شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثر بیوچار، باکتری محرک رشد و تنش شوری بر برخی شاخص‌های میکروبی در خاک پس از برداشت اسفناج

زهره بوالحسنی[1*]، عبدالمجید رونقی[2]، رضا قاسمی فسائی[3]، مهدی زارعی[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد بخش مهندسی علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[2] استاد بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[3] دانشیار بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

چکیده

به‌منظور بررسی اثر باکتری محرک رشد و مواد آلی بر برخی شاخص‌های میکروبی خاک پس از برداشت اسفناج تحت تنش شوری، آزمایش گلدانی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار اجراء شد. تیمارها شامل مواد آلی (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج و ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج) و سطوح شوری (صفر، ۲ و ۴ گرم کلرید سدیم بر کیلوگرم خاک) و باکتری در دو سطح (بدون باکتری و تلقیح با باکتری *pseudomonas florescence*) می‌باشد. نتایج نشان داد افزایش سطوح شوری، تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی را در خاک پس از برداشت به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در حالیکه افزودن مواد آلی و تلقیح با باکتری سودوموناس فلورسنس، بطور قابل توجهی سبب افزایش تنفس میکروبی و کربن زیست توده در خاک پس از برداشت گردید. بطور کلی افزودن مواد آلی و تلقیح با سودوموناس فلورسنس، باعث کاهش اثرات سوء شوری بر میزان تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی در خاک شد.

کلمات کلیدی: ریزوباکتر، سودوموناس فلورسنس، تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی

مقدمه

ویژگی‌های میکروبی خاک از شاخص‌های مهم کیفیت خاک به شمار می‌ایند و به همین دلیل کیفیت و سلامت خاک با استفاده از خواص میکروبی نیز قابل ارزیابی می‌باشند (Herrick,2000; Raiesi, 2007). موجودات خاکزی، نقش مهمی در زیست فراهمی عناصر غذایی، تجزیه مواد آلی و رشد و حاصلخیزی خاک دارند (Tejada et al., 2008). ریزجانداران خاک معمولا در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی در محیط خاک قرار دارند. یکی از این تنش‌ها، تنش شوری می‌باشد که در اغلب خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک فرآیندهای مهم خاک و زندگی ریزجانداران را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تنش شوری سبب کاهش جمعیت میکروبی و فعالیت ریزجانداران در خاک شده و از این طریق بر فراهمی عناصر غذایی تاثیر می‌گذارد (Zahran, 1997). کاهش رشد ریزجانداران خاک در خاک‌های شور به دلیل تنش ناشی از فزونی نمک می‌باشد و به همین دلیل موجب کاهش تنفس خاک می‌گردد (Tripathi et al, 2006). یکی از روش‌های کاهش اثرات منفی تنش شوری، راه‌کارهای بیولوژیکی همچون استفاده از باکتری‌های محرک رشد و گیاه مقاوم به شوری می‌باشد (Bacilio et al., 2004). برهم کنش‌های بین گیاهان و باکتری‌های مفید نشان داده است که این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف در برابر تنش‌های محدود کننده محیطی، از گیاهان محافظت می‌کنند. یکی از این مکانیسم‌ها تغییر در مرفولوژی ریشه است که هورمون‌های گیاهی به ویژه ایندول -۳- استیک اسید نقش مهمی در این فرآیند دارند (Potters et al., 2007). مواد آلی از شاخص‌های مهم و تاثیرگذار در حاصلخیزی خاک می‌باشد. با وجود مطالعات فراوان درباره مواد آلی و نقش آن در باروری خاک و کشاورزی پایدار، امروزه مزارع خشک و نیمه خشک ما با مشکل کمبود مواد آلی مواجه هستند و آنچه ضروری بنظر می‌رسد ارائه راهکارهای کاربردی برای افزایش بهره وری از این مزارع بوده و یکی ازضروریات آن افزایش مواد آلی خاک است (اسدی و همکاران، ۱۳۸۸). بیوچار، زغال تهیه شده از زیست‌توده‌های گیاهی و ضایعات کشاورزی است که طی فرآیند پیرولیز(آتشکافت) تولید می‌شود (Lehmann & Joseph, 2009). بیوچار ترکیب پایداری از کربن، ماده‌ای متخلخل و بسیار ریزدانه است که در دمای کم تا متوسط تحت شرایطی با اکسیژن محدود تولید می‌شود، طی فرایند نوعی سوخت زیستی به صورت مایع یا گاز هم تولید می‌شود که برای مصارف مختلف قابل استفاده است (Sohi et al., 2009). تحقیقات مختلف نشان داده شده است که اضافه

* ایمیل نویسنده مسئول: z.bolhasani93@yahoo.com

[1] Pyrolysis

کردن بیوچار به خاک باعث بهبود فعالیت میکروبی خاک می‌شود. دلیل افزایش تنفس میکروبی در اثر افزودن بیوچار، بخاطر غلظت بیشتر عناصر غذایی موجود در بیوچار که یک محیط مناسبی را برای فعالیت ریزجانداران خاک فراهم کرده است، می‌باشد (Pietikäinen et al., 2000 ؛ Krull et al., 2009). پژوهش حاضر با بررسی اثر بیوچار و باکتری محرک رشد بر برخی ویژگیهای زیستی در خاک تحت تنش شوری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش در شرایط گلخانه‌ای بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در سال ۱۳۹۶انجام شد. تیمارها شامل سطوح شوری (صفر، ۲ و ۴ گرم کلرید سدیم بر کیلوگرم خاک)، مواد آلی (۰، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج و ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج) و باکتری در دو سطح (بدون مایه زنی باکتری و با مایه زنی باکتری Pseudomonas fluorescens)، بصورت فاکتوریل و در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. پوسته برنج از کارخانه برنج کوبی شهرستان مرودشت (استان فارس) جمع‌آوری و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی منتقل شد. پس از هوا خشک شدن پوسته‌های برنج، آن‌ها را آسیاب کرده و از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. جهت تهیه بیوچار، پوسته-های برنج هوا خشک شده را در ورقه آلومینیومی بسته‌بندی و به مدت چهار ساعت در دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس در داخل کوره قرار داده شد تا فرآیند پیرولیز (آتشکافت) انجام شود. برخی ویژگی‌های اندازه گیری شده خاک اولیه و پوسته و بیوچار پوسته برنج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و مواد آلی مورد مطالعه

