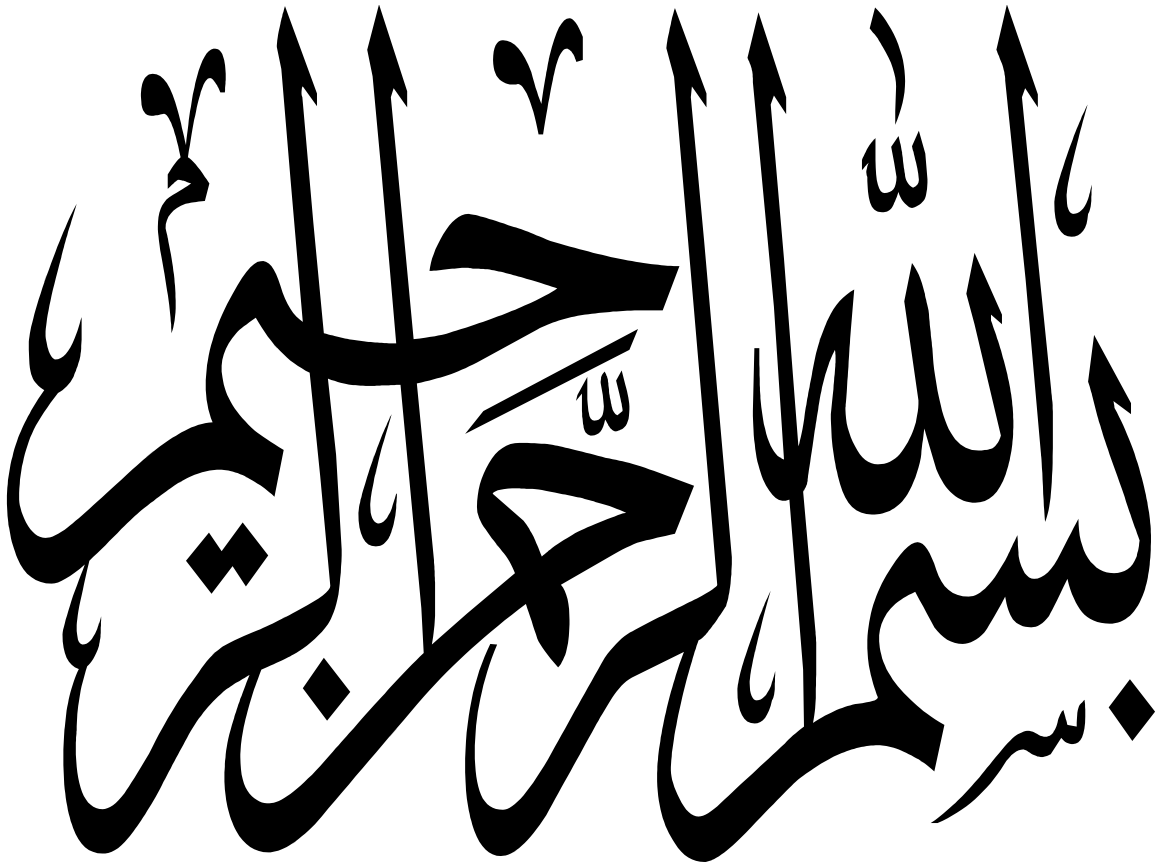
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه علوم خاک

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی کشاورزی گرایش علوم خاک

ارزیابی انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم توسط باکتری‌های حل کننده فسفر جداسازی شده از خاک‌های جنگلی اطراف سنگ معدن فسفات کوه سپید لار یاسوج

استاد راهنما:
دکتر ابراهیم ادهمی

استاد مشاور:
دکتر حمیدرضا اولیایی
دکتر رضا نقی‌ها

پژوهشگر:
کبرا شیخی

دی ماه ۱۳۹۳

پایان نامه‌ی حاضر، حاصل پژوهش‌های نگارنده در دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی کشاورزی گرایش علوم خاک است که در سال ۱۳۹۳ در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه یاسوج به راهنمایی جناب آقای دکتر ابراهیم ادهمی و مشاوره‌ی جناب آقای دکتر رضا نقی‌ها و دکتر حمیدرضا اولیایی از آن دفاع شده است و کلیه‌ی حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه یاسوج است.

دانشگاه یاسوج

ارزیابی انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم توسط باکتری‌های حل کننده فسفر جداسازی شده از خاک‌های جنگلی اطراف سنگ معدن فسفات کوه سپید لار یاسوج

به وسیله:

کبرا شیخی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیتهای تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته:

علوم خاک

در تاریخ ۱۳۹۳/۱۰/۲۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما : دکتر ابراهیم ادهمی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد مشاور : دکتر حمیدرضا اولیایی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۳- استاد مشاور : دکتر رضا نقی ها با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور داخل گروه : دکتر امین صالحی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر مسعود دهداری با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

دی ماه ۱۳۹۳

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

تقدیم به همسر عزیزم سید عباس

امید بودنم، که سایه مهربانی‌اش سایه سار زندگیم می‌باشد.

تقدیم به:

روح پاک پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم. و به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج و وجودش برایم همه مهر بود.

تقدیم به برادرم علی:

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودش مایه دلگرمی من می باشد.

