بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

بخش زیست شناسی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی

گرایش میکروبیولوژی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل کننده فسفات از چشمه‌های آب گرم استان کرمان

مؤلف:

مریم پرهام فر

اساتید راهنما:

دکتر ارسطو بدویی دلفارد

دکتر موج خالقی

استاد مشاور:

دکتر مهدی حسن شاهیان

شهریور ماه ۱۳۹۲

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمیشود.

دانشجو : خانم مریم پرهام فر

اساتید راهنما : آقای دکتر ارسطو بدویی دلفارد

خانم دکتر موج خالقی

استاد مشاور: آقای دکتر مهدی حسن شاهیان

داورا: آقای دکتر عبدالحمید نمکی شوشتری

داور۲: خانم دکتر زهرا کرمی

نماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر مجید نعمتی

معاونت آموزشی و پژوهشی دانشکده : آقای دکتر عباس مرادیان

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که همواره بهترین سرمشق در زندگی‌ام بوده‌اند و حمایت‌های بی‌دریغشان هیچ‌گاه مرا تنها نگذاشته است.

و برادران مهربانم که در تمامی لحظات نا امیدی و خستگی بهترین دوست من بوده‌اند.

و همه آنهایی که دوستشان دارم.

تشکر و قدردانی:

سپاس بی پایان پروردگارم را که بار دگر به من توفیق اندوختن دانـش در محضـر اسـاتید بزرگـوارم را بخشید.

پژوهش حاضر در محضر استاد گرانقدر جناب آقای دکتر ارسطو بدویی و با راهنمـایی‌هـای بـی‌شـائبه ایشان انجام شده است و در همه مراحل به انجام رساندن این پایان نامه راهنمـایی‌هـای بـی‌دریـغ ایشـان چراغ راه من بوده است. از ایشان کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از استاد راهنمای محترم سرکار خانم دکتر موج خالقی سپاسگزارم، نه تنها به خاطر آنچه به نام دانش از ایشان آموختم، بلکه به پاس هر آنچه به نام انسانیت از ایشان فراگرفتم.

از استاد مشاور خود جناب آقای دکتر مهدی حسن شاهیان کـه مـرا از راهنمـایی‌هـای خـود بهـره منـد ساختندکمال تشکر را دارم.

از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر عبدالحمید نمکی شوشتری و سرکار خانم دکتر زهـرا کرمـی کـه قبول زحمت فرموده و داوری این کار را بر عهده گرفتند نیز بسیار سپاسگزارم.

از دوستان عزیز سرکار خانم زینب محسنی و خانم مهندس محبوبه حکیم زاده و مهندس صغری علـی کیا و سایر دوستانی که در تک تک مراحل به پایان رساندن این پایان نامه مرا یاری کردنـد نیـز کمـال قدردانی و تشکر را دارم.

چکیده:

باکتری‌های حل کننده فسفات کاربردهای متنوعی در کشاورزی بعنوان کود زیستی دارند. همچنین با داشتن توانایی تولید آنزیم‌های فسفاتاز (فیتاز) در دامپروری برای تولید مکمل غذایی دام، طیور و آبزیان نیز نقش مهمی دارند. البته فیتاز بعنوان افزودنی غذایی باید فسفات را به طور موثر آزاد کرده و پایدار در برابر غیرفعال شدن در دمای بالا و pH اسیدی باشد. در این مطالعه، برای جداسازی باکتری مولد فیتاز از چشمه آب گرم (دمای ۷۹ ^{o}C) نمونه برداری صورت گرفت و به محیط مایع اختصاصی PSM تلقیح و برای ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ ^{o}C آنکوبه شد. سپس به محیط جامد PSM انتقال داده شد. باکتری‌های ترموفیل دارای هاله (نشان دهنده سنتز فیتاز خارج سلولی) خالص‌سازی و جداسازی شدند. در میان باکتری‌های جداسازی شده، باکتری12D برای مطالعات بعدی انتخاب شد که متعلق به جنس باسیلوس بود. از روش نقطه پایان برای سنجش فعالیت فیتاز و مقدار فسفات رها شده استفاده گردید. بهینه منبع کربن و نیتروژن، جهت افزایش حل کنندگی فسفات به ترتیب شامل گلوکز (۱/۵٪) و عصاره مخمر (۰/۵٪) بود. سپس فیتاز باکتریایی با استفاده از سولفات آمونیوم و دیالیز، بطور جزئی خالص‌سازی شد. نتایج نشان داد که آنزیم در محدوده دمایی ۸۰-۳۰ ^{o}C پایدار بود، اما در ۵۰^{o}C بیشترین فعالیت را داشت. همچنین آنزیم در محدوده pH ۷-۳ فعال بود اما pH بهینه ۴ بود. این نتایج نشان می‌دهد که فیتاز حاصل می‌تواند در زمینه‌های بیوتکنولوژیکی دارای کاربردهای گسترده‌ای باشد.

