بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

گروه علوم خاک

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم خاک

گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

عنوان

پراکنش باکتری‌های حل کننده فسفات و فعالیت فسفاتازهای خاک در کاربری‌های متفاوت

استاد راهنما

دکتر محمدرضا ساریخانی

استادان مشاور

دکترسید سیامک علوی‌کیا

دکترسید ابوالقاسم محمدی

پژوهشگر

نسترن چلبیانلو ویجویه

شماره پایاننامه: بهمن ماه ۱۳۹۲

سپاسگزاری

نعمات الهی افزون، زبان قاصر و عذر تقصیر فراوان. شکر و سپاس خالق هستی را که توفیق انجام این تحقیق را به این بنده ناچیز ارزانی داشت. برای یک مخلوق هیچ سعادتی بهتر از لطف خالق نیست و برای یک شاکر و هیچ نعمتی بهتر از اساتید خوب نیست. آنچه در پیش می آید مختصری است به رسم ادب، نه آنچنان که باید بلکه چنانکه از عهده بر آید.

ستایش می کنم پدر و مادر فداکارم را، آنان که هم نوا با آواز چلچله ها، مهر در قلبم کاشتند و با جویبار جاری دیدگانشان سیرابم کردند، فرشتگانی که گرمای دل، جز آغوش پر مهرشان نیست، چه بگویم و چگونه بگویم که غبار قله های ایثارشان هم نیستم، نور وجودشان همواره پرفروغ باد. نگین بوسه بر دستان گرم و پر مهر برادر و خواهر عزیزم که قلبشان لبریز از محبت و صداقت و گل واژه های زبانشان عشق و صمیمیت است.

از استاد بزرگوار و ارجمندم، **جناب آقای دکتر محمدرضا ساریخانی**، به خاطر راهنمایی های ارزنده علمی و عملی و مساعدت های لازم در تمام مراحل تحقیق، اعم از انجام و نگارش پایان‌نامه با صبر و شکیبایی فراوان، زحمت های زیادی را متحمل می شدند و نقش مهم و ستودنی ایفا می نمودند شکر و قدردانی می کنم. از استاد فرزانه ام **جناب آقای دکتر ناصر علی اصغرزاد**، استاد علم و اخلاق، که در تمام مراحل اجرای پایان نامه، صادقانه و با روی گشاده مرا راهنمایی و مساعدت کردند صمیمانه شکر و سپاسگزاری می نمایم. از اساتید گرانقدر **جناب آقای دکتر سید سیامک علوی کیا و جناب آقای دکتر سید ابوالقاسم مهدی**، به خاطر مساعدت های علمی و حمایت های بی دریغشان که توانستم گامی کوچک در پهن دشت لایتناهی علم بردارم قدردانی می نمایم و در پایان از **جناب آقای دکتر علی اصغرزاد** که زحمت داوری این پایان‌نامه را کشیدند سپاسگذارم.

نسترن چلبیانلو

بهمن ۱۳۹۲

تقدیم به پدر بزرگوارم:

به پاس قلب بزرگ و عاطفه سرشار و گرمای امید بخشش که فروکش نمی کند و انسانیتی که در نبرد با ظلمت از پای در نمی آید، بدین امید که تجلی آرزوهایش باشم.

تقدیم به مقدس ترین کلام زندگیم، مادر مهربانم:

الهه صبر و شکیبایی که آنچه دارم از اوست و آنچه ندارم در اوست، او که سزاوار ستایش است و آفتاب وجود پر مهرش زیباترین جوانه های امید را در بهار هستی ام رویاند، عزیزترینم که لحظه لحظه حیاتم مدیون گذشت و فداکاری های اوست و کلامم از سپاس ناتوان است....

تقدیم به برادر و خواهر عزیزم:

که از آغاز راه همواره مشوّق، پشتیبان و همگام من بوده و کمک های شایانی در به ثمر رسیدن پایان نامه نموده اند.