	بافت خاک	پهاش	قابلیت هدایت الکتریکی $dS.m^{-1}$	کربن آلی ٪	کربنات کلسیم معادل ٪	نیتروژن کل ٪	**پتاسیم $mg.kg^{-1}$	**فسفر $mg.kg^{-1}$
مواد آلی	لوم رسی	۷/۶	۰/۷	۰/۶۹	۴۰/۰۵	۰/۰۹	۲۸۰	۲۰
پوسته برنج	-	۵/۹	۰/۳۴	۶۲/۲	-	۰/۴۲	۰/۰۳	۰/۳۵
بیوچار پوسته برنج	-	۶	۲/۴	۶۸/۳	-	۰/۴۶	۰/۸۲	۰/۴۲

* پهاش و قابلیت هدایت الکتریکی پوسته و بیوچار برنج در نسبت ۱:۱۰ بیوچار یا پوسته برنج به آب

** برای نمونه خاک به ترتیب پتاسیم یا فسفر قابل عصاره گیری با استات آمونیوم و بی کربنات سدیم و برای بیوچار و پوسته برنج پتاسیم و فسفر کل

در ابتدا با توجه به کاربرد منابع مواد آلی (پوسته برنج و بیوچار آن)، نمونه‌های خاک به وزن سه کیلوگرم آماده و سپس در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد. به‌منظور جلوگیری از کمبود احتمالی سایر عناصر غذایی و بر اساس نتایج آزمون خاک عناصر نیتروژن، آهن، منگنز، روی و مس به ترتیب از منابع اوره، سکوسترین آهن، سولفات منگنز، سولفات روی و سولفات مس و به‌صورت محلول به خاک اضافه شد. پس از رسیدن به رطوبت مناسب خاک درون کیسه‌ها کاملا مخلوط شده و به داخل گلدان‌های سه کیلوگرمی پلاستیکی منتقل شد. در هر گلدان ده عدد بذر اسفناج (رقم *Viroflay*) در عمق حدود سه سانتی متری خاک کاشته شد و همچنین تیمارهای حاوی باکتری را پس از تهیه‌ی زاد مایه باکتری در شرایط آزمایشگاهی به مقدار دو میلی لیتر به ازای هر بذر اسفناج درون گلدان افزوده و روی آن با مقدار کافی خاک پوشانده شد و رطوبت خاک در طول آزمایش در حدود رطوبت ظرفیت مزرعه نگهداری شد. بعد از استقرار کامل بوته‌ها، تعداد آن‌ها به پنج عدد کاهش یافت. تیمار نیتروژن به‌صورت دو قسط (نصف قبل از کاشت و نصف دیگر ۲۰ روز بعد از کاشت) اعمال شد. به‌منظور جلوگیری از تنش ناگهانی، تیمار شوری بعد از استقرار کامل بوته‌ها و به‌صورت تدریجی و در طول دو هفته اعمال شد. آبیاری گلدان‌ها با آب مقطر و در حدود ظرفیت مزرعه صورت گرفت. ۶۳ روز بعد از کاشت، ریشه‌ها و اندام هوایی جدا شده و مقداری از خاک تازه از هر گلدان برداشته و جهت تعیین شاخص‌های میکروبی به آزمایشگاه منتقل شدند.

نفس میکروبی با استفاده از سیستم بسته (Closedjars) و تیتراسیون (Isermeyer, 1952) و کربن زیست توده میکروبی با استفاده از روش انکوباسیون – تدخین (Jenkinson & Powlson, 1976) اندازه‌گیری شدند. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار spss مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

داده های جدول ۲ نشان داد که در تیمار بدون باکتری، کاربرد چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک، سبب کاهش معنی‌دار میزان تنفس میکروبی شده است و نسبت به تیمار شاهد ۶/۴۴ درصد کاهش معنی‌دار داشته است. ولی سطح دو گرم نمک بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. در تیمار با باکتری، کاربرد دو و چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک، میانگین تنفس میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۴ و ۸/۴۳ درصد کاهش داد. در هر دو تیمار با و بدون باکتری، کاربرد منابع مواد آلی سبب افزایش تنفس میکروبی شد. در تیمار بدون باکتری، کاربرد ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج، میانگین تنفس میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۲۰/۱۹، ۲۴/۵۴، ۳۵/۲۶ و ۳۹/۸۰ درصد افزایش داد. و در تیمار با باکتری، کاربرد ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج، میانگین تنفس میکروبی را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۹/۷۵، ۱۳/۱۴، ۱۶/۰۴ و ۲۰/۴۰ درصد افزایش داد. در هر دو تیمار با و بدون باکتری، بیشترین میزان تنفس میکروبی مربوط به تیمار بدون کلرید سدیم و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج بود که در تیمار بدون باکتری، با برخی تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین در دو تیمار با و بدون باکتری، کمترین میزان تنفس میکروبی مربوط به تیمار چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک و بدون کاربرد ماده آلی بود.