تقدیم به خواهرانم:

که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

سپاس‌گزاری

سپاس ایزدمنان را که در سایه‌ی لطف و عنایت او توانستم این تحقیق را به پایان برسانم و سپاس از **همسر** عزیزم، که حضور پرمهر و عاطفه‌ی سرشارش امیدبخش زندگی‌ام هست. از استاد راهنمای گرانقدر جناب آقای **دکتر ابراهیم ادهمی** تقدیر و تشکر می‌نمایم. بسیار خرسندم که افتخار شاگردی در محضر این استاد بزرگوار را داشتم که به حق یکی از نعمت‌های خداوندی بود و در سایه رهنمودهای علمی و اخلاقی بی‌دریغ ایشان توانستم گامی در راه ارتقاء دانش خویش و خدمت به انسانیت بردارم. برخود واجب می‌دانم از راهنمایی‌های ارزنده استادم جناب آقای **دکتر رضا نقی‌ها** قدردانی نمایم. با سپاس فراوان از راهنمایی‌های مفید و بی‌دریغ استاد ارجمندم جناب آقای **دکتر حمیدرضا اولیایی** که مشاوره این پایان‌نامه را برعهده داشته‌اند. از جناب آقای امین صالحی که مسئولیت داوری این پایان‌نامه را به عهده گرفتند، قدردانی و سپاسگزاری می‌کنم. از سرکار خانم مهندس رویا مولوی (کارشناس آزمایشگاه خاکشناسی) خانم مهندس حاجی زاده و خانم مهندس کرمی که در تمام مراحل انجام پایان نامه مرا یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

نام: کبرا **نام خانوادگی: شیخی**
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته و گرایش: علوم خاک- شیمی و حاصلخیزی خاک**
استاد راهنما: دکتر ابراهیم ادهمی **تاریخ دفاع: ۹۳/۱۰/۲۴**

ارزیابی انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم توسط باکتری‌های حل کننده فسفر جداسازی شده از خاک‌های جنگلی اطراف سنگ معدن فسفات کوه سپید لار یاسوج

چکیده

این مطالعه به منظور جداسازی باکتری های حل کننده فسفر از خاک های جنگلی اطراف سنگ معدن سپیدلار یاسوج و ارزیابی انحلال خاک فسفات به صورت کمی در محیط کشت مایع و بسترکاه گندم انجام شد.برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت پیکوواسکای استفاده گردید.آزمون کمی در محیط مایع با ۶ باکتری انتخاب شده از مرحله آزمون کیفی با سه تکرار انجام شد.آزمون کمی انحلال فسفات در بستر کاه گندم به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ سطح فسفر (صفر، ۱:۸ و ۱:۴ خاک فسفات: کاه گندم)، ۳ سطح ملاس (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی کاه گندم) و ۳ سطح تلقیح (صفر، جدایه ۱ و جدایه ۲) در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش دوم شامل خاک فسفات در سه سطح (صفر، ۱:۸ و ۱:۴ خاک فسفات: کاه گندم)، گوگرد (در دو سطح صفر و ۵ درصد وزنی نسبت به کاه گندم) و تلقیح در سه سطح (بدون تلقیح، تلقیح با جدایه ۱ و جدایه ۲) در سه تکرار انجام شد.در زمان های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز فسفر محلول با کلرید کلسیم یک صدم مولار و pH اندازه گیری شدند. در روزهای ۲۰ و ۴۰ شکل های معدنی فسفر توسط عصاره گیری متوالی با محلول های کلرید کلسیم ۰/۰۱ مولار، بی کربنات سدیم نیم مولار، سیترات سدیم سه دهم مولار، استات آمونیوم نیم مولار و اسید سولفوریک ۰/۵ مولار اندازه گیری شد. فسفر آلی نیز در روزهای ۲۰ و ۴۰ در عصاره حاصل از مرحله کلرید کلسیم ۰/۰۱ مولار اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد تمام خاک های مورد مطالعه دارای باکتری های حل کننده فسفر بودند.در محیط کشت مایع جدایه ۱ و جدایه ۲ بیشتر از سایر گونه ها در افزایش انحلال فسفات مؤثر بودند. تغییرات pH برای جدایه های یک تا پنج در محدوده ۶-۵ بود و تغییرات چندانی در مدت گرم خانه گذاری در آن ها مشاهده نگردید.نتایج آزمون کمی در بستر کاه گندم نشان داد، فسفر محلول و آلی در حضور جدایه ۱ و جدایه ۲ در طی چهل روز از سطح بدون تلقیح باکتری بیشتر بود. فسفر محلول در بی کربنات در طی زمان در حضور جدایه ها افزایش یافت. لیکن فسفر محلول در سیترات سدیم و استات آمونیوم در طی زمان کاهش یافت.بیشترین شکل فسفر متعلق به شکل عصاره گیری شده با اسید سولفوریک بود که تنها در تیمارهای دارای خاک فسفات مشاهده شد.در مجموع به نظر می‌رسد تأثیر ملاس بر این باکتری‌ها بیشتر از گوگرد بوده است و افزودن