تقدیم به وجود پاکتان

نام خانوادگی: چلبیانلو ویجویه نام: نسترن

عنوان پایاننامه: پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات و فعالیت فسفاتازهای خاک در کاربری‌های متفاوت

استاد راهنما: دکتر محمدرضا ساریخانی

استادان مشاور: دکتر سید سیامک علوی‌کیا، دکتر سید ابوالقاسم محمدی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته**: علوم خاک **گرایش**: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

دانشگاه تبریز دانشکده کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: ۹۲/۱۱/۲۰ تعداد صفحه: ۱۱۰

واژه‌های کلیدی: فسفر، باکتری‌های حل‌کننده فسفات، فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی

چکیده:

فسفر یکی از عناصر ضروری پرمصرف برای رشد گیاه محسوب می‌شود، اما برخلاف سایر عناصر غذایی پرمصرف، کم‌تحرک‌ترین عنصر در خاک می‌باشد. یکی از روش‌های قابل استفاده نمودن منابع فسفر موجود در خاک بهره‌گیری از توان زیستی خاک و به‌ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز از مکانیسم‌های اصلی درگیر در انحلال و رهاسازی فسفر خاک می‌باشد. حضور باکتری‌های حل‌کننده فسفات و همچنین فعالیت فسفاتازی خاک متأثر از شرایط حاکم بر خاک از جمله شرایط اقلیمی، نوع پوشش گیاهی و حتی نوع کاربری اراضی به لحاظ کشت گیاهان مختلف می‌باشد. برای درک روابط موجود و با توجه به اهمیت و جایگاه موضوع، در این مطالعه از دو اقلیم متفاوت نیمه‌مرطوب (منطقه فندقلو- استان اردبیل) و نیمه‌خشک (منطقه نمین- اردبیل) نمونه‌های خاک از زمین‌هایی با کاربری تحت کشت گیاهان لگوم، غلات و بدون کشت نمونه‌برداری شد و فعالیت فسفاتازی (اسیدی و قلیایی) نمونه‌های خاک مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت که میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی در اقلیم نیمه مرطوب و شرایط عدم کشت و آنزیم فسفاتاز قلیایی در کاربری کشت لگوم و اقلیم نیمه خشک بیشترین مقدار به ترتیب ۸۶۶/۵۹ µg PNP/g.h و ۷۹۵/۱۵ µg PNP/g.h بدست آمد. پس از این مرحله، پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات با استفاده از محیط‌های اسپربر معدنی و آلی مورد بررسی قرار گرفت. شمارش و گزینش باکتری‌ها در محیط اسپربر معدنی با توجه به تولید هاله شفاف در حضور تری‌کلسیم فسفات و در محیط

اسپربر آلی (اینوزیتول هگزا فسفریک اسید بعلاوه BCIP) با تولید فنوتیپ آبی برای کلنی‌های رشد یافته انجام گرفت. تعداد کل باکتری‌ها در کاربری لگوم و اقلیم نیمه خشک بیشترین بود (۱۴/۱۳×۱۰^{۶} cfu/g)، اما تعداد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در هر دو محیط آلی و معدنی در شرایط عدم کشت و اقلیم نیمه مرطوب حداکثر بود (به ترتیب ۱/۹×۱۰^{۶} و ۱/۴۸×۱۰^{۶}). در این مطالعه در مرحله گزینش از محیط معدنی ۴۳ ایزوله و از محیط آلی ۹۷ ایزوله غربالگری شد. این سویه‌ها مجدداً به صورت همزمان در کشت‌های نقطه‌ای بر اساس قطر هاله شفاف و قطر کلنی یا شدت رنگ آبی ایجاد شده مورد ارزیابی قرار گرفتند و سویه‌های غربال‌شده برتر در مرحله بعد در محیط‌های اسپربر مایع، براساس آزادسازی فسفر مورد سنجش و مقایسه قرار گرفتند. در پایان ۵ سویه برتردر انحلال فسفات معدنی و آلی برای شناسایی نامزد شدند که روش مولکولی مبتنی بر ژن‌های 16S rDNA انجام گرفت، نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که ایزوله C1 و C4 به ترتیب بیشترین تشابه را با جنس‌های *Pseudomonas* sp. و *Stenotrophomonas* sp. داشتند و ایزوله‌ی C16 متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. بود که تعیین گونه‌ی آن نیاز به انجام تستهای بیوشیمیایی بیشتری دارد. همچنین با اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک و اطلاعات به دست آمده از فعالیت آنزیمی خاک و پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات، روابط موجود از نظر آماری در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملا تصادفی چند مشاهده‌ای توسط نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که بین آنزیم فسفاتاز اسیدی با کربن آلی، درصد رس و سیلت خاک اثر مستقیم و مثبت و با کربنات کلسیم اثر مستقیم و منفی وجود دارد. همچنین pH، سیلت و رس خاک اثر مستقیم و مثبتی بر آنزیم فسفاتاز قلیایی داشتند.

کلمات کلیدی: فسفر، باکتری‌های حل‌کننده فسفات، فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی.