کلید واژه: فیتاز، باکتری حل کننده فسفات، چشمه آب گرم، فعالیت آنزیمی، پایداری دمایی

فهرست مطالب:

فصل اول: مقدمه

۱-۱. فسفر خاک ۲

۱-۲. باکتری‌های حل کننده فسفات و نقش آنها در افزایش رشد گیاهان ۴

۱-۳. انواع باکتری‌های حل کننده فسفات ۷

۱-۳-۱. حل شدن فسفات معدنی ۷

۱-۳-۲. حل شدن فسفات آلی ۹

۱-۴. مکانیسم حل کنندگی فسفات ۱۱

۱-۴-۱. حل کردن فسفات معدنی ۱۱

۱-۴-۲. معدنی کردن فسفات آلی ۱۲

۱-۵. آنزیم‌های حل کننده فسفات ۱۳

۱-۵-۱. مقدمه ۱۳

۱-۵-۲. فیتات ۱۵

۱-۵-۳. اثرات ضد تغذیه‌ای فیتات ۱۶

۱-۵-۴. فیتاز ۱۸

۱-۵-۵. کلاس‌های فیتازها ۲۰

۱-۶. منابع میکروبی فیتاز ۲۰

۱-۶-۱. فیتاز باکتریایی ۲۲

۱-۷.خواص آنزیمی فیتاز ۲۴

۱-۷-۱. خواص بیوشیمیایی فیتاز ۲۴

۱-۷-۲. خواص بیوفیزیکی فیتاز ۲۶

۱-۷-۳. دما و pH بهینه و پایدار ۲۷

۱-۷-۴. عوامل موثر بر فعالیت آنزیمی ۲۹
۱-۷-۵. القا فیتاز ۳۱
۱-۸. کاربردهای بیوتکنولوژیکی فیتاز ۳۲
۱-۸-۱. فیتاز و صنعت تغذیه حیوانات ۳۲
۱-۸-۲. فیتاز و سلامتی انسان ۳۶
۱-۸-۳. کاربرد در تهیه نان ۳۶
۱-۸-۴. کاربرد در تولید اینوزیتول فسفات ۳۷
۱-۸-۵. صنعت کاغذ سازی و تهیه خمیر کاغذ ۳۷
۱-۹. هدف از پژوهش ۳۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه برداری ۴۰
۲-۲. محیط‌های غربالگری ۴۰
۲-۳. تهیه استوک از باکتری‌های مولد آنزیم فیتاز ۴۱
۲-۴. شناسایی باکتری‌های تولید کننده آنزیم فیتاز ۴۱
۲-۵. اندازه گیری فعالیت آنزیمی ۴۱
۲-۵-۱. روش تغییر یافته مولیبدات- بلو جهت تعیین فعالیت فیتاز ۴۲
۲-۵-۲. مراحل سنجش ۴۲
۲-۶. بررسی میزان حل کنندگی فسفات در باکتری‌های جداسازی شده ۴۴
۲-۶-۱. بررسی میزان حل کنندگی فسفات در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون ۴۴
۲-۶-۲. بررسی میزان تغییرات pH محیط باکتری‌های حل کننده فسفات ۴۴
۲-۷. منحنی رشد ۴۵
۲-۸. تعیین شرایط بهینه حل کنندگی فسفات ۴۵
۲-۸-۱. تاثیر منبع کربن بر حل شدن فسفات ۴۵