آثار گوناگون نمک‌ها در خاک بر تنفس میکروبی، به‌دلیل تنش اسمزی و سمیت یونی است که بر فیزیولوژی و مسیرهای متابولیکی سلول‌های میکروبی تاثیر می‌گذارد (Rietz & Haynes, 2003). کاهش رشد ریزجانداران در خاک‌های شور به‌دلیل تنش ناشی از فزونی نمک می‌باشد (Pathak & Rao, 1998). تحقیقات مختلف نشان داده است که اضافه کردن بیوچار به خاک باعث بهبود فعالیت میکروبی خاک می‌شود. تنفس میکروبی در خاک تیمار شده با پسماندهای گیاهی نسبت به خاک شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (لکزیان و یزدان پناه، ۱۳۸۶). رفتار جمعیت میکروبی بستگی به کیفیت و میزان مواد آلی اضافه شده به خاک دارد ضمنا تنفس میکروبی خاک، میزان در دسترس بودن مواد آلی را نشان می‌دهد (Baath, 1989). مطالعه اثر اصلی باکتری نشان می‌دهد، میزان تنفس میکروبی در خاک، با افزودن باکتری سودوموناس فلورسنس در مقایسه با تیمار عدم کاربرد باکتری، بیشتر می‌باشد. وجود باکتری‌های محرک رشد با افزایش مقدار کربن آلی خاک باعث افزایش تنفس میکروبی نسبت به تیمار شاهد گردید به طوری که دو گونه باکتری، *باسیلوس سابتیلیس* و *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* باعث افزایش تنفس میکروبی نسبت به تیمار تلقیح نشده با باکتری شدند (جعفری و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۲. اثر کلرید سدیم (شوری)، منابع ماده آلی و باکتری سودوموناس فلورسنس بر تنفس میکروبی خاک پس از برداشت (mg CO_2-C.Kg^{-1}.h^{-1})

کلرید سدیم (گرم بر کیلوگرم خاک)	ماده آلی (درصد)					میانگین
	شاهد (بدون ماده آلی)	پوسته برنج		بیوچار پوسته برنج		
		۰/۵	۱	۰/۵	۱	
			(بدون باکتری)			
۰	۱۰/۲۷ h*	۱۲/۲۲ ef	۱۲/۳۳ def	۱۳/۷۸abc	۱۴/۲۴ a	۱۲/۵۷ A
۲	۱۰/۳۵ h	۱۱/۹۵ f	۱۲/۵۲ de	۱۳/۵۵ bc	۱۳/۹۰ab	۱۲/۴۵ A
۴	۹/۰۵۲ i	۱۱/۴۹ g	۱۲/۱۰ ef	۱۲/۷۹ d	۱۳/۳۶ c	۱۱/۷۶ B
میانگین	۹/۸۹۲ E	۱۱/۸۹ D	۱۲/۳۲ C	۱۳/۳۸ B	۱۳/۸۳ A	۱۲/۲۶ B**
			(با باکتری)			
۰	۱۳/۱۷ ef*	۱۴/۳۲ bcd	۱۴/ ۳۹bc	۱۴ /۷۰b	۱۵/۷۷ a	۱۴/۴۷ A
۲	۱۲/۶۴ f	۱۳/۷۵ cde	۱۴/۰۱bcd	۱۴/۴۷ b	۱۴/۵۹ b	۱۳/۸۹ B
۴	۱۱/۳۸ g	۱۲/۷۵ f	۱۳/۶۷ de	۱۴/۰۱bcd	۱۴/۴۳ bc	۱۳/۲۵ C
میانگین	۱۲/۴۰ E	۱۳/۶۱ D	۱۴/۰۳ C	۱۴/۳۹ B	۱۴/۹۳ A	۱۳/۸۷ A**

* در هر قسمت جدول (با و بدون باکتری) اعدادی که در هر ردیف یا ستون دارای یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ هستند از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد بر اساسآزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

** اثر کاربرد باکتری محرک رشد را نشان می‌دهد. اعداد با حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشند.

داده‌های جدول ۳ نشان داد در هر دو تیمار با و بدون باکتری، میانگین زیست توده میکروبی خاک پس از برداشت گیاه، با افزایش سطوح کلرید سدیم (شوری)، کاهش یافته است. در تیمار بدون باکتری، کاربرد دو و چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک، میانگین زیست توده میکروبی خاک را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۱۹/۸۰ و ۳۰/۷۱ درصد کاهش داد. همین روند در تیمار با باکتری نیز مشاهده شد. بطوریکه با کاربرد دو و چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک، این مقدار کاهش نسبت به تیمار شاهد، به ترتیب به میزان ۱۰/۴۷ و ۲۳/۳۶ درصد بود. در هر دو تیمار با و بدون باکتری، کاربرد منابع مواد آلی سبب افزایش زیست توده میکروبی شد. در تیمار بدون باکتری، کاربرد ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج، میانگین زیست توده میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۲۰/۱۹، ۲۴/۵۴، ۳۵/۲۶ و ۳۹/۸۰ درصد افزایش داد و در تیمار با باکتری، کاربرد ۱ درصد وزنی پوسته برنج، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج، میانگین زیست توده میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۸/۷۶، ۱۴/۶۹و ۱۵/۶۷ درصد افزایش داد. در تیمار با باکتری نیز، کاربرد ۰/۵ و ۱ درصد وزنی پوسته برنج، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج، میانگین زیست توده میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ۳/۳۷، ۱۰/۲۶، ۱۴/۴۱ و ۱۶/۵۴ درصد افزایش داد. در هر دو تیمار با و بدون باکتری، بین سطوح بیوچار از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در هر دو تیمار، بیشترین میزان کربن زیست‌توده میکروبی مربوط به تیمار بدون کلرید سدیم و ۱ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج بود. هر چند با تیمار بدون نمک و ۰/۵ درصد وزنی بیوچار پوسته برنج تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین در دو تیمار با و بدون باکتری، کمترین میزان کربن زیست‌توده میکروبی مربوط به تیمار چهار گرم نمک بر کیلوگرم خاک و بدون کاربرد ماده آلی بود. هر چند با برخی تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. کربن زیست‌توده میکروبی یک واحد مستقیم برای بیان تعداد ریزجانداران به‌ویژه باکتری‌ها بوده و نمایانگر کربن تثبیت شده در سلول‌های میکروبی می‌باشد (Vance et al., 1987). آبیاری با آب شور موجب افزایش کربن و نیتروژن زیست توده میکروبی شده و در برابر آن، سرعت معدنی شدن کربن و نیتروژن، کاهش پیدا می‌کند (Sarig et al., 1994). کاهش میزان کربن زیست توده میکروبی را از ۳۹۱ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک در سطح شوری چهار دسی‌زیمنس بر متر تا ۲۰۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در شوری بیش از ۱۲ دسی‌زیمنس برمتر را شاه و شاه (۲۰۱۱) مشاهده کردند. شاخص‌های تنفس و زیست توده میکروبی تحت تاثیر در دسترس بودن کربن آلی در خاک هستند و هر عاملی که باعث افزایش میزان کربن آلی خاک شود، این دو فاکتور را نیز افزایش می‌دهند (ناهیدان و نوربخش، ۱۳۸۸).