فهرست

صفحه

۱ فصل اول: ۳

۱-۱ فسفر و اهمیت آن ۶

۱-۱-۱ فسفر در گیاه ۷

۱-۱-۲ فسفر در خاک ۷

۱-۲ باکتری‌های حل کننده فسفات ۹

۱-۳ عوامل مؤثر بر پراکنش باکتری‌ها ۱۱

۱-۳-۱ پوشش گیاهی و ساختار جوامع میکروبی خاک ۱۴

۱-۳-۲ اثرات شوری بر جوامع میکروبی خاک ۱۶

۱-۳-۳ عوامل مؤثر بر پراکنش باکتری‌های حلکننده فسفات ۱۷

۱-۴ سازوکارهای انحلال فسفات ۱۹

۱-۴-۱ انحلال فسفات معدنی ۲۱

۱-۴-۲ معدنی شدن فسفات آلی ۲۴

۱-۵ عوامل موثر بر فعالیت فسفاتاز ۳۰

۱-۵-۱ اثر کاربری اراضی بر فعالیت فسفاتاز ۳۰

۱-۵-۲ اثر ماده آلی بر فعالیت فسفاتاز ۳۲

۱-۵-۳ اثر رطوبت بر فعالیت فسفاتاز ۳۴

۱-۵-۴ اثر شوری و فسفر خاک بر فعالیت فسفاتاز ۳۴

۱-۵-۱۵اثر pH و درجه حرارت بر فعالیت آنزیم فسفاتاز ۳۵

۲ فصل دوم: ۳۶

۲-۱ نمونه برداری خاک..... ۳۷

۲-۲ تعیین خصوصیات فیزیکوشمیایی خاک ۳۸

۲-۳ سنجش فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی خاک ۴۱

۲-۳-۱ تهیه محلول اصلی (بافر عمومی) اصلاح شده ۴۲

۲-۳-۲ تهیه محلول کاری بافر برای فسفاتاز اسیدی و قلیایی ۴۲

۲-۳-۳ تهیه محلول سوبسترا برای فسفاتاز اسیدی و قلیایی..... ۴۲

۲-۳-۴ محلول استاندارد اصلی ۴۲

۲-۳-۵ تهیه استانداردهای کالیبراسیون ۴۲

۲-۴ شمارش و غربالگری باکتری‌های حلکنندهی فسفات ۴۳

۲-۴-۱ تهیه سریهای رقت و شمارش باکتری‌ها ۴۳

۲-۴-۲ جداسازی، خالص‌سازی و تهیه استوک از باکتری‌های منتخب ۴۴

۲-۴-۳ انجام کشت نقطهای ۴۵

۲-۴-۴ سنجش باکتری‌ها در محیط مایع..... ۴۶

۲-۴-۵ اندازهگیری فسفر آزاد شده در محیط مایع با روش رنگ زرد (وانادات مولیبدات)..... ۴۷

۲-۴-۶ آزمودن نمونههای باکتری با معرف Wade جهت سنجش حضور فیتات ۴۸

۲-۴-۷ شناسایی جدایههای توانمند ۴۹

۲-۵-۸ شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی ۵۰
۲-۵ طرح آماری و آنالیز داده‌ها ۶۲
۳ فصل سوم ۶۳
۳-۱ خصوصیات فیزیکی و شمیایی خاکها ۶۴
۳-۲ فعالیت آنزیمی خاکها ۶۴
۳-۳ پراکنش باکتری‌ها ۷۲
۳-۴ غربالگری و بررسی کارایی باکتری‌ها ۷۸
۳-۵ شناسایی باکتری‌ها ۸۴
۳-۶ نتیجه‌گیری ۸۶
۳-۷ پیشنهادها ۸۷
۴ منابع ۸۸

شکل ۲-۱: نقشه اقلیمی استان اردبیل و مکانهای نمونه‌برداری ۳۸

شکل ۲-۲: مراحل جداسازی و غربالگری حل کنندگان فسفات در محیط دارای فسفر آلی (با ویژگی تولید کلنی آبی) و در محیط دارای فسفر معدنی (با ویژگی تولید هاله شفاف) ۴۴

شکل ۲-۳: جداسازی، خالص‌سازی و تهیه استوک از باکتری‌های منتخب ۴۵

شکل ۲-۴: ارزیابی حل‌کنندگی فسفات به صورت کشت نقطه‌ای ۴۶

شکل ۲-۵: ارزیابی حل‌کنندگی فسفات در محیط کشت مایع ۴۷

شکل ۲-۶: منحنی استاندارد فسفر ۴۸

شکل ۲-۷: استفاده از معرف واد جهت تعقیب حضور فیتات (عدم فعالیت فیتازی) یا عدم حضور فیتات (فعالیت فیتازی) به ترتیب با تولید رنگ سفید و صورتی. ۴۹