۲-۸-۲. تاثیر منبع نیتروژن بر حل شدن فسفات ۴۵
۲-۸-۳. تاثیر منبع فسفات بر حل شدن فسفات ۴۶
۲-۸-۴. تاثیر pH محیط بر حل شدن فسفات ۴۶
۲-۸-۵. بررسی غلظت‌های یونی مختلف بر میزان حل کنندگی فسفات ۴۶
۲-۸-۶. معرفی محیط موثرتر جهت حل کنندگی فسفات توسط باکتری 12D ۴۷
۲-۹. خالص سازی جزئی آنزیم فیتاز ۴۸
۲-۹-۱. تولید آنزیم ۴۸
۲-۹-۲. رسوب گذاری و تغلیظ ۴۸
۲-۹-۳. دیالیز ۴۹
۲-۱۰. بررسی خصوصیات آنزیمی ۴۹
۲-۱۰-۱. بررسی میزان فعالیت دمایی ۴۹
۲-۱۰-۲. بررسی میزان پایداری دمایی ۵۰
۲-۱۰-۳. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در حضور pH های مختلف ۵۰
۲-۱۰-۴. بررسی میزان پایداری آنزیمی در حضور pH های مختلف ۵۱
۲-۱۰-۵. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در حضور یون‌های مختلف ۵۱
۲-۱۰-۶. بررسی میزان پایداری آنزیمی در حضور یون‌های مختلف ۵۲
۲-۱۱. شناسایی مولکولی ۵۲
۲-۱۱-۱. استخراج DNA ۵۲
۲-۱۱-۲. PCR ۵۴
۲-۱۱-۳. ژل آگاروز و تعیین توالی ۵۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱. نمونه برداری و غربالگری ۵۷
۳-۲. رسم منحنی استاندارد فسفات ۵۹

۳-۳. بررسی میزان حل کنندگی فسفات در باکتری‌های جداسازی شده ۶۰
۳-۳-۱. بررسی میزان حل کنندگی فسفات در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون ۶۰
۳-۳-۲. بررسی میزان تغییرات pH محیط باکتری‌های حل کننده فسفات ۶۱
۳-۴. منحنی رشد ۶۲
۳-۵. تعیین شرایط بهینه حل کنندگی فسفات ۶۳
۳-۵-۱. تاثیر منبع کربن بر حل شدن فسفات ۶۳
۳-۵-۲. تاثیر منبع نیتروژن بر حل شدن فسفات ۶۴
۳-۵-۳. تاثیر منبع فسفات بر حل شدن فسفات ۶۵
۳-۵-۴. تاثیر pH محیط بر حل شدن فسفات ۶۶
۳-۵-۵. بررسی غلظت‌های یونی مختلف بر میزان حل کنندگی فسفات ۶۷
۳-۵-۶. معرفی محیط موثرتر جهت حل کنندگی فسفات توسط باکتری 12D ۶۹
۳-۶. بررسی خصوصیات آنزیمی ۷۰
۳-۶-۱. بررسی میزان فعالیت دمایی ۷۰
۳-۶-۲. بررسی میزان پایداری دمایی ۷۱
۳-۶-۳. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در حضور pH های مختلف ۷۲
۳-۶-۴. بررسی میزان پایداری آنزیمی در حضور pH های مختلف ۷۳
۳-۶-۵. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در حضور یون‌های مختلف ۷۴
۳-۶-۶. بررسی میزان پایداری آنزیمی در حضور یون‌های مختلف ۷۵
۳-۷. شناسایی مولکولی ۷۶
۳-۷-۱. استخراج DNA ۷۶
۳-۷-۲. ژل آگاروز و تعیین توالی ۷۶
۳-۷-۳. رسم درخت فیلوژنی ۷۸

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱. تعیین زمان بهینه حل کنندگی فسفات ۸۰
۴-۲. شناسایی بهترین گونه باکتریایی با استفاده از روش‌های مولکولی ۸۱
۴-۳. بهینه‌سازی شرایط کشت جهت افزایش حل کنندگی فسفات ۸۱
۴-۴. خواص آنزیمی فیتاز ۸۳
۴-۴-۱. تاثیر دما بر میزان فعالیت و پایداری آنزیم ۸۳
۴-۴-۲. تاثیر pH بر میزان فعالیت و پایداری آنزیم ۸۳
۴-۴-۳. تاثیر یون‌ها بر میزان فعالیت و پایداری آنزیم ۸۴
۴-۵. نتیجه‌گیری ۸۵
۴-۶. پیشنهادات ۸۵

