پژوهش و سازندگی
شماره ۶۵، زمستان ۱۳۸۳
در منابع طبیعی

# جداسازی و شناسایی باکتریهای محلول‌کننده فسفات از خاک های جنگلی واز

• مریم تیموری، • سودابه علی احمد کروری، • محمد متینی‌زاده • مصطفی خوشنویس
اعضای هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۳

## چکیده

اثرات نامناسب زیست محیطی به دنبال مصرف کودهای شیمیایی روز به روز باعث افزایش اهمیت کودهای زیستی (بیولوژیک) شده است. تعدادی از میکروارگانیسمهای هتروتروف و اتوتروف خاک توانایی محلول کردن فسفات غیر آلی را در طی فرآیندهای متابولیک خود به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم دارند که میکروارگانیسم‌های محلول کننده فسفات نامیده می‌شوند. در این بررسی پتانسیل باکتریهای محلول کننده فسفات در جنگل تحقیقاتی واز مورد بررسی قرار گرفت. باکتریهای محلول کننده فسفات با روش رقتهای متوالی بر روی محیط کشت اختصاصی جدا سازی و با استفاده از روشهای رنگ آمیزی و آزمایشهای بیوشیمیایی شناسایی شدند .تعداد باکتریهای محلول کننده فسفات بین $۲/۸۸\times۱۰^{۳}$ – ۱/۷ سلول در هر گرم خاک متغیر بوده و حدود ۲-۱ ٪ کل باکتریهای خاک را تشکیل می‌دهد. ۹ باکتری پس از خالص سازی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی و آزمونهای بیوشیمیایی شناسایی شدند که عبارتند از:

*Psuodomonas acidovorance*. *Psuodomonas vesicularis* . *Psuodomonas fluorescence* .*Enterobacter agglomerans* . *Enterobacter aerogenese* . Bravibacterium ، Alcaligenese sp ، Actinobacillus sp و Xanthobacter sp..

توانایی گونه‌های سودوموناس در انحلال منابع متفاوت فسفات بیش از سایر باکتری‌های جدا شده بوده است. به‌علاوه باکتری‌ها مقاومت بالایی را به شرایط سخت محیطی نشان دادند .میزان وزن خشک و فسفر دانه رستهای حاصل از بذور تلقیح شده با باکتری‌های محلول کننده فسفات بیش از گیاهان کنترل بود. در مجموع نتایج بدست آمده نشان‌دهنده توانمندی بالای خاک‌های جنگل واز از نقطه نظر امکان تولید کودهای زیستی است.

کلمات کلیدی : فسفر، باکتری ، انحلال فسفات

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi



www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No:65 pp: 57-64

**Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Vaz forest soil**.

*By: Teimouri M, Korori S.A.A., Matinizadeh M. and Khoshnevis M.Member of Scientific Board,. Echophysiology and Biotechnology Group. Forest Research Division- Research Institute of Forests and Rangelands.*

The importance of biological fertilizer have been increased because use of chemical fertilizer cause some damages in environment. Some soil autotroph and heterotroph microorganisms solubilize inorganic phosphate during their metabolic processes directly and indirectly. These microorganisms are called phosphate solubilizing microorganisms (PSM).. In this investigation the potential of phosphate solubilizing bacteria (PSB) was studied in Vaz forest. PSB were isolated by serial dilution method and identified by staining and biochemical tests. The population of PSB ranged 1/7 – 2.88 * $10^3$ cftu/g soil that constitute 1-2% of total bacteria. Isolated bacteria were identified as: *Psuodomonas acidovorance*, *Psuodomonas vesicularis, Psuodomonas florescence, Enterobacter aggluomerance, Enterobacter aerogenese*, Bravibacterium. sp. Alcaligenese, sp. Actinobacillus and Xanthobacter. sp. Isolated bacteria showed different ability in solubilizing of different phosphate sources but the potential of Psuodomonas spp were more than others. In addition PSB showed resistance against undesirable environmental condition. Dry weight and phosphate content were higher in inoculated seedlings than controls. Results indicated the high potential of Vaz forest soil for production of biofertilizers,

**Key words**: Phosphorous, Bacteria, and Phosphate solubilizing

## مقدمه

عنصر فسفر موقعیت مهمی را در رشد گیاه و بیولوژی خاک دارد. این عنصر در ساختمان ترکیبهای آلی و غیر آلی خاک، گیاهان و میکروارگانیسمها وجود دارد. نقش اصلی و فیزیولوژیک آن تجمع و آزاد کردن انرژی در طی متابولیسم سلولی است(۴). اشکال مختلف فسفر توسط سلولهای زنده جذب می‌شود اما قسمت اعظم آن به شکل $HPO_4^{2-}$ یا $H_2PO^{4-}$ جذب سلول می‌شود. بنابراین فسفات غیر آلی آزاد نقش کلیدی در چرخه فسفر دارد . فسفات غیر آلی آزاد علاوه بر کود دهی از طریق تجزیه آنزیمی‌ترکیبهای فسفاته آلی و غیر آلی و نیز محلول شدن غیر آنزیمی انواع سنگ معدن فسفات و منابع فسفر دار غیر آلی به خاک اضافه می‌شود(۴).