شکل ۲-۸: تکثیر قطعه DNA رمزکننده 16S rRNA باکتری‌های منتخب جهت شناسایی مولکولی ... ۵۱

شکل ۲-۹: تست کاتالاز ۵۲

شکل ۲-۴-۹: تست سیترات و تایید حضور سیتراتاز در باکتری‌ها (محیط آبی نشانگر هیدرولیز سیترات و محیط سبز یعنی تست منفی باکتری) ۵۳

شکل ۲-۴-۲۴: تست تولید سولفید هیدروژن (ظهور رنگ تیره دلیل بر هیدرولیز آنزیمی آمینواسیدهای گوگرددار بوده و عدم تغییر رنگ یعنی فاقد این فعالیت آنزیمی هستند) ۶۱

شکل ۳-۱: تغییرات فسفاتاز اسیدی در دو اقلیم متفاوت (الف) و تحت سه کاربری مختلف (ب). ۶۶

شکل ۳-۲: اثر متقابل اقلیم و کاربری بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی ۶۶

شکل ۳-۳: اثر متقابل اقلیم و کاربری بر فعالیت فسفاتاز قلیایی ۶۹

شکل۳-۵: اثر متقابل اقلیم و کاربری بر تعداد کل باکتری‌ها در محیط Sperber معدنی. ۷۵

شکل ۳-۶: اثر متقابل اقلیم و کاربری بر تعداد باکتری‌های حل‌کننده فسفات دارای فنوتیپ آبی در محیط Sperber آلی (الف) و دارای هاله شفاف در محیط Sperber معدنی (ب). ۷۵

شکل ۳-۷: کشت خطی باکتری‌های منتخب ۸۰

فهرست جداول..... صفحه

جدول ۱-۱: قابلیت انحلال فسفات معدنی به وسیله باکتری‌های مختلف (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹) ۲۳

جدول ۱-۲: باکتری‌های مختلف و نوع سوبسترای آلی حاوی فسفات (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹)..... ۲۶

جدول ۲-۱: خصوصیات فیزیکی وشیمیایی مورد مطالعه ۳۹

جدول ۲-۲: اجزاء محیط کشت Sperber (الف)، محیط کشت LB (ب) ۴۳

جدول ۲-۳: اجزا تشکیل دهنده محلول ذخیره باکتری‌ها ۴۵

جدول ۲-۴: اجزاء معرف wade..... ۴۹

جدول ۲-۵: آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش ۱۶S rDNA باکتری‌ها..... ۵۰

جدول ۲-۶: اجزاء واکنش PCR..... ۵۱

جدول ۳-۱: حداقل و حداکثر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاکها..... ۶۴

جدول ۳-۲: تجزیه واریانس اثر اقلیم، کاربری و اثرات متقابل آنها بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی ۶۵

جدول ۳-۳: روابط همبستگی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیمی ۷۱

جدول ۳-۵: روابط همبستگی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بر جمعیت باکتری‌ها ۷۶

ادامه جدول ۳-۵: روابط همبستگی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بر جمعیت باکتری‌ها..... ۷۷

جدول ۳-۶: باکتری‌های منتخب با شدت رنگ آبی بیشتر از ۲ ..... ۷۹

جدول ۳-۷: باکتری‌های منتخب با نسبت قطر هاله‌ی شفاف به قطر کلنی بیشتر از ۲..... ۸۰

جدول ۳-۹: جنس های شناسایی شده برای ایزوله‌های برتر ۸۴

مقدمه :

خاک‌های کشاورزی در ایران غالباً آهکی هستند و اغلب منابع بزرگی از فسفر را دارا می‌باشند که بخش قابل ملاحظه‌ای از آن در نتیجه‌ی تجمع حاصل از کاربرد منظم کودهای فسفره است (علیخانی و همکاران، ۲۰۰۶؛ گیانشوار و همکاران، ۲۰۰۲) به صورتی‌که بخش زیادی از فسفات معدنی محلول که به شکل کود شیمیایی به خاک اضافه می‌شود، تثبیت شده و برای گیاهان غیرقابل استفاده می‌گردد. مقدار فسفر تثبیت شده ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی چیزی بالغ بر ۷۵ تا ۸۰٪ می‌باشد (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹). از آنجایی که مقدار فسفر قابل دسترس گیاه در خاک‌ها بسیار کم است و تأمین‌کننده نیاز گیاه نمی‌باشد، سطوح بسیار پایین فسفر قابل استفاده در ریزوسفر باعث می‌شود که این عنصر به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکننده رشد در بسیاری از زیست بوم‌ها شناخته شود، به طوریکه غلظت فسفر قابل استفاده در خاک به‌ندرت از ۱۰ µM تجاوز می‌کند (راگوتاما و کارتیکیان، ۲۰۰۵). ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیشتر احساس می‌شود که بر این امر واقف گردیم که منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تأمین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد (گلداستین و همکاران، ۱۹۹۳) و کافی است که این منبع عظیم فسفر را به‌صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. یکی از راهکارهای پیش‌رو استفاده از توان زیستی خاک می‌باشد. ریزسازواره های حل‌کننده‌ی فسفات نقش مهمی در تأمین فسفر در قالب روش‌های سازگار با محیط زیست و پایدار می‌تواند داشته باشند. جداسازی و بررسی کارایی انحلال فسفات آنها به‌عنوان یک راهکار جایگزین استفاده از کودهای شیمیایی فسفاته می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