فصل پنجم: منابع

فهرست شکل ها:

شکل (۱-۱) حرکت و تثبیت فسفات خاک توسط باکتری‌ها ۲

شکل (۱-۲) سیکل فسفات فیتیک اسید در طبیعت و اکوسیستم کشاورزی ۱۴

شکل (۱-۳) ساختار فیتیک اسید ۱۵

شکل (۱-۴) تشکیل کمپلکس فیتات با مواد معدنی ۱۷

شکل (۱-۵) تجزیه فیتات توسط آنزیم فیتاز ۱۸

شکل (۱-۶) مدل سه بعدی ساختاز فیتاز در اشرشیاکلای ۲۵

شکل(۱-۷) انواع کاربردهای بیوتکنولوژیکی فیتاز ۳۳

شکل (۳-۱) موقعیت چشمه (D) ۵۷

شکل(۳-۲) هاله شفاف اطراف کلنی باکتری ۵۸

شکل (۳-۳) منحنی استاندارد جذب غلظت‌های مختلف محلول (KH_2PO_4) در طول موج ۷۰۰nm ۵۹

شکل (۳-۴) میزان حل کنندگی فسفات در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون ۶۰

شکل (۳-۵) تغییر pH محیط توسط باکتری‌های حل کننده فسفات ۶۱

شکل (۳-۶) منحنی رشد باکتری 12D در محیط اختصاصی فیتاز ۶۲

شکل (۳-۷) تاثیر منبع کربن بر حل شدن فسفات در باکتری 12D ۶۳

شکل (۳-۸) تاثیر منبع نیتروژن بر حل شدن فسفات در باکتری 12D ۶۴

شکل(۳-۹) تاثیر منبع فسفات بر حل شدن فسفات در باکتری 12D ۶۵

شکل (۳-۱۰) تاثیر pH محیط بر حل شدن فسفات در باکتری 12D ۶۶

شکل (۳-۱۱) تاثیر دما بر روی فعالیت فیتاز ۷۰

شکل (۳-۱۲) تاثیر دما بر روی پایداری فیتاز ۷۱

شکل (۳-۱۳) تاثیر pH بر روی فعالیت فیتاز ۷۲

شکل (۳-۱۴) تاثیر pH بر روی پایداری فیتاز ۷۳

شکل (۳-۱۵) تاثیر یون‌های مختلف بر روی فعالیت فیتاز ۷۴
شکل (۳-۱۶) تاثیر یون‌های مختلف بر روی پایداری فیتاز ۷۵
شکل (۳-۱۷) محصول PCR ژن 16S rRNA باکتری 12D (B) و مارکر (A) ۷۶
شکل (۳-۱۸) توالی ژن 16S rDNA ۷۷
شکل (۳-۱۹) درخت فیلوژنی براساس تشابه توالی 16S rRNA ۷۸

فهرست جداول:

جدول (۱-۱) توانایی حل کنندگی فسفات معدنی توسط تعدادی از سویه‌های باکتریایی ۹

جدول (۱-۲) معدنی کردن فسفات آلی به وسیله بعضی از گونه‌های باکتریایی ۱۰

جدول(۱-۳) شرکت‌های تولید کننده فیتاز ۱۹

جدول (۱-۴) فیتاز از منابع مختلف ۲۱

جدول (۱-۵) pH و دمای بهینه فیتازهای مختلف ۲۹

جدول(۲-۱) تشریح روش تغییر یافته مولیبدات - بلو ۴۳

جدول (۳-۱) تاثیر غلظت‌های مختلف یون‌های KCl و NaCl بر حل کنندگی فسفات ۶۸

جدول (۳-۲) تاثیر غلظت‌های مختلف یون‌های $MgSO_4$ و $FeSO_4$ بر حل کنندگی فسفات ۶۸

جدول (۳-۳) تعیین میزان فسفات آزاد شده در محیط PSM و PKV با استفاده از روش مولیبدات- بلو ۶۹