در سالهای اخیر استفاده از سنگ معدن فسفات به عنوان کود فسفاته، محلول شدن سنگ معدن فسفات به وسیله میکروارگانیسمها و افزایش فسفر در دسترس بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

برای اولین بار در سال ۱۹۰۳ انحلال فسفات کلسیم، پودر استخوان و سنگ معدن فسفات توسط باکتری‌ها در محیط آگاردار گزارش شد. سپس در سال ۱۹۰۸ محلول شدن تری فسفات کلسیم بوسیله باکتری‌های جدا شده از شیر و عصاره خاک در محیط گزارش و آنها را تحت عنوان کلی میکروارگانیسم‌های محلول کننده فسفات[1] (PSM) نامیدند .این میکروارگانیسمها با تولید متابولیت‌های اولیه و ترشح در خاک قادرند بر ترکیبهای آلی و معدنی فسفاته اثر گذاشته موجب آزاد شدن فسفر و حل شدن آن در محلول خاک شوند (۸)

مطالعه انجام شده در مورد جمعیت باکتری‌ها و قارچهای محلول کننده فسفات در خاک‌های کشت شده و کشت نشده آلبرتا نشان داد که $PSM_s$ ۰/۰۵-۱٪ از کل جمعیت باکتری‌ها و قارچهای خاک را تشکیل می‌دهند بین میزان فسفر کل خاک و جمعیت میکروارگانیسم‌های محلول کننده فسفات نیز رابطه معنی‌داری وجود داشت (۱۲).

بررسی معدنی شدن میکروبی فسفات غیر آلی نشان داد که میکروارگانیسم‌های محلول کننده فسفات جدا شده از خاک ناحیه ریزوسفر و غیر ریزوسفر از انواع باکتری قارچ و اکتینومیست بودند (۱۵). بررسی وجود و فعالیت قارچهای محلول کننده فسفات در خاک باغهای نارگیل نشان داد که تعداد آنها در خاک‌های رسی بیش از خاک‌های شنی بود. قارچهای جداسازی شده قادر بودند که ۲۶-۷۴٪ از تری فسفات کلسیم را در مدت ۵-۱۵ روز به شکل محلول در آورند (۱۷).

انحلال فسفات غیر آلی توسط دو گونه از پنی سیلیوم در محیط مایع و خاک با کاهش اسیدیته محیط رابطه مستقیم داشت. تلقیح خاک با گونه‌های پنی سیلیوم باعث افزایش میزان وزن خشک گیاه تا ۱۶٪ و جذب فسفر تا ۱۲٪ شد(۶). بررسی وجود باکتریهای محلول کننده فسفات در خاکهای عراق نشان دهنده وجود آنها در بیش از ۹٪ نمونه‌های خاک بود. بین تعداد باکتری‌ها و برخی خصوصیات خاک مانند هدایت الکتریکی فسفر در دسترس، ظرفیت تبادل کاتیونی ,, رطوبت خاک مواد آلی و اسیدیته خاک رابطه وجود دارد (۲۰) .

محلول شدن فسفات غیر آلی به‌وسیله میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک‌های جنگلی نشان داد که یک گونه از سودوموناس و پنی سیلیوم فعالیت بیشتری در بین ۶۰ میکروارگانیسم جداسازی شده داشت. مکانیسم احتمالی انحلال تولید اسیدهای آلی بوده است (۱۰) .

محلول شدن ترکیب بسیار نامحلول فسفات آلومینیوم ($Al PO_4$) نشان داد که کارایی یک گونه از آسپرژیلوس دو گونه از پنی سیلیوم و یک گونه



Archive of SID
www.SID.ir

از سودوموناس بسیار بالا بود. مهم ترین مکانیسم انحلال تولید اسیدهای آلی بوده است اما به نظر می‌رسد مکانیسم‌های دیگری نیز ممکن است نقش داشته باشد (۱۱) .

بررسی وجود باکتری‌های محلول کننده فسفات [۲] ( PSB ) در خاکهای مناطق جنوب و شمال هیمالیا نشان داد که تعداد این باکتری‌ها در افق A بیش از B بوده است. در بیشتر نمونه‌های خاک‌های کشت شده تعدادPSB کمتر از ۱۰٪ کل باکتریها گزارش شد. از طرف دیگر تعداد آنها در خاک‌های جنگلی و مرتعی بیشتر از خاک زمین‌های زراعی بوده است. به علاوه تعداد آنها در نواحی با آب و هوای معتدل و مرطوب بیش از نواحی گرم و خشک بوده است (۹) .

در سال ۲۰۰۰ وجود میکروارگانیسم‌های محلول کننده فسفات در ریزوسفر درختان مانگرو نواحی نیمه خشک مکزیک گزارش شد. در این مطالعه از تری فسفات کلسیم به عنوان منبع فسفات نامحلول استفاده شد.باکتریهای جداسازی شده متعلق به جنسهای باسیلوس ، ویبریو، گزانتوباکتر، انتروباکتر، کلیورا ، سودوموناس، ریزوموناس و یک گونه ناشناخته بودند ( ۱۸) .

## مواد و روشها

چهار پلات ۲۵۰۰ متر مربعی برای نمونه برداری در جنگل تحقیقاتی واز واقع در ۳۰ کیلو متری شهرستان چمستان (استان مازندران ) انتخاب شد.