به‌طور کلی پذیرفته شده است که اسیدهای آلی تولید شده توسط ریزسازواره ها مکانیسم اصلی برای انحلال فسفات معدنی توسط ریزسازواره های خاک است (هالدر و همکاران، ۱۹۹۰). به نظر می‌رسد اسیدگلوکونیک، شایع‌ترین عامل انحلال فسفات معدنی باشد (گلداستین و همکاران، ۱۹۹۳). آنزیم‌های فسفاتاز تولیدی از جامعه میکروبی وگیاهان نقش اصلی را در معدنی‌سازی فسفر آلی در خاک بازی می‌کنند. فسفاتازها به

دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹؛ طباطبائی و همکاران، ۱۹۹۴). فسفاتاز اسیدی، برخلاف فسفاتاز قلیایی، فعالیت کاتالیتیک بهینه‌ی خود را در مقادیر pH اسیدی تا خنثی نشان می‌دهد. علاوه بر این، تقسیم‌بندی‌های دیگری در مورد این آنزیم‌ها بر اساس نوع سوبسترا مشاهده می‌شود که اسید فسفاتاز اختصاصی و غیراختصاصی، از جمله این موارد می‌باشد (روزولینی و همکاران، ۱۹۹۸). آنزیم فسفاتاز پیوندهای استری فسفات آلی را به ارتوفسفاتها هیدرولیز می‌کند، منابع تولیدکننده این گروه از آنزیم‌ها، ریزسازواره ها، گیاهان و جانوران می‌باشند که نقش فسفاتازهای میکروبی و گیاهی در تأمین فسفر از منابع آلی فسفر در خاک قابل توجه می‌باشد (آمادور و همکاران، ۱۹۹۷؛ توسلی وهمکاران، ۱۳۷۹؛ طباطبائی وهمکاران، ۱۹۹۴). فسفاتازهای میکروبی ممکن است معدنی‌سازی بیشتر ترکیبات فسفر آلی را انجام دهد. از باکتری‌های قابل کشت خاک ۶۰-۳۰ درصد قادر به معدنی کردن فسفر آلی خاک‌ها هستند (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas* (راثی پور و علی اصغرزاد، ۱۳۸۴؛ قادری و همکاران، ۲۰۰۸؛ ملبوبی و همکاران، ۲۰۰۹)، *Bacillus* (الیویرا و همکاران، ۲۰۰۹) *Pantoea* (جانگ و همکاران، ۲۰۰۲؛ ملبوبی و همکاران، ۲۰۰۹) *Rhizobium* (علیخانی و همکاران، ۲۰۰۶) از قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات به‌شمار می‌آیند. حضور جمعیت میکروبی مؤثر در انحلال فسفات و پراکنش ریزسازواره های حل‌کننده فسفات تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی نظیر میزان ماده آلی، دما، رطوبت، pH و نوع کاربری، کوددهی (آلی یا شیمیایی) قرار می‌گیرد و در مواجه با شرایط مختلف مکانیسم‌های بکار گرفته شده از جانب آنها در تأمین فسفات از منابع آلی و معدنی موجود در خاک تغییر خواهد نمود (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

با توجه به مطالب فوق و آگاهی از این موضوع که باکتری‌های حل‌کننده فسفات بسیار متنوع‌اند و توزیع جمعیت و پراکنش آنها در شرایط خاک‌های مختلف فرق می‌کنند و جمعیت آن به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، میزان ماده آلی و مقدار فسفر آن و عملیات کشاورزی بستگی دارد و همچنین تولید، فعالیت و انحلال آنزیمی فسفر آلی و معدنی شدن آن تحت تأثیر پارامترهای مختلفی از جمله شرایط اقلیمی (رطوبت و دما) و

شرایط خاک (شامل pH، ماده آلی، درجه حرارت و رطوبت)، نوع کاربری اراضی (کشت و عدم کشت و نوع محصول) است، تحقیق حاضر به منظور دنبال کردن اهداف زیر، انجام گرفت.