جدول ۳. اثر کلرید سدیم (شوری)، منابع ماده آلی و باکتری سودوموناس فلورسنس بر کربن زیست توده میکروبی خاک پس از برداشت ($mg\ C.kg^{-1}$)

کلرید سدیم (گرم بر کیلوگرم خاک)	ماده آلی (درصد)					
	شاهد (بدون ماده آلی)	پوسته برنج		بیوچار پوسته برنج		میانگین
		۰/۵	۱	۰/۵	۱	
		(بدون باکتری)				
۰	۱۸/۷۳ c*	۲۰/۲۴ b	۲۱/۰۵ b	۲۲/۷۶ a	۲۳/۰۰ a	۲۱/۱۶ A
۲	۱۵/۹۹ efg	۱۶/۲۶ ef	۱۶/۹۴ de	۱۷/۷۸ cd	۱۷/۸۹ cd	۱۶/۹۷ B
۴	۱۳/۸۹ i	۱۴/۰۱ hi	۱۴/۸۶ ghi	۱۵/۱۹ fgh	۱۵/۳۳ fg	۱۴/۶۶ C
میانگین	۱۶/۲۰ C	۱۶/۸۴ C	۱۷/۶۲ B	۱۸/۵۸ A	۱۸/۷۴ A	۱۷/۵۹ B**
		(با باکتری)				
۰	۲۱/۶۸ ef*	۲۳/۰۱ cd	۲ / ۹۰bc	۲ /۷۲ab	۲۵/۰۳ a	۲۳/۶۷ A
۲	۲۰/۱۳ h	۲۰/۶۷ fgh	۲۱/۳۵ efg	۲۱/۷۶ ef	۲۲/۰۶ de	۲۱/۱۹ B
۴	۱۶/۰۳ j	۱۶/۱۰ j	۱۸/۵۳ i	۱۹/۷۱ h	۲۰/۳۱ gh	۱۸/۱۴ C
میانگین	۱۹/۲۸ D	۱۹/۹۳ C	۲۱/۲۶ B	۲۲/۰۶ A	۲۲/۴۷ A	۲۱/۰۰ A**

* در هر قسمت جدول (با و بدون باکتری) اعدادی که در هر ردیف یا ستون دارای یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ هستند از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

** اثر کاربرد باکتری محرک رشد را نشان می‌دهد. اعداد با حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اعمال شوری سبب کاهش معنی دار تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی در مقایسه با تیمار شاهد گردید. کاربرد منابع مواد آلی سببب افزایش تنفس و کربن زیست توده میکروبی شد. بطوریکه با کاربرد یک درصد وزنی بیوچار پوسته برنج بیشترین مقدار این دو ویژگی مشاهده شد. همچنین تلقیح با باکتری *سودوموناس فلورسنس* بطور قابل توجهی میزان تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. بر اساس یافته‌های این پژوهش مشخص شد که کاربرد همزمان بیوچار و باکتری باعث افزایش بیشترین مقدار تنفس و کربن زیست توده میکروبی در خاک پس از برداشت شد. بطور کلی افزودن مواد آلی و تلقیح با *سودوموناس فلورسنس*، باعث کاهش اثرات سوء شوری بر میزان تنفس میکروبی و کربن زیست توده میکروبی در خاک شد.

منابع

جعفری، ص.، چرم، م.، عنایتی ضمیر، ن. و معتمدی، ح. ۱۳۹۱. بررسی تأثیرات باسیلوس سابتیلیس وکورینه باکتریوم گلوتامیکوم بر برخی شاخص‌های میکروبی خاک در سطوح مختلف شوری. مهندسی زراعی (مجله علمی کشاورزی)، ۲(۳۵)، ۲۳۰-۲۵۵.

لکزیان، ا. و یزدان پناه، ن.۱۳۸۶. مطالعه سرعت تجزیه بقایای گیاهی گندم، یونجه و گوجه فرنگی در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم و صنایع کشاورزی. ۲۱، ۹-۳.

ناهیدان، ص. و نوربخش، ف. ۱۳۸۸. تأثیر تاریخچه مدیریت کربن آلی بر برخی ازخصوصیات بیولوژیکی خاک. مجموعه مقالات یازدهمین کنگره علوم خاک ایران.

Baath, E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water, Air, and Soil Pollution, 47(3-4), 335-379.

Basilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J. P., and Bashan, Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-taggged Azosprillum Lipoferum Biology and Fertility of Soils.40(3), 188-193.

Herrick J.E. 2000. Soil quality: an indicator of sustainable land management. Applied Soil Ecology, 15:75-83.

Isermeyer, H. 1952. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde, 56(1-3), 26-38.

Jenkinson, D.and Powlson, D. S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: a method for measuring soil biomass. Soil Biology and Biochemistry, 8(3), 209-213.

Krull, E. S., Baldock, J. A., Skjemstad, J. O.and Smernik, R. J. 2009. Characteristics of biochar: organo-chemical properties. Biochar for Environmental Management: Science and Technology, 53.

Lehmann, J.and Joseph, S. 2009. Biochar for environmental management: science and technology. Earthscan, London & Sterling, VA.

Pathak, H. and Rao, D. L. N. 1998. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. Soil Biology and Biochemistry, 30(6), 695-702.

Pietikäinen, J., Kiikkilä, O., and Fritze, H. 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. Oikos, 89(2), 231-242.

Potters,G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme. K. J., and Jansen, M.A.K. 2007.Stress induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends in Plant Sci. 12: 98-105.

Raiesi F. 2007. The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping system may favor microbial indicators of soil quality in central Iran. Agriculture, Ecosystems and Environment, 121:309-318. 20.

Rietz, D. N.and Haynes, R. J. 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry, 35(6), 845-854.

Sarig, S.and Steinberger, Y. 1994. Microbial biomass response to seasonal fluctuation in soil salinity under the canopy of desert halophytes. Soil Biology and Biochemistry, 26(10), 1405-1408.

Shah, S. A.and Shah, Z. 2011. Changes in soil microbial characteristics with elevated salinity. Sarhad Journal of Agriculture (Pakistan).

Sohi, S., Lopez-Capel, E., Krull, E.and Bol, R. 2009. Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. CSIRO Land and Water Science Report, 5(09), 17-31

Tejada M., Gonzalez J.L., Garcia-Martinez A.M. and Parrado J. 2008. Effect of different green manures on soil biological properties and maize yield. Bioresource Technology, 99:1758-1767.

Tripathy, P. P.and Ayyappan, S. 2005. Evaluation of *Azotobacter* and *Azospirillum* as biofertilizers in aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(8), 1339-1343.

Vance, E. D., Brookes, P. C.and Jenkinson, D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, 19(6), 703-707.

Zahran, H. H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biology and Fertility of Soils, 25(3), 211-223.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Influence of biochar, PGPR and salinity stress on some microbial indicators in spinach post-harvest soil

Bolhasani*[1], z, Ronaghi[2], A.M., Ghasemi Fasaei, R.[3] Zarei, M. [3]

[1] M. Sc Graduate Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Shiraz, Iran
[2] Professor., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Shiraz, Iran
[3] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Shiraz, Iran

Abstract

In order to study the effect of PGPR and organic matter sources on some soil microbial indicators under salinity stress after harvesting spinach, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was carried out. Treatments consisted of factorial arrangement of organic substances (0.0, 0.5 and 1.0% rice husk and 0.5 and 1.0% rice husk biochar, w/w) and salinity levels (0.0, 2.0 and 4.0 g NaCl kg^{-1} soil and bacteria in two levels (control and inoculation with *pseudomonas florescence).* Results showed that increasing salinity levels significantly decreased microbial respiration and microbial carbon biomass in post-harvest soil. However, addition of organic substances and inoculation with pseudomonas florescence significantly increased microbial respiration and microbial carbon biomass carbon in post-harvest soil. In conclusion, addition of organic substances and inoculation with pseudomonas florescence mitigated detrimental effects of salinity on microbial respiration and microbial carbon biomass in post-harvest soil.

Keywords: Rhizobacteria, Pseudomonas florescence, Microbial respiration and Microbial carbon biomass

* Corresponding author, Email: z.bolhasani93@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی به لیمو (Lippia citriodora L.)

محبوبه جلالی[1*]، علی‌اکبر زارع[2]

[1] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

[2] دانش‌آموخته دکتری دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر میزان کلروفیل و کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.)، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار طراحی و اجرا شد. تیمارهای مورد بررسی شامل پنج گروه از باکتری‌های محرک رشد گیاه شامل *Pseudomonas putida*، *Azospirillum spp.*، *Azotobacter* sp.، *Mycobacterium* sp. و *Bacillus sp.* و تیمار بدون تلقیح باکتریایی بود. نتایج نشان داد که کاربرد تیمار باکتریایی باعث افزایش میزان کلروفیل، عملکرد اسانس و کیفیت ترکیبات اسانس نسبت به شاهد شد. افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل (۱/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار *Azospirillum spp.* نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. همچنین بیشترین عملکرد اسانس متعلق به دو تیمار *Mycobacterium* sp. و *Bacillus* sp. به میزان ۰/۴ و ۰/۲ گرم بر کیلوگرم ود. نتایج نشان داد که ژرانیال، نرال و سیترال ترکیبات غالب اسانس در تمام تیمارها بود که بیشترین و کمترین مجموع این سه ترکیب به ترتیب در تیمار *Bacillus* sp. (۷۲/۷ درصد) و تیمار شاهد (۵۱/۱ درصد) وجود داشت. با توجه به نتایج این پژوهش، در مجموع استفاده از تیمارهای باکتریایی *Azospirillum* spp.، *Bacillus* sp. و *Mycobacterium* sp. جهت افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی به لیمو توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: ترکیبات اسانس، عملکرد اسانس، کود زیستی، کلروفیل

مقدمه

گیاه دارویی به لیمو با نام علمی Lippia citriodora و از خانواده شاه پسند (Verbenaceae)، یکی از مهم ترین گیاهان دارویی و صنعتی است که به صورت خام و فرآوری شده در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد. اسانس به عنوان عمده ترین ترکیب شیمیایی آن دارای ترکیب‌های مؤثره ای نظیرسیترال (نرال ، ژرانیال)، ژرانیول، لیمونن و سینئول است (Chavallier, 1996). در گیاهان دارویی تغذیه متناسب و بهینه با استفاده از نهاده‌های شیمیایی و زیستی تأثیر چشمگیری بر عملکرد و شاخص‌های فیتوشیمیایی مرتبط با عملکرد دارد.