ملاس می‌تواند به انحلال فسفر نامحلول توسط باکتری های حل کننده فسفر کمک نماید.
واژگان کلیدی: انحلال، باکتری های حل کننده فسفر، خاک فسفات، ملاس، گوگرد

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- اهمیت تحقیق..... ۱

۱-۲- اهداف پژوهش..... ۳

۱-۳- فرضیه‌های پژوهش ۳

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های انجام شده

۲-۱- فسفر..... ۴

۲-۱-۱- اهمیت و مقدار فسفر..... ۴

۲-۱-۲- ریز جانداران حل کننده فسفات..... ۷

۲-۱-۲-۱- انواع..... ۷

۲-۱-۲-۲- باکتری‌های حل کننده فسفر..... ۸

۲-۳- جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفر ۱۰

۲-۴- انحلال فسفر توسط باکتری‌های حل کننده فسفر در محیط کشت مایع..... ۱۱

۲-۵- انحلال فسفر توسط باکتری‌های حل کننده فسفر در بستر مواد آلی..... ۱۲

۲-۶- فراهمی فسفر خاک فسفات در اثر باکتری‌ها ۱۳

۲-۷- کودهای زیستی..... ۱۴

۲-۸- ملاس ۱۶

۲-۹- گوگرد ۱۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- جمع آوری نمونه خاک ۲۰

۳-۲- جداسازی باکتری از خاک ۲۱

۳-۲- ۱- سترون کردن و ساخت محیط کشت پیکوواسکای ۲۱

۳-۲-۲- نمونه گیری و تهیه سوسپانسیون باکتری در خاک ۲۱

۳-۲- ۳- تهیه رقت سریالی و کشت در محیط کشت پیکوواسکای ۲۲

۳-۲- ۴- مراحل جداسازی و تکثیر ۲۲

۳-۳- تشخیص اولیه باکتری‌ها ۲۲

۳-۴- ارزیابی انحلال تری کلسیم فسفات در محیط کشت مایع ۲۳

۳-۵- روش شمارش باکتری ۲۴
۳-۶- ارزیابی انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم ۲۴
۳-۶-۱- فسفر محلول عصاره‌گیری شده توسط کلرید کلسیم ($CaCl_2$-P)..... ۲۵
۳-۶-۲- فسفر آلی عصاره‌گیری شده توسط کلرید کلسیم ($CaCl_2$-P)..... ۲۵
۳-۶-۳- فسفر عصاره‌گیری شده توسط بیکربنات سدیم (NaOH-P)..... ۲۵
۳-۶-۴- فسفر عصاره‌گیری شده توسط سیترات سدیم (Cit-P)..... ۲۶
۳-۶-۵- فسفر عصاره‌گیری شده توسط استات آمونیوم (NH4OAC-P)..... ۲۶
۳-۶-۶- فسفر عصاره‌گیری شده توسط اسید سولفوریک (H_2SO_4-Pi)..... ۲۶
۳-۷-تجزیه و تحلیل آماری ۲۶

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- جداسازی باکتری از خاک ۲۷
۴-۲- آزمون کیفی انحلال فسفات معدنی ۳۰
۴-۳- اثر ملاس بر انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم ۳۲
۴-۳-۱- نتایج فسفر عصاره‌گیری شده با کلرید کلسیم ($CaCl_2$-P)..... ۳۲
۴-۳-۲- فسفر آلی ($CaCl_2$-P)..... ۳۴
۴-۳-۳- فسفر معدنی (NaOH-P)..... ۳۷
۴-۳-۴- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با سیترات سدیم (Cit-P)..... ۳۹
۴-۳-۵- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با استات آمونیوم (NH_4OAC-P)..... ۴۱
۴-۳-۶- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با اسید سولفوریک (H_2SO_4-Pi)..... ۴۲
۴-۳-۷- اندازه گیری pH در بستر کاه گندم عصاره گیری شده با کلرید کلسیم..... ۴۳
۴-۴- اثر گوگرد بر انحلال خاک فسفات در بستر کاه گندم ۴۶
۴-۴- ۱ نتایج فسفر عصاره‌گیری شده با کلرید کلسیم ($CaCl_2$-P)..... ۴۶
۴-۴-۲- فسفر آلی (CaCl2-P)..... ۴۸
۴-۴-۳- فسفر معدنی (NaOH-P)..... ۵۰
۴-۴-۳- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با سیترات سدیم (Cit-P)..... ۵۳
۴-۴- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با استات آمونیوم (NH_4OAC)..... ۵۴
۴-۴- ۱- نتایج فسفر قابل عصاره‌گیری با اسید سولفوریک (H_2SO_4-Pi)..... ۵۵
۴-۴-۲- اندازه گیری pH در بستر کاه گندم عصاره گیری شده با کلرید کلسیم..... ۵۶
۴-۵- نتیجه‌گیری ۵۸
۴-۵- ۱- خلاصه نتایج آزمون کیفی در جداسازی باکتری حل کننده فسفر ۵۸
۴-۵- ۲- خلاصه نتایج آزمون کمی در محیط کشت مایع ۵۸
۴-۵- ۳- خلاصه نتایج آزمون کمی بر بستر آلی طبیعی ۵۸