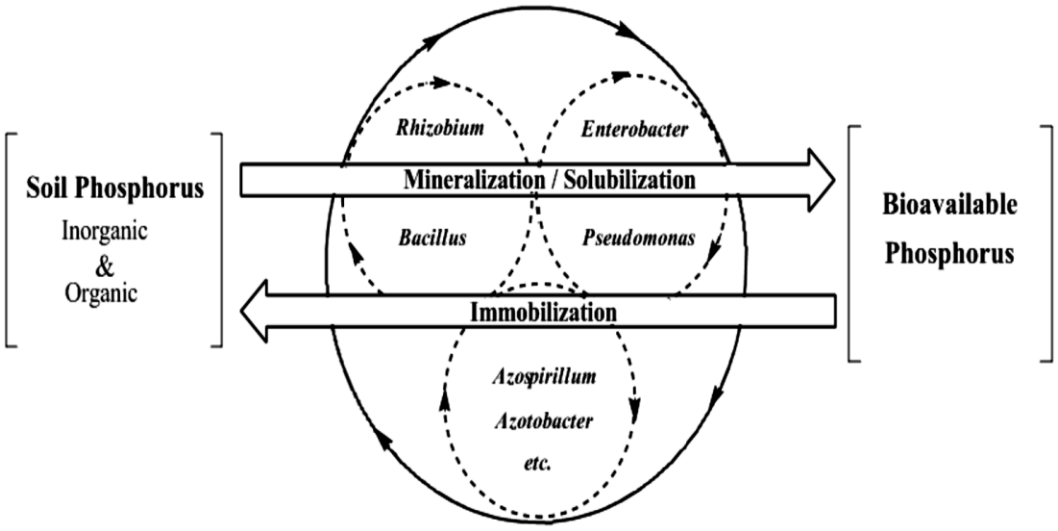
فصل اول

مقدمه

۱-۱. فسفر خاک:

فسفر یکی از مهمترین عناصر غذایی ضروری برای رشد زیستی و توسعه گیاهان می‌باشد که به مقدار ۴۰۰-۱۲۰۰mg/kg در خاک وجود دارد (۱). چرخه فسفر در بیوسفر می‌تواند به صورت باز یا رسوبی صورت بگیرد، زیرا تبادلی با اتمسفر ندارد. فسفر یک ماده غذایی مهم و محدود کننده رشد بوده و بر خلاف نیتروژن منبع اتمسفری بزرگی ندارد (۲). توسعه ساقه، استحکام ریشه و ساقه، رسیدن محصولات، تثبیت نیتروژن در لوگوم، کیفیت محصولات و مقاومت به بیماری‌های گیاهی مرتبط با تغذیه فسفر هستند (۳).

میکروارگانیسم‌ها نقش مرکزی در چرخه فسفر طبیعی دارند. این چرخه به وسیله اکسیداسیون و احیا ترکیبات فسفر صورت می‌گیرد و واکنش انتقال الکترون بین مرحله اکسیداسیون از فسفین[1] (۳-) به فسفات (۵+) انجام می‌شود. ژنتیک و مکانیسم بیوشیمیایی این تغییر شکل هنوز به طورکامل شناخته نشده است (۴). طرح متداول حل کنندگی فسفات خاک در شکل (۱-۱) نشان داده شده است. محدوده وسیعی از مکانیسم‌های حل کنندگی فسفات میکروبی در طبیعت وجود دارد. بیشتر چرخه-های سراسری برای حل کنندگی فسفات آلی و معدنی خاک شامل مشارکت باکتری و قارچ می‌باشد (۵).



شکل (۱-۱) حرکت و تثبیت فسفات خاک توسط باکتری‌ها

[1] phosphine

غلظت فسفر محلول در خاک معمولا بسیار پایین بوده و اغلب حدود ۱ppm یا کمتر ($۱۰M\ H_2PO_4^-$) می‌باشد (۶). سلول ممکن است به چند شکل فسفر را جذب کند اما مناسب‌ترین شکل جذب آن به صورت $H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-} می‌باشد. بیشترین ذخیره فسفر در سنگ‌ها و رسوباتی مانند آپاتیت اولیه و مواد معدنی اولیه‌ی تشکیل شده در طی مرحله زمین‌شناسی[1] وجود دارد (۱). مثلا تخمین زده شده که تقریبا ۴۰ میلیون تن سنگ فسفاته در هند وجود دارد و این ترکیبات یک منبع ارزان از کود فسفردار برای تولید کشاورزی فراهم می‌کند (۶).