امروزه علی رغم پیشرفت و توسعه چشمگیر کاربرد داروهای شیمیایی، هم چنان گیاهان دارویی و شکل‌های مختلف دارویی حاصل از آن ها به طور گسترده‌ای مورد استفاده و استقبال قرار می‌گیرند. با توجه به اهمیت و نقش گیاهان دارویی در صنایع مختلف، نکته قابل توجه در تولید این گیاهان، افزایش تولید زیست توده آن‌ها بدون کاربرد نهاده های شیمیایی است. در همین راستا، استفاده از گونه‌های میکروبی همیار با گیاهان دارویی در بهبود عملکرد و کیفیت آن‌ها مؤثر خواهد بود. در این رابطه مشخص شده است که باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR[1])، می توانند رشد گیاه را با ساز و کارهای مختلفی افزایش دهند (Abbas-zadeh et al., 2012).

امروزه مکانیسم‌های مستقیم اثر بخشی انواع باکتری‌هایی مانند تولید فیتوهورمون ها، یونوفورها، افزایش دسترسی گیاه از طریق آنزیمی و غیرآنزیمی فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی، توسعه سیستم ریشه‌ای، فعالیت‌های آنزیمی مانند ACC -د آمیناز و تولید ریزوبیتوکسین به منظور کاهش اثرات سوء اتیلن استرسی و افزایش گره زایی و نهایتاً تثبیت بیولوژیک ازت مولکولی به اثبات رسیده است.

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه با تولید هورمون های گیاهی مانند اکسین و تولید ACC-د آمیناز، باعث افزایش وزن ریشه، افزایش رشد طولی و انشعابات فرعی، تولید ریشه های نازک تر و افزایش تولید تارهای کشنده و در نتیجه افزایش سطح ریشه و جذب آب و عناصر غذایی می شوند (Sarcheshmeh poor et al., 2014). علاوه بر این، باکتری‌های حل کننده فسفات هم که در ریزوسفر به وفور یافت می‌شوند، با ترشح اسیدهای

* ایمیل نویسنده مسئول: jalali.mah@lu.ac.ir

[1]. Plant growth promoting rhizobacteria

آلی و فسفاتازها قادرند ترکیبات فسفاتی غیر محلول را به شکل قابل استفاده برای گیاهان در آورند. بنابراین تلقیح گیاهان با این میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش جذب فسفر شده و به تبع آن رشد گیاهان افزایش می یابد (Abbas-zadeh et al., 2012).

مطالعات نشان داده است که کاربرد باکتری هایی مثل ازتوباکتر، آزوسپیریلیوم و جایگزینی آن ها با تنظیم کننده‌های رشد شیمیایی، در بهبود رشد و ترکیب اسانس گیاه مریم گلی (Salvia officinalis) کارایی بالایی داشت (Youssef et al., 2004). Leithy و همکاران (۲۰۰۶) نیز اثر ازتوباکتر در افزایش میزان اسانس و برخی ترکیبات عمده آن را در گیاه رزماری مثبت گزارش کردند. El-Ghadbane و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که در نتیجه مصرف کودهای زیستی، رشد گیاه و عملکرد روغن رازیانه افزایش یافت. علاوه براین کیفیت ترکیبات شیمیایی آن نیز تغییر کرد.

تأثیر کودهای زیستی بر رشد گیاه دارویی آویشن باغی (Thymus vulgaris L.) و نعناع (Mentha piperita L.) نیز مثبت ارزیابی شده است (Vital et al., 2002; Kaymak et al., 2008). در آزمایشی بر روی گیاه (Majorana hortensis) نتایج نشان داد که تأثیرات کودهای زیستی شامل ازتوباکتر، آزوسپریلیوم و باکتری های حل کننده فسفات روی شاخص های رشدی، میزان اسانس و همچنین اثرات آن بر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی، قارچ ها و مخمرها قابل توجه بوده است (Fatma et al., 2006). بنابراین با توجه به اهمیت گیاه دارویی به‌لیمو و همچنین در نظر گرفتن اهمیت مدیریت اکولوژیک این گونه‌های گیاهی، این آزمایش به منظور بررسی تأثیر تلقیح با باکتریهای محرک رشد بر خصوصیات رشد، عملکرد و کیفیت اسانس به لیمو انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه لرستان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. قبل از انجام آزمایش، ویژگی-های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش به روش اسپارک (۱۹۹۶) مورد ارزیابی قرار گرفت (Spark, 1996). هر پلات با طول ۳ متر و عرض یک متر بود. نشاهای به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.)، به فاصله ۵۰ سانتیمتر در ۶۰ سانتیمتر از یکدیگر به طوری که تعداد ۱۲ نشاء در هر پلات وجود داشته باشد؛ کشت شد. قبل از کشت بر اساس نیاز گیاه مقدار ۲۵۰ کیلوگرم بر هکتار سوپرفسفات تریپل و ۲۰۰ کیلوگرم سولفات پتاسیم با خاک به‌خوبی مخلوط شدند. کود نیتروژنه نیز از منبع اوره و به مقدار ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در ۳ نوبت مورد استفاده قرار گرفت.