۱- بررسی تغییرات فعالیت فسفاتازی (اسیدی و قلیایی) خاک تحت کاربری‌های متفاوت (عدم کشت و زیرکشت گیاهان لگوم و غلات) در دو اقلیم متفاوت (نیمه‌مرطوب و نیمه خشک).

۲- ارزیابی پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شرایط اقلیمی متفاوت تحت کاربری‌های متفاوت.

۳- جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات (دارای قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی و دارای فعالیت فسفاتازی برای انحلال فسفات آلی) و شناسایی گونه‌های کارآمد.

۴- بررسی رابطه بین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک با پراکنش جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک.

فصل اول:

بررسی منابع

۱-۱ فسفر و اهمیت آن

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف ضروری و اصلی برای رشد و نمو گیاهان است (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹). اگر چه فسفر در خاک‌ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان یافت می‌شود (خان و همکاران، ۲۰۰۷). اما در مقایسه با سایر عناصر غذایی، فسفر در بیشتر خاک‌ها تحرک و قابلیت جذب کمی دارد، غلظت فسفر محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است، در حدود $mg\ kg^{-1}$ ۱ یا کمتر می‌باشد. سلول ممکن است چندین شکل فسفر را جذب نماید ولی غالب‌ترین شکل جذبی آن $H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{2-} می‌باشد. بزرگترین منابع فسفر سنگ‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دوران‌های زمین‌شناسی است. اشکال معدنی فسفر در خاک به شکل کانی‌های اولیه از قبیل آپاتیت، هیدروکسی آپاتیت یا اُکسی آپاتیت یافت می‌شود (علی‌اصغرزاد، ۱۳۷۶). اغلب خاک‌های کشاورزی منابع بزرگی از فسفر را دارا می‌باشند که بخش قابل ملاحظه‌ای از آن در نتیجه تجمع حاصل از کاربرد منظم کودهای فسفره است. زیرا بخش زیادی از فسفات معدنی محلول که به شکل کود شیمیایی به خاک اضافه می‌شود تثبیت شده و برای گیاهان غیرقابل استفاده می‌گردد (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹). بنابراین نزدیک به ۸۰٪ فسفر اضافه شده به خاک ممکن است در نتیجه تثبیت آلی و معدنی و یا حتی فیزیکی برای گیاهان غیر قابل استفاده شود (کارتیکیان و راگوتوتاما، ۲۰۰۵). دومین منبع مهم فسفر در خاک ماده آلی است. اَشکال آلی فسفر ۳۰-۵۰ درصد کل فسفر را در اغلب خاک‌ها به خود اختصاص می‌دهند، گرچه که ممکن است از ۵٪ تا ۹۵٪ در نوسان باشد. فسفر آلی در خاک بیشتر به فرم فیتات یا اینوزیتول هگزا فسفات می‌باشد. خیلی از ترکیبات فسفر آلی موادی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که ابتدا بایستی به فسفات معدنی محلول ($H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-}) یا فسفات آلی با وزن مولکولی کمتر تبدیل شوند تا به وسیله سلول جذب گردند (علی‌اصغرزاد، ۱۳۷۶).

۱-۱-۱ فسفر در گیاه

فسفر یکی از اجزاء ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای زیستی می‌باشد. فرایندهای اصلی بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز و تنفس به وسیله فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شود. علت توانایی ترکیبات آلی حاوی فسفر در انتقال انرژی این است که فسفر در بسیاری از پیوندهای شیمیایی می‌تواند در نتیجه هیدرولیز شکسته و تولید انرژی فراوان نماید (خدابنده، ۱۳۶۹) استرهای فسفات در کل به عنوان حامل‌های انرژی در مسیرهای متابولیکی مختلف عمل می‌کنند. فسفولیپیدها نقش مهمی در ساختار و کارکرد غشاءها بر عهده دارند. بعلاوه، فسفریله شدن و دِفسفریله شدن پروتئین‌ها برای مسیرهای انتقال پیام در گیاهان ضروری می‌باشد (راگوتاما و کارتیکان، ۲۰۰۵). فسفر در تشکیل بذر نقش اساسی داشته و به مقدار زیاد در بذر میوه یافت می‌شود (ملکوتی و همایی، ۱۳۷۳)