### مشخصات عمومی پلات‌ها

الف: پلات شماره ۱ در ارتفاع ۱۶۴۰ متری از سطح دریا قرار داشته شیب عمومی‌آن ۲۸٪ و جهت ۵۰ درجه شمالی بود گونه غالب این پلات ممرز بوده ولی در واقع راشستان تغییر یافته‌ای است که بیشتر پایه‌های آن را ممرز تشکیل می‌دهند. تک پایه‌های راش و گونه‌های معرف کف راشستان‌های خالص به فراوانی در این پلات وجود داشتند خاک منطقه از نوع خاکهای قهوه‌ای جنگلی ، فاقد فرسایش و عمق آن بیش از ۲ متر است. هوموس قهوه‌ای تیره و عمق آن حدود ۱ سانتیمتر است.

ب: پلات شماره ۲ در ارتفاع ۱۶۸۰ متری از سطح دریا قرار داشت. شیب عمومی آن ۱۱ ٪ و در جهت ۵۰ درجه شمالی قرار داشته است. گونه غالب این پلات ممرز بود. خاک منطقه از نوع خاکهای قهوه‌ای جنگلی ، فاقد فرسایش و عمق هوموس آن حدود ۱ سانتیمتر است .

ج: پلات شماره ۳ در ارتفاع ۱۳۸۰ متری از سطح دریا قرار داشت. شیب عمومی آن ۲۶ ٪ و جهت آن ۲۳۰ درجه جنوب غربی بوده است. گونه غالب این پلات راش است. این پلات راشستان خالصی است که اغلب پایه‌ها در مرحله دار بوده و تک پایه‌های قطور مادری نیز در توده به چشم می‌خورد. با توجه به حضور گونه‌های ازگیل، ولیک و پوشش گیاهی کف ضعیف و هم سال بودن راش های موجود به احتمال بسیار زیاد در گذشته‌ای نه چندان دور در توده حاضر قطع یکسره انجام گرفته است. جنس خاک منطقه از نوع خاک قهوه‌ای جنگلی، هوموس کاملاً تجزیه شده و عمق آن حدود ۴ سانتیمتر است.

د: پلات شماره ۴ در ارتفاع ۱۱۰۰ متری از سطح دریا قرار داشت. شیب عمومی‌آن ۸۷ ٪ و جهت آن ۲۸۰ درجه غربی بوده است. گونه غالب این پلات انجیلی و ممرز هستند. جامعه اصلی ممرزستان تخریب شده ای است که مرز پایین آن گونه های پیشرو در توالی اکوسیستم‌های جنگلی مختص مناطق تخریب شده اعم از ولیک و ازگیل مستقر شده اند و در فواصل آنها زادآوری انبوه شمشاد به چشم می‌خورد. عمق خاک بیش از ۱ متر بوده و رنگ آن بین کرم تا قهوه‌ای متغیر است. در اثر قطع بی رویه ، بخش عمده‌ای از تاج پوشش باز شده و همین امر موجب فرسایش شدید خاک و بیرون زدگی سنگ مادری در برخی مناطق شده است.

### نمونه برداری از خاک

در هر پلات از عمق ۱۰-۳۰ سانتیمتری خاک ۴ نمونه تهیه و پس از مخلوط شدن به عنوان نمونه شاخص منطقه نامگذاری شد. نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شدند هر کدام از نمونه‌ها در آزمایشگاه به دو بخش تقسیم شدند. بخش اول در معرض هوا خشک شده و پس از گذراندن از الک ۲ میلیمتری از آن برای بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک استفاده شد . بخش دوم در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و از آن برای جداسازی و شناسایی باکتریهای محلول کننده فسفات استفاده شد(۲۰ ).

### آزمایشهای فیزیکی و شیمیایی خاک

برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بافت خاک، اسیدیته، هدایت الکتریکی، میزان فسفر کل ، فسفر محلول و کربن آلی اندازه گیری شدند (۱و۳).

### جداسازی و شناسایی باکتری‌های محلول کننده فسفات

برای جداسازی باکتریها از روش رقتهای متوالی و کشت بر روی محیط اختصاصی Seperb استفاده شد. از هر کدام از نمونه‌ها ۱ گرم خاک وزن و در ارلنهای محتوی ۹۹ میلی لیتر کلرید سدیم ۰/۲ ٪ اضافه شد. ارلن ها بر روی همزن مغناطیسی با دور ۱۵۰ در دقیقه قرار گرفته و به مدت ۲ ساعت مخلوط شد. سپس از این رقت ( $10^{-2}$ )، رقتهای متوالی تا رقت $10^{-7}$ تهیه و بر روی محیط کشت Seperb با pH نهایی ۷/۲ حاوی تری فسفات کلسیم به‌عنوان منبع فسفات نامحلول کشت شد. اجزای تشکیل دهنده محیط کشت در جدول شماره ۱ آورده شده است. برای جلوگیری

جدل شماره ۱- ترکیب محیط کشت Seperb

| نام ترکیب | مقدار مورد استفاده |
|---|---|
| گلوکز | ۱۰ گرم |
| عصاره مخمر | ۰/۵ گرم |
| کلرید کلسیم | ۰/۱ گرم |
| تری فسفات کلسیم | ۲/۵ گرم |
| سولفات منیزیوم | ۰/۲۵ گرم |
| آگار | ۱۵ گرم |
| آب مقطر | ۱۰۰۰ میلی لیتر |



Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲ – مشخصات خاک شناسی پلاتها

| پلات | عمق Cm | ٪ رس | ٪ سیلت | ٪ شن | بافت | ٪ مواد آلی | فسفر کل ppm | فسفر در دسترس ppm | PH | EC ds/m |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| شماره ۱ | ۱۰-۳۰ | ۲۴/۶ | ۳۰/۶۴ | ۲۴/۷۶ | رسی | ۱/۸ | ۶۲۰ | ۲۲/۵ | ۷/۱ | ۰/۲۲۹ |
| شماره ۲ | ۱۰-۳۰ | ۵۵/۳۴ | ۳۶/۵۲ | ۸/۱۴ | رسی | ۰/۸ | ۵۹۵ | ۴/۷ | ۵/۸۴ | ۰/۴۴ |
| شماره ۳ | ۱۰-۳۰ | ۵۶/۲۴ | ۳۱/۳۴ | ۱۲/۳۳ | رسی | ۱/۲۵ | ۶۱۰ | ۱۴/۸ | ۶/۵۹ | ۰/۴۴ |
| شماره ۴ | ۱۰-۳۰ | ۴۶/۰۲ | ۲۸/۲۵ | ۲۸/۷ | رسی | ۱/۶۵ | ۶۰۰ | ۶/۵ | ۷/۳۷ | ۰/۲۲۵ |

از رشد قارچها از آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید[۴] به مقدار ۵۰۰ میلی گرم در هر لیتر از محیط کشت استفاده شد. سیکلوهگزیمید در استون خالص حل شده و پس از استریل کردن محیط کشت به آن اضافه شد (۲). ۱ میلی لیتر از هر کدام از رقتها به محیط کشت اضافه و با استفاده از میله شیشه ای سرکج بر روی محیط کشت به شکل یکنواخت پخش شد محیط کشتها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری شدند. محیط‌های کشت هر روز بازبینی شده و باکتری‌های محلول کننده فسفات که با داشتن هاله شفاف در اطراف کلنی مشخص می‌شوند جداسازی و خالص سازی شدند. خالص سازی باکتریها در محیط کشت نوترینت آگار (محصول مرک) صورت گرفت. ابتدا از باکتریها لام تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی شدند. همه باکتریها به گروه باکتری‌های گرم منفی تعلق داشتند. در مرحله بعد از آزمونهای کاتلاز، پراکسیداز، نحوه تجزیه گلوکز (فرمانتاتیو یا اکسیداتیو) ، نیاز به محیط‌های اختصاصی برای رشد، رشد در محیط مک کانگی ، نحوه تجزیه لاکتوز (فرمانتاتیو یا اکسیداتیو) ، آزمون حرکت ، تجزیه قندهای مختلف و تولید اسید، احیای نیترات ، تجزیه ژلاتین در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، استفاده از سیمون سیترات به عنوان منبع کربن، دکربوکسیله‌کردن اسیدهای آمینه (اورنیتین ، آرژینین و لیزین ) ، تولید اندول و تجزیه نشاسته برای شناسایی باکتریها استفاده شد (۱۳).

### بررسی انحلال منابع دیگر فسفات

عملکرد باکتریهای جداسازی شده در انحلال هیدروکسی آپاتیت که فراوانترین ترکیب فسفاته در خاک است بررسی شد. برای این منظور در ترکیب محیط کشت Seperb از هیدروکسی آپاتیت به‌جای تری فسفات کلسیم استفاده شد.

### بررسی مقاومت باکتریها به شرایط سخت محیطی

محیط کشت پایه Seperb با pH های ۵-۱۱ و غلظت های ۲/۵ ، ۵ و ۷/۵ ٪ کلرید سدیم تهیه و عملکرد باکتری‌های جداسازی شده در این شرایط متفاوت بررسی شد.

### بررسی اثر باکتریهای محلول کننده فسفات در رشد گیاهان

یکی از مهمترین اهداف جداسازی و شناسایی باکتریهای محلول کننده فسفات امکان استفاده از این باکتریها به عنوان کود زیستی است. در ا ین بخش از کشت گیاه Lipidium spp در محیط هیدروپونیک استفاده شد. برای این منظور از محیط کشت مایع Seperb استفاده شد. گوی‌های شیشه‌ای در اسید نیتریک ۱۰٪ شسته شده و سپس دو بار در آب مقطر شسته می‌شوند تا بقایای اسید نیتریک کاملاً حذف شود. در هر کدام از ارلن ها ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه و ۱۰۰ عدد گوی شیشه‌ای ریخته شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند. سه ارلن با میلی‌لیتر۵ از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌های *Pseudomonas acidovorance*، *Enterobacter aerogenosa*، *E.agglomerans* که در محیط کشت جامد قدرت محلول کنندگی بالائی داشتند، تلقیح شدند. غلظت باکتریها $۳ \times ۱۰^{۶ cell/ml}$ (معادل استاندارد شماره ۱ مک فارلند) بود. یک ارلن به عنوان کنترل در نظر گرفته شده و تلفیح نشد. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و پس از ۴ روز که رشد ماکروسکوپی مناسبی از باکتریها ملاحظه شد به هر کدام از ارلن ها ۲۰۰ عدد بذر Lipidium spp اضافه شدند. ارلن ها مجددا در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و پس از ۱۴ روز گیاهان برداشت شده، وزن خشک و فسفات آنها اندازه‌گیری و با گیاهان کنترل مقایسه شد میزان فسفات با استفاده از روش رنگ سنجی آبی مولیبدات تعیین شد. میزان وزن خشک نمونه‌ها نیز پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۱۰۵ درجه سانتیگراد تعیین شد (۳،۱).