۴-۶- پیشنهادات ۵۹

فصل پنجم: منابع

۵-۱ منابع..... ۶۰

فصل ششم: ضمایم و پیوست

۶- ۱- شکل‌های رنگ آمیزی باکتری در زیر میکروسکوپ..... ۷۳
۶- ۲- آماده سازی محیط کشت ۷۴
۶- ۳- تلقیح باکتری‌ها به محیط کشت ۷۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- جمع آوری نمونه خاک ۲۰

جدول ۳-۲- ترکیبات محیط کشت جامد پایه در یک لیتر آب مقطر ۲۱

جدول ۳-۳- ترکیبات محیط کشت مایع پایه در یک لیتر آب مقطر ۲۳

جدول ۴-۱- مشخصات فیزیکو شیمیایی خاک ۲۸

جدول ۴-۲- خصوصیات زیر میکروسکوپ باکتری‌های جداسازی شده از خاک ۲۹

جدول ۴-۳- میانگین حل شدن فسفر و pH توسط باکتری‌های حل کننده فسفر در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ ..... ۳۱

جدول ۴-۴- مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان‌های مختلف ۳۴

جدول ۴-۵- مقایسه میانگین فسفر آلی محلول در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان-های مختلف ۳۶

جدول ۴-۶- مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول در بیکربنات سدیم در تیمارها و زمان‌های مختلف ۳۹

جدول ۴-۷- مقایسه میانگین فسفر سیترات سدیم در تیمارها و زمان‌های مختلف ۴۰

جدول ۴-۸- مقایسه میانگین فسفر استات آمونیوم در تیمارها و زمان‌های مختلف ۴۲

جدول ۴-۹- مقایسه میانگین فسفر اسید سولفوریک در تیمارها و زمان‌های مختلف ۴۳

جدول ۴-۱۰- مقایسه میانگین pH در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان‌های مختلف ۴۵

جدول ۴-۱۱- مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان‌های مختلف ۴۸

جدول ۴-۱۲- مقایسه میانگین فسفر آلی محلول در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان-های مختلف ۵۰

جدول ۴-۱۳- مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول در بیکربنات سدیم در تیمارها و زمان‌های مختلف. ۵۲

جدول ۴-۱۴- مقایسه میانگین فسفر سیترات سدیم در تیمارها و زمان‌های مختلف.....۵۴
جدول ۴-۱۵- مقایسه میانگین فسفر استات آمونیوم در تیمارها و زمان‌های مختلف ۵۵
جدول ۴-۱۶- مقایسه میانگین فسفر اسید سولفوریک در تیمارها و زمان‌های مختلف ۵۶
جدول ۴-۱۷- مقایسه میانگین pH در کلرید کلسیم یک صدم مولار در تیمارها و زمان‌های مختلف.۵۷
جدول ۶-۱- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با کلرید کلسیم در زمان‌های مختلف ۷۵
جدول ۶-۲- تجزیه واریانس فسفر آلی و معدنی عصاره گیری شده با کلرید کلسیم و بیکربنات سدیم در زمان‌های مختلف.....۷۶
جدول۶-۳- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با سیترات سدیم و استات آمونیوم در زمان‌های مختلف.....۷۷
جدول ۶-۴- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با اسید سولفوریک در زمان‌های مختلف. ۷۸
جدول ۶-۵- تجزیه واریانس تغییرات pH در زمان‌های مختلف ۷۹
جدول ۶-۶- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با کلرید کلسیم در زمان‌های مختلف.....۸۰
جدول ۶-۷- تجزیه واریانس فسفر آلی و معدنی عصاره گیری شده با کلرید کلسیم و بیکربنات سدیم در زمان‌های مختلف. ۸۱
جدول ۶-۸- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با سیترات سدیم و استات آمونیوم در زمان‌های مختلف ۸۲
جدول ۶-۹- تجزیه واریانس فسفر عصاره گیری شده با اسید سولفوریک در زمان‌های مختلف..... ۸۳
جدول ۶-۱۰- تجزیه واریانس تغییرات pH در زمان‌های مختلف ۸۴

فصل اول
مقدمه و هدف

۱-۱- اهمیت تحقیق

فسفر یکی از عناصر ضروری است که نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و سیستم انتقال انرژی در گیاهان دارد. یکی از عناصر اصلی مورد نیاز گیاه هست که در تولید محصول نقش مهمی دارد و در کلیه‌ی فرآیندهای بیوشیمیایی، ترکیبات انرژی‌زا و مکانیسم‌های انتقال انرژی دخالت دارد (ملکوتی و همکاران،۱۳۸۳).

