، ۸ و ۱۴). میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات هم‌چنین می‌توانند با تولید کلات و تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های فلزی، غلظت فلزات را کاهش داده و سبب رهاسازی آنها از کانی‌ها شوند(۲).

وزن دانه در بوته

طبق جدول ۳ مقایسه میانگین سطوح فسفر کودی نشان می‌دهد که سطح P_2 کود، بیشترین وزن دانه در بوته را ایجاد کرده است ولی این مقدار از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سطح P_1 در سطح احتمال ۵ درصد نداشت. لذا این‌گونه می‌توان بیان کرد که احتمالاً دو سطح کود فسفر تأثیر یکسانی داشته است. در آزمایشی که آراجو و همکاران(۵) انجام دادند نشان داده شد که در دسترس بودن فسفر بیشتر توسط کوددهی، باعث افزایش تثبیت نیتروژن در لوبیا شده و عملکرد دانه افزایش می‌یابد. سینگ (۲۵) نیز در آزمایشی افزایش عملکرد دانه سویا را هنگامی که با باکتری (*Bradyrhizobium*) تلقیح شده بود، گزارش کرد.

تعداد، وزن تر و وزن خشک گره

مقایسه میانگین اثر باکتری‌های حل کننده فسفات (جدول ۳) بیانگر این است که باکتری (*Pseudomonas putida*) نسبت به دو باکتری دیگر بیشترین تعداد گره، وزن تر و وزن خشک گره را ایجاد کرده و در مورد تعداد و وزن تر گره با تیمار شاهد (M_0) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد داشت. در

Archive of SID
www.SID.ir

مورد وزن خشک گره اگر چه تیمار (*Pseudomonas putida*) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با دو باکتری حل کننده فسفات دیگر و تیمار شاهد (M_0) نداشت ولی دارای بیشترین وزن خشک گره بود. از آنجا که باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر شاخص‌های گره‌بندی اثر معنی‌دار داشته ولی سطوح فسفر بر این شاخص‌ها تأثیر معنی‌داری نداشتند، نشان می‌دهد که اثر باکتری‌های حل کننده فسفر بر گره‌بندی غیر از مکانیسم انحلال فسفر است و مکانیسم‌های دیگری مطرح هستند.

وسیول و همکاران (۳۰) در تحقیقی که روی سویا انجام دادند، متوجه شدند که تلقیح باکتری حل کننده فسفات به نام (*Pseudomonas striata*) به همراه باکتری (*Bradyrhizobium*) گره‌زایی و وزن خشک گره‌ها را افزایش داد. روزاس و همکاران (۲۲)، آزمایش مزرعه‌ای روی سویا انجام دادند. در این آزمایش که آثار متقابل بین باکتری هم‌زیست سویا (*Bradyrhizobium*) و باکتری حل کننده فسفات به نام (*Pseudomonas putida*) مورد بررسی قرار گرفت، محققین گزارش کردند که هنگام تلقیح توأم این دو باکتری، افزایش معنی‌داری در گره‌زایی ریشه‌ها مشاهده می‌شود. مولاو همکاران (۱۷) تحریک قابل ملاحظه رشد و گره‌زایی ریشه سویا را توسط تلقیح توأم (*Bradyrhizobium*) و آزوسپریلوم گزارش کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

در حالت کلی می‌توان گفت که استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات بر روی اغلب صفات تأثیر معنی‌داری داشته و باعث افزایش عملکرد گیاه شده است. اثر تلقیح PSB (باکتری‌های حل‌کننده فسفات) در مقایسه با تیمارهای کود فسفره حاکی از برتری تیمار PSB (به ویژه (*Pseudomonas putida*)) در میزان تولید ماده خشک گیاهی در سطح یکسان فسفر بوده است. برای این‌که بتوان نتایج آزمایش گلخانه‌ای را به شرایط طبیعی تعمیم داد، باید با استفاده از باکتری‌های مؤثر که در این آزمایش معرفی شدند آزمایش‌ها مزرعه‌ای مشابه در شرایط طبیعی صورت گیرد. با توجه به اثر مفید باکتری‌های حل کننده فسفات بر شاخص‌های رشدی سویا که در این آزمایش مشاهده گردید، می‌توان با به‌کارگیری این باکتری‌ها به‌صورت کودهای میکروبی در سطح وسیع، از مصرف کودهای فسفاته کاست.

منابع مورد استفاده

۱. علی احیایی، م. و ع. ا. بهبهانی‌زاده. ۱۳۷۲. شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. چاپ اول، وزارت کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه فنی شماره ۸۹۳.

۲. علی اصغرزاده، ن. ۱۳۷۶. *میکروبیولوژی و بیوشیمی خاک* (ترجمه). چاپ اول، انتشارات دانشگاه تبریز.