## نتایج

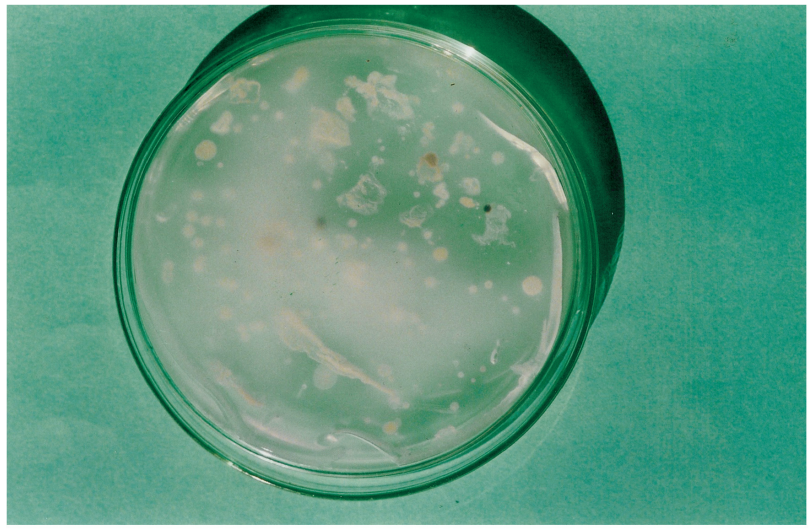
### نتایج حاصل از تجزیه فیزیکوشیمیایی خاک

در جدول شماره ۲ مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک پلات‌های نمونه‌برداری شده آورده شده است تجزیه خاک سطحی هر کدام از پلات‌ها نشان می‌دهد بافت خاک، اسیدیته، هدایت الکتریکی، میزان فسفر کل ، فسفر محلول و کربن آلی در هریک از پلات‌ها متفاوت بود.

نتایج حاصل از جداسازی باکتری‌های محلول کننده فسفات نشان می‌دهد که تمام نمونه‌های خاک آزمایش شده دارای باکتری‌های محلول کننده فسفات بودند. در شکل شماره ۱ این باکتریها که با ایجاد هاله شفاف



Archive of SID
www.SID.ir



**شکل ۱- تصویر باکتری‌های محلول کننده فسفات که با داشتن هاله شفاف در اطراف کلنی ها تشخیص داده می‌شوند**

در اطراف کلنی تشـخیص داده می‌شـوند نشان داده شـده ا ند. تعداد این باکتری‌ها متغیر بوده و به شرایط فیزیکوشیمیایی خاک بستگی دارد. تعداد باکتری‌های محلول کننده فسـفات بین $۱/۷ - ۲/۸۸ \times ۱۰^{۳}$ سـلول در هر گـرم خاک متغیر بـوده و حدود ۲-۱ ٪ کل باکتری‌های خاک را تشـکیل می‌دهند(جدول شماره ۳).

فرآینـد شناسـایی باکتری‌ها نشـان داد که بسـیاری از باکتری‌های جداسازی شده شبیه هم بوده و در مجموع ۹ نوع باکتری مختلف شناسایی شـد که تنوع باکتری‌ها در پلات شـماره ۱ بیش از بقیـه پلات‌ها بود . در جدول شـماره ۴ نوع باکتری‌های شناسایی شده و فراوانی آنها در هر کدام از پلات‌ها آورده شـده اسـت . همان طور که ملاحظه می‌شود باکتری‌های جدا سـازی و شناسـایی شـده همگی متعلـق به باکتری‌های گـرم منفی بوده و شـامل ۳ گونه سـودوموناس ، ۲ گونه انترو باکتر و یـک گونه از جنس‌های آلکالـی ژنز ، بروی باکتریوم ، گزانتوباکتر و اکتینو باسیلوس بوده است.

نتایـج حاصل از انحـلال دو منبع فسـفات ( تری کلسـیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت) در جدول شماره ۵ آورده شـده اسـت. نتایج نشـان می‌دهد که بیشـتر باکتریهای جداسـازی شـده قادرند هیدروکسی آپاتیت که فراوانترین منبع فسـفات غیر آلی در محیط است را محلول کرده و در نتیجه فسـفر را به شکل قابل استفاده تبدیل نماینـد. توانایی گونه‌های سـودوموناس بیش از سایر گونه‌ها بود.

از آنجایی که خاک‌های کشـور در مجموع به سمت شـور و قلیایی شـدن پیش می‌روند. بررسـی فعالیت محلول‌کنندگـی فسـفات در باکتری‌هـای جداسـازی شـده، در شریط سخت محیطی ( اسیدیته های مختلف و غلظت های نمک بالا) نشان داد که بیشتر باکتری‌های جداسـازی شده قادرند در خاک‌های قلیایی نیز عملکرد خود را حفـظ کنند ( جدول ۶ ). مقاومـت باکتریها به شرایط اسیدی در مقایسـه با شرایط قلیایی بیشتر بود. نتایج نشـان داد که تقریباً ۷۵٪ باکتریهای جداسـازی شده قادرند غلظت نمک ۲/۵٪ را تحمل نمایند اما فقط ۲۵٪ آنهـا در غلظت نمک ۷/۵٪ فعال هسـتند(جدول ۷). مقاومت نسـبتاً بالایی که باکتریها به شرایط سخت محیطـی از خود نشـان دادند نشـان دهنده پتانسـیل اسـتفاده از آنها به عنوان کود زیسـتی در زمین هایی با شرایط نامناسب است.