شکل معدنی فسفر در خاک با مواد معدنی اولیه مانند هیدروکسی آپاتیت، آپاتیت و اکسی آپاتیت در بخشی از سنگ‌های طبقه‌ای وجود دارد و از خواص مهم آنها، غیر قابل حل بودن می‌باشد. با این وجود فسفات معدنی بزرگترین منبع عنصر فسفر در خاک است، زیرا در شرایط مناسب می‌تواند حل شده و برای گیاهان و میکروارگانیسم‌ها قابل استفاده باشد. فسفات معدنی همچنین می‌تواند به صورت متصل به سطح اکسید هیدراته آهن و آلومینیوم و منگنز وجود داشته باشد که در این شکل به‌طور ناچیزی قابل حل و جذب می‌باشد (۱).

بیشتر خاک‌های کشاورزی دارای ذخایر بزرگ فسفر هستند که به عنوان کاربرد تنظیمی کودهای فسفردار می‌باشد. البته بخش بزرگی از فسفات معدنی محلول برای خاک به شکل کود شیمیایی به‌کار-گرفته شده است و به‌طور سریع تثبیت شده و برای گیاهان غیر قابل دسترس می‌شود (۷). فرایند تثبیت و رسوب فسفر در خاک معمولا بسیار وابسته به pH و نوع خاک می‌باشد. بنابراین در خاک‌های اسیدی، فسفر به وسیله اکسیدهای آزاد و هیدروکسید آلومینیوم و هیدروکسید آهن تثبیت می‌شود. در حالی که در خاک‌های قلیایی به وسیله کلسیم تثبیت شده که باعث کاهش اثر کود فسفردار محلول با کلسیم بالا می‌شود (۶).

گیاهان، فسفر را از مواد محلول در خاک به شکل یون‌های فسفات به‌دست می‌آورند. البته آنیون فسفات به طور وسیعی واکنش دهنده بوده و ممکن است از طریق رسوب با کاتیون‌هایی مانند Ca^{2+}، Mg^{2+}و Fe^{2+} تثبیت شود که این حالت بستگی به خصوصیات خاک دارد و در این حالت فسفر قابل دسترس گیاه معمولا به میزان کمی می‌باشد. بخش دوم مهم فسفر خاک به شکل ماده آلی است. در بیشتر خاک‌ها احتمالا ۵۰-۳۰٪ فسفر نهایی به شکل فسفر آلی می‌باشد. اگرچه ممکن است این مقدار کمتر، در حدود ۵٪ و یا بالاتر، در حدود ۹۵٪ میزان فسفر نهایی باشد (۷).

[1] geological

فسفر آلی در خاک به طور وسیعی در شکل اینوزیتول فسفات می‌باشد (فیتات در خاک) که به وسیله میکروارگانیسم‌ها و گیاهان سنتز می‌شود و پایدارترین شکل فسفر در خاک بوده و بالاتر از ۵۰٪ فسفات آلی در خاک را تشکیل می‌دهد (۱). ترکیبات فسفات آلی دیگر در خاک به صورت فسفو-مونواستر، فسفودی‌استر (شامل فسفو لیپیدها و نوکلئیک اسیدها) و فسفوتری‌استرها هستند. در میان ترکیبات قابل شناسایی در بقایای حاصل از تجزیه سلولی در عصاره خاک، سیتوزین، آدنین، گوانین، اوراسیل، هیپوگزانتین و گزانتین وجود دارد. در حدود فقط ۱٪ فسفر آلی نهایی در خاک می‌تواند به عنوان نوکلئیک اسیدها یا مشتقات دیگر آنها باشد. در میان فسفولیپیدها، کولین[1] به عنوان محصول هیدرولیز لکتین شناخته شده است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تقریبا ppm ۵-۱ فسفر از فسفولیپیدهای خاک است. اگرچه مقدار بالاتر از ppm ۳۴ هم به دست آمده است (۷).

بیشتر ترکیبات فسفردار، وزن مولکولی بالایی دارند که بیشتر در مرحله اول به فسفات یونی محلول (Pi، $H_2PO^-_4$ و HPO_4^{2-}) یا فسفات آلی با وزن مولکولی پایین تبدیل می‌شوند تا به وسیله سلول جذب شوند (۶). همچنین مقدار زیادی فسفونات‌های گزنوبیوتیک وجود دارد که به عنوان ضد آفات، دترجنت و آنتی بیوتیک‌ها در محیط آزاد شده‌اند. این ترکیبات C-P، مقاومت بسیاری به هیدرولیز شیمیایی و تجزیه زیستی دارند اما چندین مورد از تجزیه آنها توسط میکروب‌ها و آزاد شدن فسفات این ترکیبات گزارش شده است (۴ و ۸).