در حال حاضر به منظور تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان در خاک از انواع مختلف کودهای شیمیایی فسفاتی استفاده می‌گردد، مصرف بی‌رویه کودهای فسفات، گذشته از هزینه‌های ارزی گزاف و خرید کود از خارج کشور، اثرات زیانباری نیز دارد. از جمله این اثرات می‌توان به مسمومیت فسفری ناشی از جذب بیش از حد فسفر معدنی و بالا رفتن غلظت آن در بافت‌های گیاهی و بهم خوردن تعادل عناصر غذایی، کاهش عملکرد محصول، تجمع بور در گیاه در حد سمی، کاهش جذب مس، غیر متحرک شدن آهن در خاک، ممانعت از جذب آهن توسط ریشه، مختل کردن سوخت و ساز روی درون گیاه، کاهش میکوریزایی شدن ریشه، آلودگی خاک به کادمیوم، کاهش کیفیت محصول (کاهش پروتئین گندم) ازدیاد بار منفی خاک، و آلودگی آب‌ها به فسفر و بروز پدیده به‌پروری را نام برد (کریمیان، ۱۳۷۷). امروزه تمایل به استفاده از دیگر منابع تأمین‌کننده فسفر مورد نیاز گیاهان به دلیل کارایی کم کودهای شیمیایی، افزایش قیمت جهانی آن‌ها و وارداتی بودن بخش عمده این ترکیبات و همچنین آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف این کودها در حال گسترش است (کیفونتس و لیندمن[1]، ۱۹۹۳). سازمان فائو برای کشورهای در حال توسعه استفاده از منابع طبیعی فسفر (معدنی) مانند خاک فسفات و کودهای سبز و حیوانی را توصیه می‌کند (فائو، ۱۹۹۵). با این وجود کاربرد خاک فسفات به دلیل پایین بودن فسفر قابل‌جذب، به تنهایی نمی‌تواند نیازهای بخش کشاورزی امروز را

[1] Cifuentes and Lindemann

تأمین کند و برای افزایش کارایی و انحلال خاک فسفات نیاز به توجه منابع جدید و روش‌های مختلف است. معمولاً این روش‌ها شامل روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی می‌باشد. روش‌های زیستی در افزایش فراهمی فسفر از خاک فسفات در شرایط عملی است که سنگ فسفات با عیار بالا و متوسط در دسترس باشد. همچنین در خاک‌هایی با مواد آلی کم، برای افزایش سهم مواد آلی و تأمین عناصرغذایی، اختلاط خاک فسفات با کمپوست امری ضروری به نظر می‌رسد (چین[1]، ۱۹۷۸). در کشاورزی ارگانیک که از کودهای شیمیایی استفاده نمی‌شود، اختلاط سنگ فسفات با کمپوست و تلقیح آن با ریزجانداران حل کننده فسفر امکان‌پذیر است. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که استفاده مستقیم از خاک فسفات به عنوان منبع تأمین فسفر برای گیاهان چندان مناسب نبوده و کارایی لازم را ندارد لذا تلقیح خاک فسفات با باکتری‌های حل کننده فسفر و دیگر ریزجانداران حل کننده فسفات و یا استفاده از گوگرد و ماده آلی می‌تواند سبب افزایش فراهمی فسفر از خاک فسفات شود.

به دلیل پایین بودن فسفر قابل‌جذب در خاک فسفات، همچنین به دلایل متعددی از جمله آهکی بودن اکثر خاک‌ها، وجود pH بالا، تنش خشکی، وجود بیکربنات فراوان در آب‌های آبیاری، کمبود مواد آلی در خاک‌های زراعی کشور، استفاده مستقیم از این ماده در خاک‌های آهکی رایج نمی‌باشد. ولی نتایج پژوهش‌های انجام‌شده توسط پژوهشگران مختلف نشان داده که می‌توان با اعمال تدابیر و روش-های علمی، قابلیت جذب فسفر در خاک فسفات را افزایش داد (ملکوتی و همکاران، ۱۳۷۸). یکی از روش‌های افزایش انحلال خاک فسفات استفاده از ریز موجودات حل‌کننده خاک فسفات است. در دهه گذشته، برای تولید محصولات کشاورزی استفاده از حل‌کننده‌های زیستی خاک فسفات، مورد توجه قرار گرفته است.

مصرف مواد آلی همراه با خاک فسفات موجب می‌شود برخی از قارچ‌ها و باکتری‌های هتروتروف، از مواد آلی به عنوان کربن استفاده کرده و اسیدهای آلی تولید کنند. اسیدهای آلی با پروتونه کردن و کلات کردن باعث انحلال خاک فسفات و افزایش قابلیت جذب فسفر موجود در آن می‌شوند (ساگو[2] و همکاران، ۱۹۹۸). کودهای زیستی، حاوی موجودات مفید در تغذیه گیاه می‌باشند که می‌توانند مشتمل بر گروه‌های مختلف از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و مانند آن می‌باشند. امروزه استفاده از این کودها در جهت گام برداشتن به سوی کشاورزی پایدار و استفاده از اثرات مفید آن‌ها رو به افزایش است (قلی زاده و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین کودهای زیستی علاوه بر صرفه اقتصادی باعث پایداری منابع خاک، حفظ توان تولید در درازمدت و جلوگیری از آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌گردند (قربانی، ۱۳۸۶). کاربرد کودهای حاوی باکتری‌های حل کننده فسفر ضمن واردکردن جمعیت انبوهی از این ریز جانداران فعال و مؤثر در حوزه فعالیت ریشه، توان گیاه برای جذب بیشتر عناصر غذایی را نیز افزایش می‌دهد (سلیم پور و همکاران، ۱۳۸۴). در این پژوهش باکتری‌های حل کننده فسفر در جنگل‌های زیردست معدن کوه سپید لار در استان کهکیلویه و بویراحمد جداسازی و توانایی آن‌ها در حل فسفر معدنی مورد بررسی قرار گرفت.