تفاوت فاحشی بین غلظت فسفر درون سلول‌های گیاهی (در حد mM) و محلول خاک (در حد µM) وجود دارد. سطوح بسیار پایین فسفر قابل استفاده در ریزوسفر باعث می‌شود که این عنصر به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکننده رشد در بسیاری از زیست بوم‌ها شناخته شود. شاید فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی با حداقل فراهمی در خاک مطرح باشد، غلظت فسفرقابل استفاده (Pi) در خاک به ندرت متجاوز از 10 µM است. تثبیت معدنی و تشکیل کمپلکس‌های آلی فسفات غیر قابل جذب در خاک و تثبیت فیزیکی آن توسط دانه‌های رس، دلایل اولیه برای فراهمی کم این عنصر به شمار می‌رود (راگوتاما و کارتیکان، ۲۰۰۵).

۱-۱-۲ فسفر در خاک

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف ضروری و اصلی برای رشد و نمو موجودات زنده است و مقدار آن در خاک ۴۰۰-۱۲۰۰mg kg^{-1} برآورد می‌شود. در مقایسه با سایر عناصر غذایی، فسفر در بیشتر خاک ها تحرک و فراهمی کمی دارد، گر چه فسفر در خاک ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان یافت می‌شود (خان و همکاران

۲۰۰۷). فسفر آلی درون محلول خاک بیشتر از فسفر معدنی است ولیکن جذب مستقیم آن به وسیله گیاهان غیر ممکن می‌باشد (تانگ و همکاران، ۲۰۰۶). غلظت فسفر محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است، در سطح mg kg^{-1} ۱ یا کمتر می‌باشد. سلول ممکن است چندین شکل فسفر را جذب نماید ولی غالب‌ترین شکل جذبی آن $H_2PO_4^-$ یا HPO_4^- می‌باشد که مقدار نسبی هر یک به pH محلول خاک بستگی دارد. در pH حدود ۶ بیش از ۹۰ درصد از فسفر محلول به صورت یون $H_2PO_4^-$ می‌باشد ولی با افزایش pH از میزان آن کاسته می‌شود بطوریکه در pH بین ۸ تا ۱۰ گونه HPO_4^- غالب خواهد بود. (هاولین و همکاران، ۱۹۹۹) بزرگترین منابع فسفر صخره‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دورانهای زمین‌شناسی است. اشکال معدنی فسفر در خاک به شکل کانی‌های اولیه از قبیل آپاتیت، هیدروکسی‌آپاتیت یا اُکسی‌آپاتیت یافت می‌شود و به صورت صخره‌های لایه‌ای هستند که ویژگی اصلی آنها نامحلول بودن آن‌ها است. به رغم این موضوع، منابع فوق بزرگترین منبع این عنصر در خاک به شمار می‌روند و تحت شرایط مناسب می‌توانند به شکل محلول درآیند و برای گیاهان و ریزسازواره‌ها قابل استفاده گردند. در خاک‌های اسیدی، فسفات معدنی همراه با اکسیدهای آبدار Fe، Al و Mn یافت می‌شود که درجه انحلال و قابلیت جذب آن ضعیف می باشد. این ویژگی خاک‌های فرالیتی است (گیانشوار و همکاران، ۲۰۰۲، رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

پدیده تثبیت و رسوب فسفر در خاک معمولاً به نوع خاک و pH آن بستگی دارد. بنابراین در خاک‌های اسیدی، فسفر به وسیله اکسیدها و هیدروکسیدهای Fe و Al تثبیت می‌شود در حالی که در خاک‌های قلیایی این کار به وسیله کلسیم انجام می‌گیرد و باعث کاهش راندمان کودهای فسفر در خاک می‌گردد (گیانشوار و همکاران، ۲۰۰۲، رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

پدیده تثبیت و رسوب فسفر در خاک معمولا به نوع خاک و pH آن بستگی دارد. بنابراین در خاک‌های اسیدی، فسفر به وسیله اکسیدها و هیدروکسیدهای Fe و Al تثبیت می‌شود در حالی که در خاک‌های قلیایی این کار به وسیله کلسیم انجام می‌گیرد و باعث کاهش راندمان کودهای فسفر در خاک می‌گردد (گیانشوار و همکاران،