در این آزمایش از باکتری های جنس *Pseudomonas putida*، *Azospirillum* spp.، *Azotobacter* sp. و *Mycobacterium* sp. *Bacillus* sp. استفاده شد. باکتری‌ها از موسسه انسیتو پاستور ایران تهیه شد. سویه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون محیط کشت مایع TSB (Tryptic Soybean Broth)کشت و به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند. نشاها (در مرحله سه برگی) به داخل ظرف‌های حاوی تیمارهای مختلف باکتری منتقل شده و پس از ۲۴ ساعت و در ساعات اولیه روز به زمین اصلی منتقل شدند. تراکم مایه تلقیح ۵×۱۰۸ CFU بر میلی‌لیتر بود. آبیاری در اوایل کشت و با توجه به موقعیت آب و هوایی، دو نوبت در هفته و در اواسط تابستان و اواخر دوره کشت تا برداشت نمونه گیاه (سه ماه) سه نوبت در هفته آبیاری انجام شد. وجین کرتها در کل دوره رشدی گیاه شش مرتبه صورت گرفت.

میزان کلروفیل به روش آرنون (۱۹۴۹) و در مرحله قبل از گلدهی انجام گرفت (Arnon, 1949). برای سنجش غلظت کلروفیل، مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگی در استون ۸۰٪ عصاره‌گیری شد (LFe-Chtenthaler and Wellburn, 1985). سپس عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و تا رسیدن به حجم ۲۵ میلی‌لیتر و استخراج کامل کلروفیل به آن استون اضافه شد. جذب نوری کلروفیل a و b به ترتیب در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مربوطه، غلظت کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ بدست آمد. غلظت کلروفیل‌های a و b از فرمول‌های زیر بدست آمد.

در هر گرم وزن تر a میلی‌گرم کلروفیل] =(جذب در ۶۴۷ نانومتر) ۲/۷۹۲- (جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۱۲/۲۵[

در هر گرم وزن تر b میلی‌گرم کلروفیل] =(جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۵/۱- (جذب در ۶۴۷ نانومتر) ۱۲/۲۱[

در مرحله گلدهی کامل گیاهان برداشت شده و در محیط آزمایشگاه و در مدت ۱۰ روز خشک و به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه لرستان انتقال داده شدند. پس از آسیاب کردن نمونه‌های گیاهی، عمل اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با بخار انجام شد. شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات اسانس توسط دستگاه های GC وGC/MS انجام شد. شناسایی طیف‌ها به کمک محاسبه شاخص بازداری کواتس (RI) که با تزریق هیدروکربن‌های نرمال در شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها انجام شد و با مقادیری که در منابع مختلف منتشر گردیده بود، مقایسه شد. بررسی طیف‌های جرمی نیز برای شناسایی

ترکیب‌ها انجام گردید و شناسایی‌های انجام شده، با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه‌های مختلف تایید گردید. درصد نسبی هر کدام از ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس‌ها با توجه سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام به دست آمد (Adams, 2001). اطلاعات به دست آمده با استفاده از برنامه آماری SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

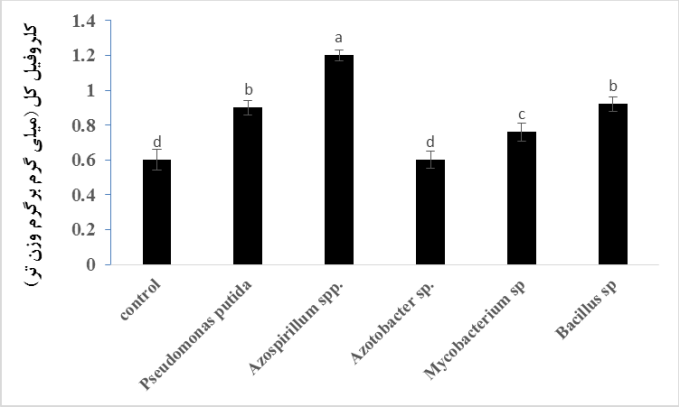
خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

بافت خاک	نیتروژن (٪)	فسفر (mg/kg)	پتاسیم (mg/kg)	EC (ds/m)	پ.هاش	کربنات کلسیم معادل (٪)	کربن آلی (٪)
لوم	۰/۱	۷	۲۱۰	۲/۱	۷/۲	۲۳/۲	۰/۵

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که به غیر از تیمار ازتوباکتر، همه تیمارها نسبت به شاهد میزان کلروفیل را افزایش دادند. بیشترین میزان کلروفیل (۱/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار Azospirillum spp. بود (شکل ۱). قابل ذکر است که تاثیر تیمارها بر روی تمام پارامترها معنی‌دار بوده است (نتایج نشان داده نشده است).

Jahanshahi و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که غلظت کلروفیل گیاه دارویی گشنیز در اثر کاربرد ورمی کمپوست و باکتری های ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج مطالعه Sheikhi-Ghahfarokhi و همکاران (۲۰۱۴) نیز حاکی از آن است که تیمارهای باسیلوس[2]، سودوموناس پوتیدا[3]، سودوموناس فلورسنس[4] و ازتوباکتر و کورینه باکتریوم[5] قادر بودند به طور معنی داری میزان کلروفیل را در گیاه همیشه بهار نسبت به شاهد افزایش دهند.