۱-۲. باکتری‌های حل کننده فسفات و نقش آنها در افزایش رشد گیاهان:

تعداد مهمی گونه‌های باکتریایی، اغلب وابسته به ریزوسفر می‌توانند اثر مفیدی بر روی رشد گیاهان داشته باشند. بنابراین استفاده از آنها به عنوان کود زیستی یا عامل کنترل برای بهبود کشاورزی به طور گسترده برای سال‌ها بررسی شده است. این گروه باکتری را PGPR[2] یا ریزوباکتریای افزایش دهنده رشد گیاه می‌نامند. در میان آنها سویه‌هایی از جنس *پسودوموناس*[3]، *آزوسپریلیوم*[4]، *بورخولدریا*[5]، *باسیلوس*[6]، *انتروباکتر*[7]، *ریزوبیوم*[8]، *اروینیا*[9]، *سراشیا*[10]، *فلاوباکتریوم*[11]، *آلکالیژنز*[12]، *آرتروباکتر*[13] و *اسنیتوباکتر*[14] قرار گرفته‌اند. تحریک تولید محصولات مختلف توسط PGPR در هر دو حالت

[1] Choline
[2] plant growth promoting rhizobacteria
[3] *Pseudomonas*
[4] *Azospirillum*
[5] *Burkholderia*
[6] *Bacillus*
[7] *Enterobacter*
[8] *Rhizobium*
[9] *Erwinia*
[10] *Serratia*
[11] *Flavobacterium*
[12] *Alcaligenes*
[13] *Arthrobacter*
[14] *Acinetobacter*

آزمایشگاهی و تحقیقات میدانی نشان داده شده است. سویه‌های *پسودوموناس پوتیدا*[1] و *پسودوموناس فلورسنس*[2] باعث افزایش طول ریشه و برگ‌ها در کاهو و گوجه می‌شوند (۹).

همچنین PGPR تولید محصول در سیب زمینی، برنج، چغندر قند، گوجه، کاهو، لوبیا، سیب، گندم، مرکبات و گیاهان تزئینی را افزایش می‌دهد. محصول گندم با تلقیح *ازتوباکتر*، بیشتر از ۳۰٪ و با تلقیح *باسیلوس* بیشتر از ۴۰٪ افزایش می‌یابد. در آزمایش‌های میدانی ۲۰-۱۰٪ افزایش محصول با استفاده از ترکیب *باسیلوس مگاتریوم*[3] و *ازتوباکتر کروکوکوم*[4]، گزارش شده است. گونه‌های *ازتوباکتر* در ذرت، سورگوم و گندم و گونه‌های *باسیلوس* در سیب زمینی، گندم، بادام زمینی و سورگوم، میزان محصول را افزایش می‌دهند (۱۰).

باکتری‌های به‌کار رفته باعث افزایش محصولات گیاهی در چند کشور شده‌اند و تولید تجاری متداول آنها موجود است. به عنوان مثال در کوبا چند کود زیستی به طور تجاری تولید شده و برای محصولات مختلف به‌کار گرفته شده است. بیشتر سویه‌های به‌کار رفته شامل *آزوسپریلیوم*، *ازتوباکتر*، *ریزوبیوم* و *بورخولدریا* بودند. مکانیسمی که PGPR می‌تواند با آن یک تاثیر مثبت بر روی رشد گیاهان داشته باشد به دو صورت، مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد. افزایش رشد غیرمستقیم از طریق کاهش یا جلوگیری از اثر زیان‌آور میکروارگانیسم‌های پاتوژن است که بیشتر با سنتز آنتی‌بیوتیک و یا سیدروفورها توسط باکتری‌ها صورت می‌گیرد. افزایش رشد مستقیم می‌تواند از طریق سنتز هورمون-های گیاهی، تثبیت نیتروژن، کاهش پتانسیل غشایی ریشه‌ها و تولید بعضی از آنزیم‌ها (مانند ACC دآمیناز[5] که بر روی سطح هورمون‌های گیاهی تاثیر دارد) و با حل کنندگی فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی (که فسفر را برای گیاه فراهم می‌کند) انجام شود. رخداد این مکانیسم آخر در چند PGPR صورت گرفته و می‌تواند تاثیر کلی بر روی افزایش رشد گیاه داشته باشد که مورد بحث قرار می‌گیرد (۱۱).