۲۰۰۲، رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

دومین جزء مهم فسفر در خاک ماده آلی است. اَشکال آلی فسفر ممکن است ۳۰-۵۰ درصد کل فسفر را در اغلب خاک ها به خود اختصاص دهد، گرچه که ممکن است از ۵٪ تا ۹۵٪ در نوسان باشد. فسفر آلی در خاک بیشتر به شکل فیتات (اینوزیتول فسفات) می باشد. فیتات به وسیله ریزسازواره‌ها و گیاهان ساخته می‌شود و پایدارترین شکل فسفر آلی در خاک است به طوری که تا بیش از ۵۰٪ فسفر آلی را تشکیل می‌دهد. دیگر ترکیبات فسفر آلی در خاک به شکل فسفومونواسترها، فسفودی‌استر ها (فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک) و فسفوتری‌استرها هستند (گیانشوار و همکاران، ۲۰۰۲، رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

از کل فسفر آلی در خاک تقریباً ۱٪ به اسیدهای نوکلئیک یا مشتقات آنها اختصاص دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که تنها تقریباً ۵-۱ میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر موجود در خاک از نوع فسفر به کار رفته در ساختار فسفولیپیدها است، گر چه این رقم تا ۳۴ میلی گرم در کیلوگرم هم گزارش شده است (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹).

۱-۲ باکتری‌های حل کننده فسفات

رشد گیاه تحت تاثیر عوامل زیستی و غیر زیستی زیادی می‌باشد، با توجه به آزادسازی حدود ۴۰٪ از مواد فتوسنتزی در ریزوسفر گیاه، این محیط شرایط مساعدی را برای حضور جمعیت میکروبی فراهم نموده است. این جمعیت میکروبی اثرات مفید، خنثی یا زیان‌آور بر روی گیاه خواهد داشت. PGPR[1] ها اولین بار به وسیله کلوپر و شروث تعریف شد و شامل باکتری¬های احاطه‌کنندهٔ ریشه هستند که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. امروزه PGPR ها به عنوان زادمایه میکروبی به شکل کنترل‌گرهای زیستی یا کودهای زیستی استفاده می‌شوند (پینگ و بلند ۲۰۰۴). سازوکارهایی که به وسیله آن PGPR ها بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند به دو دسته تقسیم می‌شود: اثرات مستقیم و اثرات غیر مستقیم. اثرات غیر مستقیم بیشتر از طریق تولید متابولیت‌های میکروبی است که اثر

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

منفی بر پاتوژن‌ها دارند از قبیل آنتی بیوتیک‌ها، سایدروفورها یا HCN که با ممانعت از رشد ریزسازواره‌های بیماریزا، باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹، رامش کومار و همکاران، ۲۰۰۲، تیموسک و واگنر، ۱۹۹۹). اثرات مستقیم آن‌ها از راه‌های متعددی اتفاق می افتد از آن جمله، سنتز هورمون های گیاهی، تسهیل جذب عناصر غذایی، تثبیت ازت، کاهش پتانسیل غشاء ریشه‌ها، سنتز برخی آنزیم‌هایی (از قبیل ACC deaminase) که سطح هورمون‌های گیاهی را تعدیل می‌کنند (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹) و همچنین انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی که فسفر نامحلول را برای گیاهان قابل استفاده می‌نماید (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹، تیموسک و واگنر، ۱۹۹۹). جمعیت‌های قابل توجهی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک و در ریزوسفر گیاه وجود دارد که شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی با غالبیت گونه‌های هوازی است، همچنین جمعیت آنها در ریزوسفر در مقایسه با خاک غیر ریزوسفری به مراتب بیشتر بوده است. گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم‌فسفات، دی‌کلسیم‌فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات را بیان داشته‌اند. در بین باکتری هایی با این قابلیت، گونه هایی از جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Rhizobium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium*، *Achromobacter*، *Flavobacterium* (رودریگز و فراگا، ۱۹۹۹) و نیز *Pantoea agglomerans* (ملبوبی و همکاران۲۰۰۹؛ جانگ و همکاران، ۲۰۰۲) مشاهده می‌شود. تشخیص چشمی[1] و حتی برآورد نیمه کمی توانایی انحلال فسفات ریزسازواره‌ها به وسیله غربالگری در پلیت[2] امکان پذیر است، که در آن منطقه شفاف[3] اطراف کلنی‌های میکروبی در محیط کشت حاوی فسفات معدنی نامحلول (غالباً تری‌کلسیم فسفات یا هیدروکسی آپاتیت) به عنوان تنها منبع فسفر بررسی می‌شود. این روش به روش هالو[4] نیز معروف است. به هر حال این روش برای جداسازی و تشخیص اولیه ریزسازواره‌های

[1]- visual detection
[2]- plate screening method
[3]- clear zone
[4]- halo method