---

[1] Chien
[2] Sago

۱-۲- اهداف تحقیق:

۱ -جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفر از خاک‌های اطراف معدن سنگ فسفات کوه سپیدلار یاسوج

۲ -ارزیابی توانایی انحلال باکتری‌های جداسازی شده در محیط کشت مصنوعی

۳ -ارزیابی توانایی انحلال خاک فسفات توسط باکتری‌های جداسازی شده در محیط کشت کاه گندم

۱-۳- فرضیه‌های تحقیق:

۱ -گونه‌هایی از باکتری‌های حل کننده فسفر در خاک‌های اطراف معدن فسفر حضور دارند.

۲- کاه گندم بستر مناسب برای باکتری‌ها حل کننده فسفر نامحلول است.

۳- باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفر، بخشی از فسفر حل شده را به ترکیبات فسفر معدنی قابل‌جذب تبدیل می‌کنند.

۴- استفاده از خاک فسفات و تلقیح آن با گونه‌های حل‌کننده‌ی، فسفر محلول را به صورت معنی‌داری افزایش می‌دهد.

فصل دوم
مروری بر پژوهش‌های انجام‌شده

۲-۱- فسفر

۲-۱-۱- اهمیت و مقدار فسفر

فسفر حدود ۰/۱۲ درصد پوسته زمین را تشکیل داده و در تمام خاک‌ها و سنگ‌ها حضور دارد این عنصر با اکثر عناصر ترکیبات پیچیده‌ای تشکیل می‌دهد به طوری که حدود ۱۵۰ نوع کانی که دارای حداقل ۰/۴۴ درصد فسفر باشد شناخته شده است. منبع اصلی فسفر در جهان رسوبات معدنی است که یک منبع غیرقابل تجدید محسوب می‌شود. فسفر از عناصر ضروری پرمصرف و محدودکننده‌ترین عنصر بعد از نیتروژن برای گیاه است (کیم[1] و همکاران، ۱۹۸۹). این عنصر در طبیعت بسیار فراوان است و به همراه عناصری مانند پتاسیم و نیتروژن ساختار اصلی گیاه را تشکیل می‌دهد. فسفر در ساختمان درشت مولکول‌هایی مانند اسیدهای هسته‌ای شرکت داشته (مارشنر[2]، ۱۹۹۳) و نقش منحصر به فردی در ذخیره و انتقال انرژی به صورت آدنوزین دی و تری فسفات دارد (جودی[3] و همکاران، ۲۰۰۶). فسفر یکی از عناصر ضروری است که نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و سیستم انتقال انرژی در گیاهان دارد. این عنصر جزیی از ساختمان DNA، RNA، ATP و فسفولیپیدها می‌باشد و کمبود آن می‌تواند منجر به کاهش سطح بسیاری از فرایندهای متابولیک مانند تقسیم و توسعه سلولی، تنفس و فتوسنتز شود (اسمیس[4] و شارپلی، ۲۰۰۵). فسفر یکی از عناصر ماکرو ضروری برای رشد بیولوژیکی است (اهرلیچ[5]، ۱۹۹۰). و مقدار آن ۴۰۰-۱۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در خاک است. میکروارگانیسم‌ها نقش اصلی در چرخه فسفر بر عهده دارند. چرخه فسفر توسط فرایند اکسیداسیون و احیاء صورت می‌گیرد. فسفر موجود در زی‌کره تنها به دو شکل محلول و رسوب است و هیچگونه تبادلی با اتمسفر ندارد (بیگون[6] و همکاران، ۱۹۹۰). ریزجانداران‌ها و خصوصاً