اگرچه چندین باکتری حل کننده فسفات در خاک وجود دارد معمولا تعداد آنها به اندازه کافی بالا نیست تا با باکتری‌های متداول دیگر موجود در ریزوسفر رقابت کنند. بنابراین مقدار فسفر آزاد شده به وسیله آنها برای افزایش اساسی رشد گیاه کافی نیست. بنابراین تلقیح گیاه به وسیله میکروارگانیسم‌های

[1] *Pseudomonas putida*
[2] *Pseudomonas fluorescens*
[3] *Bacillus megaterium*
[4] *Azotobacter chroococcum*
[5] 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

هدف در غلظت بالاتر از معمول در خاک ضروری است تا خاصیت حل کنندگی فسفات برای افزایش محصولات گیاهی صورت گیرد. یک مسیر متناوب، استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات به عنوان تلقیح میکروبی با استفاده از کشت مخلوط یا تلقیح همراه با دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۱۲). چندین مطالعه نشان دادند که تاثیر مفیدی تلقیح باکتری‌های حل کننده فسفات و *آزوسپریلیوم* با هم دارند. همچنین بر روی نیتروژن و تجمع فسفات در محصولات مختلف موثر هستند (۱۳). تلقیح همراه *باسیلوس پلی میکسا*[1] و گونه‌ای از *پسودوموناس* با توانایی حل کنندگی فسفات با یک سویه *آزوسپریلیوم برازیلینس*[2]، افزایش معنی داری در محصول داشت (۱۴).

از طرفی تصور می‌شود که بعضی از باکتری‌های حل کننده فسفات به عنوان باکتری‌های کمک کننده مایکوریز فعالیت می‌کنند. به طور کلی اثر بالاتری باکتری‌های حل کننده فسفات به وسیله تلقیح همراه با دیگر باکتری‌های مفید و مایکوریزها دارند. علاوه بر این باکتری‌های حل کننده فسفات همراه با تولید اسید اندول استیک و سیدروفور نیز شناسایی شده‌اند.

توسط آسلانتاس و همکارانش[3] مشخص شد که همه سویه‌های تلقیح شده باکتری‌های حل کننده فسفات در افزایش تولید محصول سیب نقش دارند (۱۵). همچنین به طور واضحی، ارتفاع گیاهان، وزن خشک شاخه و ریشه، جذب فسفر و نیتروژن در جوانه‌های گردو بهبود می‌یابد که نشان دهنده اهمیت باکتری‌های حل کننده فسفات در گیاهان چوبی است. نتایج یکی از تحقیقات نشان می‌دهد که سویه‌های *پسودوموناس کلروافیس*[4] و *پسودوموناس فلورسنس* برای تلقیح به گردو و حتی بیشتر گیاهان چوبی قابل توجه هستند (۱۶).

اگرچه مدارک مهمی از نقش اختصاصی حل کنندگی فسفات در افزایش رشد گیاهان به وسیله باکتری‌های حل کننده فسفات حمایت می‌کند، اما همه‌ی آزمایشات نتایج مناسبی نشان ندادند، به عنوان نمونه تلقیح *باسیلوس مگاتریوم* واریته *فسفوریکم*[5] به طور موفق در روسیه و هند استفاده شد اما تاثیر مشابهی در خاک‌های امریکا نشان نداد. مسلما تاثیر تلقیح‌های مختلف به نوع خاک، موجودات ذره بینی خاک‌های زراعی و دیگر پارامترها بستگی دارد. میزان فسفات خاک احتمالا یکی از فاکتور-های مهم در تعیین تاثیر این محصولات است (۱۴).

[1] *Bacillus polymyxa*
[2] *Azospirillum brasilense*
[3] Aslantas et al.
[4] *P. chlororaphis*
[5] *Bacillus megaterium* var. *phosphoricum*