۳. کاظمی، م. ۱۳۷۷. چگونگی استفاده از کودهای شیمیایی (فسفره، پتاسه) و آلی در افزایش تولید سویا. شورای عالی سیاست گذاری، کاهش مصرف سموم و مصرف بهینه کودهای شیمیایی، نشریه شماره ۱۰.

4. Antoun, H. 2002. Field and greenhouse trials performed with phosphate solubilizing bacteria and fungi. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University, 16-19 July 2002. Salamanca, Spain.
5. Araujo, A. P., M.G. Teixeira and D.L. De Almeida. 1996. Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean under biological nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 29: 951-957.
6. Azcon, R., J.M. Barea and D.S. Hayman. 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. Soil Biol. Biochem. 8: 135-138.
7. Attoe, O. J. and R. A. Olsen. 1966. Factors affecting the rate of oxidation of elemental sulfur and that added in rock phosphate sulfur fusion. Soil Sci. 101: 317-324.
8. Chabot, R., H. Antoun and M. Cescas. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate – solubilizing

Archive of SID

www.SID.ir

Rhizobium leguminosarum biovar *Phaseoli.* Plant and Soil 184: 311-321.
9. Chabot, R., C. Beauchamp, J. Kloepper and H. Antoun. 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate solubilization *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli*. Soil Biol. Biochem. 30: 1615-1618.
10. Cappuccino, J. G. 1987. Microbiology: A laboratory manual. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., USA.
11. Cotteni, A. 1980. Methods of plant analysis. *In*: Soil and Plant Testing FAO Soils Bulletin. 38/2, pp. 64-100.
12. Dileep Kumar, S. B., I. Berggren and A. M. Martensson. 2001. Potential for improving pea production by co-inoculation with Fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. Plant and Soil 229 (1): 25-34.
13. Freitas, J. R., M. R. Banerjee and J. J. Germida. 1996. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola. Biol. and Fertil. of Soils 24: 358-364.
14. Illmer, P., A. Barbato and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. Soil Biol. Biochem. 3: 265-270.
15. Kim, K. Y., D. Jordan and D. A. Mcdonald. 1996. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. Biol. and Fertility of Soils 24: 347-352.
16. Modaihsh, S., W. A. Mustafa and A. E. Metwally. 1989. Effect of elemental sulfur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils. Plant and Soil 116: 954-101.
17. Molla, A. H., Z. H. Shamsuddin, M. S. Halimi, M. Morziah and A. B. Putech. 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. Soil Biol. Biochem. 33: 457-463.
18. Olivera, M., C. Iribarne and C. Lluch. 2002. Effect of phosphorus on nodulation and N_2 fixation by bean (*Phaseolus vulgaris*). Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
19. Omar, S. A. 1998. The role of rock-phosphate solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. and Biotechnol. 14: 2.
20. Peix, A., A. A. Rivas-Boyero, P. F. Mateos, C. Rodriguez-Barrueco, E. Martinez-Molina and E. Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem. 33: 103-110.
21. Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier and H. Antoun. 2001. Solubilization of phosphate roks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium regulosum*. Soil Biol. Biochem. 33: 1741-1747.
22. Rosas, S., M. Rovera, J. Andres and N. Correa. 2002. Effect of phosphorous solubilizing bacteria on the rhizobia-legume symbiosis. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial phosphate Solubilization. Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
23. Salih, H. M., A. I. Yahya, R. A. Abdul and B. H. Munam. 1989. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. Plant and Soil 120: 181-185.
24. Seilsepour, M., E. Baniani and M. Kianirad. 2002. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) in reducing the rate of phosphate fertilizers application to cotton crop. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Salamanca University, 16-19 July. Salamanca, Spain.
25. Singh, H. P. 1994. Response to inoculation with *Bradyrhizobium*, vesicular-arbuscular mycorrhiza and phosphate solubilizing microbes on soybean in a mollisol. Indian J. Microbiol. 34: 27-31.
26. Singh, S. and K. Kapoor. 1998. Effects of inoculation of phosphate solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrizal fungus on mungbean grown under natural soil condition. Mycorrhiza. 7 (5): 249-253.
27. Subba Rao, N. S. 1986. Soil Microorganism and Plant Growth. IBH Pub. Co., PVI. LTD., Oxford.
28. Toro, M., R. Azcon and J. M. Barea. 1998. The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* geneotype, mycorrhizal fungi ،phosphate solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorous acquistion by medicago sativa. New Phytologists 138: 265-273.
29. Tripura, C. B. and A. R. Podile. 2002. Isolation and screening of phosphate solubilizing bacteria on tricalcium phosphate containing media. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
30. Wasule, D. L. S. R. Wadyalkar and A. N. Buldo. 2002. Effect of phophate solubilizing bacteria on role of *Rhizobium* on nodulation by soybean. Proceedings of the 15th Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.

Archive of SID

www.SID.ir