---

[1] Kim
[2] Marschner
[3] Jodi
[4] Sims
[5] Ehrlich
[6] Begon

باکتری‌ها نقش اصلی و کلیدی در چرخه‌ی این عنصر به عهده دارند. چرخه فسفر از طریق انجام فرایندهای اکسیداسیون و احیای پی در پی ترکیبات فسفر انجام می‌پذیرد. واکنشهای انتقال الکترون بین دو محدوده از حالت اکسایشی ۳- (فسفین) تا ۵+ (فسفات‌ها) می‌باشد. مکانیسم‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی درگیر برای انجام این نقل و انتقال‌های الکترونی در چرخه فسفر هنوز کاملاً شناخته نشده است (اهتک[1] و همکاران، ۱۹۹۶). مقدار فسفر محلول در خاک معمولاً خیلی کم حدود یک میلی گرم بر کیلوگرم (پی‌پی ام) و یا کمتر است (گلدستین[2]، ۱۹۹۴). بزرگترین مخزن فسفر در جهان، سنگ‌ها و دیگر رسوبات مثل آپاتیت‌های اولیه و نیز کانی‌های اولیه‌ای است که در طول فرایندهای ژئولوژیک تشکیل می‌گردند (ادم[3] و همکاران، ۱۹۸۶). به طور مثال حدود ۴۰ میلیون تن سنگ فسفات در هند تخمین زده شده است (روچودهوری و کائوشیک[4]، ۱۹۸۹). کود فسفاته باید از مواد ارزان برای تولید محصولات تهیه شود (هالدر[5] و همکاران، ۱۹۹۰). شکل‌های معدنی فسفر در خاک به صورت کانی‌های اولیه‌ای همچون آپاتیت، هیدروکسی آپاتیت و اکسی آپاتیت می‌باشد. اغلب این کانی‌های فسفاته درون سنگ‌ها قرار دارند و خصوصیت اصلی آن‌ها نامحلول بودن آن‌هاست. کانی‌های مذکور به‌عنوان تنها و بزرگترین منبع فسفر به حساب می‌آیند، زیرا می‌توانند از طریق صنعتی و پس از طی مراحل مختلف در کارخانجات کود شیمیایی به انواع کودهای شیمیایی فسفره تبدیل شوند. به‌علاوه این کانی‌ها در شرایط مناسب طبیعی نیز توسط گیاهان و ریزجانداران‌ها انحلال یافته و مورد استفاده قرار می‌گیرند به‌علاوه فسفر معدنی می‌تواند در سطح اکسیدهای هیدراته آهن، آلومینیم و منگنز نیز یافت شود که حلالیت و قابلیت جذب بسیار ضعیفی دارد. این خصوصیت در خاک‌های فرالیتیک یافت می‌شود که فرایند هیدراته شدن، تجمع اکسیدهای هیدراته و هیدروکسیدهای آن به وقوع می‌پیوندد و در نهایت می‌تواند منجر به افزایش تثبیت فسفر گردد (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹). اغلب خاک‌های کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از فسفر می‌باشند که بخش قابل توجه آن در نتیجه مصرف پی در پی کودهای شیمیایی فسفاتی در خاک تجمع یافته است (ریچاردسون[6]، ۱۹۹۴). کودهای شیمیایی فسفاته که اکنون به طور معمول در تولیدات کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند حاوی بخش زیادی از فسفر محلول در خاک هستند ولی این شکل محلول فسفر به سرعت با خاک وارد واکنش شده و برای گیاه غیرقابل دسترس می‌شود (دی[7]، ۱۹۸۸). فرایند تثبیت و رسوب فسفر در خاک معمولاً تا حدود زیادی به pH و نوع خاک بستگی دارد. فسفر محلول به صورت آنیون‌های فسفاته است که در خاک‌های اسیدی توسط اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن و آلومینیم تثبیت و نامحلول می‌گردد، در صورتی‌که در خاک‌های قلیایی این عمل تثبیت توسط کلسیم انجام می‌پذیرد و نهایتاً منجر به کاهش راندمان کودهای شیمیایی فسفاته می‌گردد (گلدستین، ۱۹۹۴؛ گلدستین، ۱۹۸۶ و ریچاردسون ، ۱۹۹۴). بر

---

1 Ohtake
2 Goldstein
3 Odum
4 Roychoudhury and Kaushik
5 Halder
6 Richardson
7 Dey

اساس نظر لیندزی و نورول[1] (۱۹۷۹) کود سوپر فسفات حاوی مقادیر کافی کلسیم است تا نیمی از فسفر موجود در این کود را به دی کلسیم فسفات و یا دی کلسیم فسفات آبدار تبدیل نماید.

دومین بخش فسفر آلی است. فسفر آلی ۳۰ تا ۵۰ درصد فسفر کل خاک را تشکیل می دهد البته ممکن است کمتر از ۵ درصد تا بیشتر از ۹۵ درصد متغیر باشد (پائول و کلارک[2]، ۱۹۸۸). فسفر آلی در خاک‌ها عمدتاً به شکل اینوزیتول فسفات‌ها وجود دارد که اصطلاحاً فیتات خاک نیز نامیده می‌شوند. اینوزیتول فسفات‌های خاک را گیاهان و ریز موجودات می‌سازند و از پایدارترین شکل‌های فسفر آلی در خاک به حساب می‌آیند. این ترکیبات آلی ممکن است تا ۵۰٪ از کل فسفر آلی خاک را شامل شوند (دلال[3]، ۱۹۷۷، هارلی و اسمیت[4]، ۱۹۸۳). دیگر ترکیبات فسفر آلی خاک به‌صورت فسفو فسفو منو استرها و فسفو دی استرها که شامل فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند، همچنین به‌صورت فسفو تری استرها وجود دارند. تنها حدود ۱٪ از کل فسفر آلی موجود در خاک شامل اسیدهای نوکلئیک و مشتقات آن می‌باشند. از میان فسفو لیپیدهای خاک، ماده کولین که در نتیجه هیدرولیز ماده لسیتین به وجود می‌آید، قابل تشخیص است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فسفر موجود در فسفو لیپیدهای خاک تنها حدود ۱ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد، گرچه اعداد بزرگتری همچون ۳۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز گزارش شده است (پائول و کلارک، ۱۹۸۸). بسیاری از ترکیبات آلی فسفره خاک موادی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که باید ابتدا به روش‌های زیستی به شکل فسفات‌های آلی با وزن مولکولی کمتر و نهایتاً به شکل‌های یونی قابل جذب سلول‌های زنده همچون ارتوفسفات اولیه و ثانویه تبدیل گردند ($H_2PO_4^-, HPO_4^{2-}$) (گلدستین، ۱۹۹۴). علاوه بر اینها همواره مقادیر عظیمی از مواد زنوبیوتیک[5] (ترکیبات فسفره غیر طبیعی) از طریق کاربرد آفت‌کش‌ها، مواد شوینده، پاک‌کننده‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مختلف اطفاء حریق به محیط اضافه می‌گردد. ترکیبات آلی مذکور، کمپلکس‌های کربنی فسفره هستند که معمولاً در مقابل فرایندهای هیدرولیز شیمیایی و تجزیه‌های بیولوژیک مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند (اهتک و همکاران، ۱۹۹۶، مک گرس[6] و همکاران، ۱۹۹۵، مک گرس و همکاران، ۱۹۹۸). امروزه با توجه به اثرات مخرب مخرب کودهای شیمیایی فسفاته ریزجانداران حل کننده فسفر مورد توجه قرار گرفته اند این ریزجانداران در محلول سازی فسفر از کمپلکس‌های فسفات کلسیم نقش دارند و تنها بخش کوچکی از فسفر را از ترکیبات فسفات آهن و فسفات آلومینیوم آزاد می‌سازند. از این رو این ریزجانداران نقش موثرتری در خاک‌های آهکی دارند که این گونه خاک‌ها حاوی مقادیر فراوانی فسفات کلسیم می‌باشند (حامیدا[7] و همکاران، ۲۰۰۶).