در جـدول ۸ مقدار ماده خشـک و میزان فسـفات بر حسـب میکروگرم در گرم ماده خشـک آورده شـده اسـت. نتایج نشـان می‌دهد که گیاهان تلقیح شـده با باکتری‌های محلول کننده فسـفات دارای وزن خشـک بالاتـری بودند اگر جـه این میزان فقـط در مورد گیاه تلقیـح شـده بـا *P. acidovovance* بسـیار بیش از دو باکتری دیگر بوده اسـت. از طرف دیگر میزان فسفر نیز در مـورد گیاهان تلقیح شـده با همین PSB بیش از دو باکتری دیگر بوده است.

## بحث

امروزه استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی که کاربرد آنها موجب آسیب‌های زیست محیطی فراوانی می‌شود توصیه می‌شود و روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. یکی از اولین گامها در تهیه و استفاده از کودهای زیستی بررسی پتانسیل وجود آنها در یک ناحیه و استفاده از آنها در همان ناحیه اسـت زیرا میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از یک ناحیه به شـرایط محیطی همان ناحیه سـازگارتر بوده و کارایـی بهتری خواهند داشت. متأسـفانه تا به حال در جهت بررسی پتانسیل میکروارگانیسم‌های مفید تحقیقات گسترده‌ای صورت نگرفته است. در این بررسی باکتری‌های محلول کننده فسـفات که قادرند فسـفات نامحلـول ترکیب‌های نامحلول



Archive
www.SID.ir

جدول شماره ۳- تعداد کل و تعداد باکتری‌های محلول کننده فسفات

| پلات | تعداد کل باکتریها | باکتری‌های محلول کننده فسفات |
|---|---|---|
| پلات ۱ | $۲/۴ \times ۱۰^{۵}$ | $۲/۸۸ \times ۱۰^{۳}$ |
| پلات۲ | $۱/۶۵ \times ۱۰^{۵}$ | $۱/۷ \times ۱۰^{۳}$ |
| پلات۳ | $۱/۸۷ \times ۱۰^{۵}$ | $۳/۰۸۵ \times ۱۰^{۳}$ |
| پلات۴ | $۲ \times ۱۰^{۵}$ | $۲/۴ \times ۱۰^{۳}$ |

جدول شماره۴- باکتری‌های محلول کننده فسفات شناسایی شده و وجود آنها در هریک از پلات‌ها

| سویه باکتری | پلات ۴ | پلات ۳ | پلات ۲ | پلات ۱ |
|---|---|---|---|---|
| *Pseudomonas acidovorance* | + | + | + | + |
| *Pseudomonas vesicularis* | + | _ | + | + |
| *Pseudomonas fluorescence* | _ | + | + | + |
| *Enterobacter agglomerans* | _ | + | _ | + |
| Alcaligenese spp. | _ | _ | + | + |
| Bravibacterium spp. | _ | + | + | _ |
| *Enterobacter aerogenes* | _ | _ | _ | + |
| Actinobacillus spp. | + | _ | _ | + |
| Xanthobacter spp. | _ | + | _ | + |

جدول شماره ۵- عملکرد باکتریهای محلول کننده فسفات در انحلال تری فسفات کلسیم و هیدروکسی آپاتیت

| سویه باکتری | تری فسفات کلسیم | هیدروکسی آپاتیت |
|---|---|---|
| *Pseudomonas acidovorance* | + | + |
| *Pseudomonas vesicularis* | + | + |
| *Pseudomonas fluorescence* | + | + |
| *Enterobacter agglomerans* | + | + |
| Alcaligenese spp. | + | _ |
| Bravibacterium spp. | + | _ |
| *Enterobacter aerogenes* | + | _ |
| Actinobacillus spp. | + | _ |
| Xanthobacter spp. | + | + |

معدنی را به شکل محلول و قابل استفاده برای گیاهان درآورند جداسازی و شناسایی شده است.

نتایج نشان می‌دهد که در تمام نمونه‌های خاک مطالعه شده باکتری‌های محلول کننده فسفات وجود داشتند اگرچه بخش کوچکی از جمعیت باکتری‌های خاک (۲ -۱٪ ) را تشکیل می‌دهند. یکی از دلایل کم بودن جمعیت PSB ممکن است محدویت روش مورد استفاده در جداسازی ( الک‌کردن[۵]) باکتری‌های محلول‌کننده فسفات باشد. استفاده از این روش فقط در جداسازی باکتری‌هایی کاربرد دارد که قادر به استفاده از کربوهیدرات‌ها بوده و تری‌فسفات کلسیم را به شکل محلول تبدیل می‌کنند. در این روش میکروارگانیسم‌هایی که از منبع دیگری به غیر از کربوهیدرات استفاده می‌کنند و نیز باکتری‌هایی که قادرند ترکیب های فسفاته دیگر ما نند آهن و آلومینیوم را محلول می‌کنند جداسازی و شناسایی نمی‌شوند. البته با توجه به طیف بسیار وسیع میکروارگانیسم‌های خاک استفاده از یک نوع محیط کشت که بتواند شرایط رشد را برای تمام میکروارگانیسم‌های خاک فراهم آورد ممکن نیست (۱۶).