---

1 Lindsay and Norvell
2 Paul and Clark
3 Dala
4 Harley and Smith
5 Xenobiotic-P
6 McGrath
7 Hameeda

۲-۱-۲- ریز جانداران حل‌کننده‌ی فسفات

۲-۱-۲-۱- انواع

نمونه‌های متنوعی ازریزجانداران قادر به رهاسازی فسفر از منابع رسوب یافته فسفر گزارش‌شده‌اند. ریزجانداران حل کننده فسفات گروهی از ریزموجودات خاکزی هستند که به‌عنوان اجزای مکمل چرخه فسفر قادرند از طریق مکانیسم‌های مختلف فسفر را از منابع نامحلول آزاد کنند (صالح راستین، ۱۳۷۷). حل‌کننده فسفات که عمدتاً شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومایست‌ها می‌باشند با تولید اسیدهای‌آلی، موجب افزایش حلالیت فسفات‌های معدنی کم محلول نظیر خاک فسفات می‌شوند (جانا[1] ۲۰۰۲). میزان حل‌کردن فسفات معدنی ارتباط مستقیمی با مقدار اسیدیته‌ای دارد که در اطراف ریزجانداران به وجود می‌آید.

ریز جانداران حل کننده فسفر، با معدنی کردن فسفر آلی در خاک از طریق حل کردن فسفات‌های رسوب شده باعث افزایش دسترسی فسفر برای گیاه می‌شوند (چن[2] و همکاران، ۲۰۰۶؛ کنگو [3]و همکاران، ۲۰۰۲ و پرادهان و سوکلا[4]، ۲۰۰۵). امروزه ریز جانداران حل کننده فسفات در سطح وسیع به عنوان کود زیستی به منظور افزایش تولید و حفظ سلامت خاک استفاده می‌شود (خان[5] و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج تحقیقات سینگ و کاپور[6] (۱۹۹۲) بر روی گندم و نیز نتایج حاصل از آزمایش دوبی و بیلور[7] (۱۹۹۹) روی غلات و سیب زمینی، همگی حاکی از افزایش عملکرد این محصولات، با کاربرد ریز موجودات حل کننده فسفات بود. بابانا و آنتون[8] (۲۰۰۶) نشان دادند که از ترکیب باکتری آزاد کننده فسفر و قارچ آسپرژیلوس به همراه فسفات معدنی بیشترین عملکرد دانه گندم بدست آمد. نتایج تحقیقات رودرش[9] و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان داده است که استفاده از ریزجانداران حل کننده فسفات باعث بالا رفتن قدرت جوانه زنی، جذب عناصر غذایی، و افزایش ارتفاع گیاه می‌گردد. نتایج تحقیقات سولیاشیش[10] (۱۹۹۹) در خصوص مصرف ریزجانداران حل کننده فسفات در زراعت سویا نشان داده است که تلقیح خاک با این ریزجانداران باعث آزاد سازی فسفر و رشد بهتر گیاه در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود. بر اساس پژوهش‌های انجام شده ریزجانداران حل کننده فسفات فسفر تثبیت شده در خاک را حل کرده و باعث بهبود عملکرد گیاه می‌شود (زیدی و خان[11]، ۲۰۰۶ و گال[12] و همکاران، ۲۰۰۴). قورچیانی و همکاران (۱۳۹۱) در آزمایش خود به این نتیجه رسیدند که استفاده از ریزجانداران حل کننده فسفات یک شیوه بسیار مؤثر و با کارایی بالا در افزایش و بهبود رشد و نمو ذرت در شرایط کمبود آب و

---

[1] Jana
[2] Chen
[3] Kang
[4] Pradhan and Sukla
[5] Khan
[6] Sing and Kapoor
[7] Duby and Billore
[8] Babana and Antoun
[9] Rudresh
[10] Suliashih
[11] Zaidi and Khan
[12] Gull