برخی از سویه ها در ابتدای جداسازی توانایی خوبی را در انحلال فسفات از خود نشان دادند اما پس از چند بار کشت متوالی در طی مراحل خالص سازی و شناسایی توانایی خود را از دست دادند. مشاهدات مشابهی گزارش شده است (۱۶،۱۲). البته در برخی موارد فعالیت سویه‌ها افزایش یافت که نشان می‌دهد احتمالاً این سویه‌ها به کمبود فسفر سازگار شده‌اند. باکتریها از خاک‌هایی با شرایط فیزیکوشیمیایی متفاوت جداسازی شدند که این امر با یافته‌های محققین دیگر مطابقت دارد (۱۹) . با توجه به اینکه بافت خاک در هر چهار پلات یکسان و رسی است به نظر می‌رسد میزان فسفر در دسترس یکی از عوامل موثر در فراوانی این باکتریها باشد. زیرا با وجود یکسان بودن نسبی مقدار فسفر کل بین میزان فسفر در دسترس در چهار پلات تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. از آنجایی که نقش این باکتریها محلول کردن منابع طبیعی فسفر است در نتیجه وجود تعداد کمتری از این باکتریها در محیطهایی با میزان فسفر در دسترس کمتر دور از انتظار نیست (۴) به عبارت دیگر وجود میزان بالاتری از فسفر در دسترس نشان دهنده فراوانی بیشتر این باکتریها در محیط است . عامل دیگری که می‌تواند محدودکننده تعداد کل باکتریها و نیز PSB باشد میزان مواد آلی خاک است زیرا بیشتر میکروارگانیسم های محلول کننده فسفات از نوع هتروترف بوده و برای رشد به مواد آلی به عنوان منبع کربن نیاز دارند.به طوری که در پلات شماره ۱ با بیشترین در صد مواد آلی (۱/۸٪) بیشترین تعداد و در پلات شماره۳ با درصد کمتری از مواد آلی ، باکتری‌های کمتری وجود دارند. از عوامل موثر بر جمعیت باکتری‌های خاک شوری خاک است. هرچه میزان شوری خاک کمتر باشد باکتری‌های بیشتری قادر به ساکن شدن در آن خواهند بود. واکنش خاک از دیگرعواملی است که بر فراوانی باکتریها تاثیر دارد. از یک طرف باکتریها در pH خنثی تا قلیایی



Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۶- عملکرد باکتری‌های محلول کننده فسفات در محیط‌هایی با اسیدیته متفاوت.

| سویه باکتری | pH= ۵ | pH= ۶ | pH= ۷ | pH= ۸ | pH= ۹ | pH= ۱۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Pseudomonas acidovorance* | + | + | + | + | + | + |
| *Pseudomonas vesicularis* | – | + | + | + | + | + |
| *Pseudomonas fluorescence* | + | + | + | + | + | + |
| *Enterobacter agglomerans* | + | + | + | + | + | – |
| Alcaligenese spp. | – | – | + | + | + | + |
| Bravibacterium spp. | – | – | + | + | + | – |
| *Enterobacter aerogenes* | – | + | + | + | – | – |
| Actinobacillus spp. | + | + | + | + | + | + |
| Xanthobacter spp. | + | + | + | + | + | – |

بهتـر رشـد می‌کنند و از طـرف دیگر pH محیط کشـت مورد استفاده برای جداسـازی ۷/۲ است در نتیجه تعداد باکتری‌های محلول کننده فسفات در پلات شماره ۱ که pH آن شبیه به pH محیط کشت است بیش از سایر پلات‌ها بود.

نتایج مربوط به رشـد گیاهان در محیط هیدروپونیک نشان داد که وزن خشـک و فسفر گیاهان تلقیح شده با PSB بیش از گیاهان کنترلی اسـت که تلفیح نشده‌اند. که نشان دهنده امکان اسـتفاده از این باکتری‌ها به عنوان کود زیسـتی است. محققان زیـادی در زمینه اثـرات PSB بر تولید بیومس و غلظت فسـفر در گیاهان کار کرده‌اند اما نتایج ارائه شـده در بسیاری از موارد متضاد بوده اسـت. Asea و همـکاران (۵) افزایش قابل ملاحظه ای را در جذب فسفر و تولید بیومس گیاهان تلقیح شده با PSM گـزارش کردند در حالـی که محققان دیگر نتایـج مثبتی را به دنبال تلقیح گیاهان مشاهده نکردند (۱۳). به‌نظر می‌رسد نتایج این آزمایش‌ها تحت تاثیر عوامل زنده و غیر زنده بسـیاری قرار دارد و مجموع آنها باعث می‌شود پیش بینی نتایج تلقیح گیاهان با PSM به سختی ممکن باشد (۷،۵).

در مجموع نتایج بدسـت آمده نشان دهنده توانمندی بالای خاک های جنگل واز از نقطه نظر امکان تولید کودهای زیسـتی است اما شناخت بیشتر توانایی های باکتری‌های جداسازی شده نیاز به بررسـی و مطالعه بیشـتر دارد. به ویژه جنبه‌های زیست مولکولی و فرآیندهای متابولیک سـلول باید بیشـتر مورد توجه قرار گیرد. شناخت بهتر مکانیسـم‌های انحلال فسفات می‌تواند در اسـتفاده از آنها برای حاصلخیزی خاک‌هایی که از نظر فسفر فقیر هستند بسیار موثر باشد.

## پاورقی ها

۱-Phosphate solubilizing Microorganisms

2-Phosphate solubilizing bacteria

3-Serial dilution

4-Cyclohexemide

5-Screening

## منابع مورد استفاده


۱ - زرین کفش، م. ۱۳۷۲. خاک شناسـی کار بردی. انتشـارات دانشـگاه تهران. تهران. ۳۴۲ صفحه.

۲ - شـادزی . ش. ۱۳۶۷. قارچ شناسـی پزشکی، انتشارات نشـاط اصفهان. اصفهان. ۴۲۷ صفحه.

۳ - غازان شاهی.ج. ۱۳۷۶. آنالیز خاک و گیاه. نویسنده. انتشارات تهران. ۴۲۷ صفحه.

4- Alexander M. 1983; Introduction to soil microbiology. John Wielly Publication. USA. 256 P.

5 - Asea P.E. A., Kucey R.M.N. and Stewart. J.W.B. 1988; Inorganic


جدول شماره۷- عملکرد باکتری‌های محلول کننده فسفات درمحیط‌هایی با غلظت نمک متفاوت

| سویه باکتری | NaCl ۲/۵٪ | NaCl ۵٪ | NaCl ۷/۵٪ |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas acidovorance* | + | + | + |
| *Pseudomonas vesicularis* | + | + | – |
| *Pseudomonas fluorescence* | + | + | + |
| *Enterobacter agglomerans* | – | – | – |
| Alcaligenese spp. | + | + | – |
| Bravibacterium spp. | – | – | – |
| *Enterobacter aerogenes* | + | – | – |
| Actinobacillus spp. | + | + | – |
| Xanthobacter spp. | + | + | – |

جدول شماره ۸- مقادیر وزن خشک و میزان فسفات در Lipidium spp تلقیح شده با PSB و کنترل

| سویه باکتری | میزان فسفات | وزن خشک |
|---|---|---|
| *Pseudomonas acidovorance* | ۹۲۳µg P /g dry wt | ۰/۵۶۲ |
| *Enterobacter agglomerans* | ۶۵۷µg P /g dry wt | ۰/۲۲۵ |
| *Enterobacter aerogenes* | ۷۱۱µg P /g dry wt | ۰/۳۹۷ |
| Control | ۶۷۴µg P /g dry wt | ۰/۳۸۹ |



Archive of SID

www.SID.ir

phosphate solubilization by two penicillium species in solution culture and soil. Soil Biology and Biochemistry. vol 20 (4): 459-464

6- Berthelinec J. , Leyval .C., Laheurte F. and Giudici P. D. 1991. Involvement of roots and rhizosphere of microflora in weathering of soil minerals. In Plant Root Growth: an ecological perspective. Special publication series of the British Ecological Society. No 10. Blackwell Scientific. Oxford. 300 p.

7- Cuningham J.E. and Kuiack C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji*. Applied and Environmental Microbiology. vol 56: 1451-1456

8- Dadrawal K.R. 1977. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. Scientific Publisher jodhpour. Jodhpour. India. 352 p.

9- Gupta R.D., Bhardwj K.K.R., Marwah B.C. and Tripathi B.R. 1986. Occurrence of phosphate dissolving bacteria in some soils of north-west Hymalia under varying biosequence and climosequence. Journal of Indian Society of Soil Science. vol 34: 498-504.

10- Ilmer P. and Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. . Soil Biology and Biochemistry. vol 24 (4): 389-395.

11- Ilmer P., Barbato A. and Schinner F. 1995. Solubilization of hardly- soluble $AlPO_4$ with P- solubilizing microorganisms. Soil Biology and Biochemistry. vol 27(3): 265-270.

12- Kucey R.M.N . 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils .Canadian Journal of Soil Science . Vol 63: 671-678

13- MacFadine J.F. 1980. Biochemical tests for identification of bacteria. Second edition. Williams and Wilkins publication USA. 527 page.

14- Mishustin. E. N. and Naumova A. 1962. Bacterial fertilizer, their effectiveness and mode of action. Microbiology Journal. Vol 31: 442- 452.

15- Molla M.A.Z., Chowdhury A.A. , Islam A. and Hoque S. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soil.. vol 78: 393-399.

16- Seperber J.I. 1958. The incidence of a apatite-solubilizing organisms in rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural research. Vol 9: 778-781

17-Thomas.V.G.1985; Occurence and activity of phosphate solubilizing from coconut plantation soils.Plant and soil.vol.87: 354-364.

18-Vazquez.F.,Holguim.G.puente.M.E.Lopez.A. and Bashar.Y.2000; Phosphate sioubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mogroves in a semiarid castal logoan.Biology and fertility of soils.vol 30.Issue 516.460-468.

19-Venkate.S.Rao.B.and Raino P.1994; Evaluation of phosphate solubilization by microorganism isolated from arid soils. Journal of Indian Society Soil Science.vol 32 :273-277.

20- Yahya.A.L.,AL.Azawi.S.K.1989; Occurence of phosphate solubilizing bacteria from Iraq soils.Plant and soil .vol 17:135-141.

Archive of SID



www.SID.ir