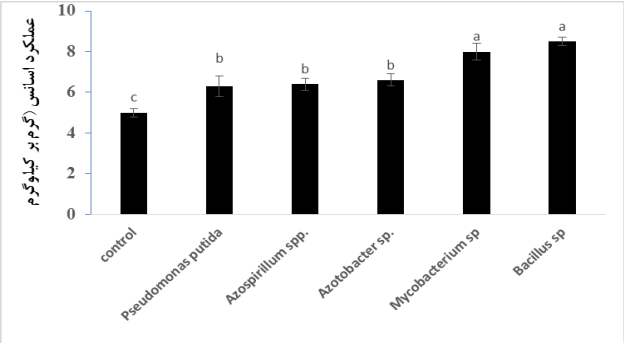


شکل ۱- اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان کلروفیل کل

نتایج آزمایش Kazemalilou and Rasouli-Sedghiani (۲۰۱۲) نیز نشان داد که تلقیح بذور گیاه بنگدانه (Hyoscyamus niger) با باکتری های سودوموناس فلورسنت سبب افزایش میزان کلروفیل گردید. دلیل کاهش معنی دار میزان کلروفیل در تیمار ازوتوباکتر نسبت به سایر باکتریها را

[2] Bacillus
[3] Pseudomonas putida
[4] Pseudomonas fluorescens
[5] Corynebacterium

می‌توان به کافی بودن میزان نیتروژن خاک طی آزمایش و در نتیجه ممانعت از فعالیت تثبیت نیتروژن در این تیمار نسبت داد. در این رابطه Mafakheriو همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که تلقیح بادرشبو با ازتوباکتر در هیچ یک از صفات مورد بررسی از جمله میزان کلروفیل اختلاف معنی داری با شاهد نشان نداد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که همه تیمارها نسبت به شاهد عملکرد اسانس را افزایش دادند (شکل ۲). تیمارهای Bacillus sp و Mycobacterium sp بیشترین عملکرد اسانس را نسبت به شاهد و دیگر تیمارهای تلقیح باکتریایی داشتند.



شکل ۲- اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر عملکرد اسانس گیاه بهلیمو

نتایج بررسی اثر تلقیح با تثبیت کننده های نیتروژن، درگیاه مرزنجوش (El-Gahadban et al., 2002) و در گیاه دارویی رزماری (Abdelaziz et al., 2007)، افزایش غلظت برخی از عناصر پرمصرف در گیاه را ناشی از افزایش سطح جذبی ریشه به ازای هر واحد از حجم خاک، افزایش جذب آب، فعالیت فتوسنتزی و تعرق بیان کردند که تلقیح با این کودها به طور مستقیم بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و مصرف کربوهیدراتها در گیاهان مؤثر است. همچنین Dastborhan و همکاران (۲۰۱۱) نیز در بررسی‌های خود بر روی گیاه بابونه آلمانی (Matricaria chamomilla L.) به این نتیجه رسیدند که باکتری آزوسپریلیوم در مقایسه با باکتری ازتوباکتر، تأثیر بیشتری بر افزایش میزان عملکرد اسانس و عملکرد کاپیتول گیاه داشت. در این رابطه Banchio و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که باسیلوس سابتیلیس به طور معنی داری باعث افزایش زیست توده و درصد اسانس در مرزنگوش (Origanum majorana) شد.

Jamshidi و همکاران (۲۰۱۲) در تفسیر نتیجه حاصل از بهبود میزان اسانس در اثر مصرف مواد آلی بیان داشتند از آنجایی که اسانس ها ترکیب هایی ترپنوئیدی بوده که واحدهای سازنده آن ها (ایزوپرنوئیدها) مانند ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) و دی متیل آلیل پیروفسفات (DMAPP)، نیاز مبرم به NADPH دارند و با توجه به این موضوع که حضور عناصری نظیر نیتروژن و فسفر برای تشکیل ترکیب های اخیر ضروری می باشد، از این رو استفاده از مواد آلی می تواند از طریق بهبود فسفر و تا حدودی دیگر عناصر غذایی مانند نیتروژن توسط ریشه رازیانه، موجب افزایش اسانس این گیاه دارویی شده باشد و با توجه به این که مهم ترین باکتری های حل کننده فسفات از جنس سودوموناس و باسیلوس (Han et al., 2006) می باشند می توان احتمال داد که دلیل افزایش اسانس در تیمارهای تلقیح باکتریایی Bacillus sp. وPseudomonas putida افزایش جذب فسفر در این تیمارها می باشد.

در بررسی ترکیبات اسانس برگ به لیمو چندین ترکیب که دارای بیشترین فراوانی بودند در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. ترکیبات با بیشترین فراوانی شامل سیترال، ژرانیال و نرال بود. نتایج نشان داد تیمارهای مختلف سبب تغییر در مقدار این ترکیبات و پروفیل شیمیایی مواد موثره شد. بیشترین میزان سیترال، ژرانیال و نرال مربوط به اثر Bacillus sp و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاکی از آن است که تیمارهای مختلف باکتریایی اثر یکسانی بر میزان کلروفیل و کمیت و کیفیت اسانس برگ بهلیمو نشان ندادند با این حال تقریباً تمام تیمارهای باکتریایی رشد، عملکرد و شاخص کیفی را نسبت به شاهد بهبود بخشیدند. به طور کلی، تیمار Bacillus sp و Mycobacterium sp بیشترین تاثیر مثبت را بر عملکرد و کیفیت گیاه به لیمو نسبت به سایر تیمارها نشان دادند. اسانس بهلیمو دارای ترکیبات

مختلفی است که مهمترین آن‌ها ژرانیال، نرال، لیمونن، ۱،۸- سینئول است (Ebadi et al., 2015). در این تحقیق، استفاده از باکتری‌های Bacillus sp و Mycobacterium sp باعث افزایش غلظت ژرانیال و نرال در ترکیب اسانس گیاه بهلیمو شد.

جدول ۲. اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر درصد اجزای اسانس برگ بهلیمو

ترکیب	RI (شاخص بازداری)	*Pseudomonas putida*	*Azospirillum* spp.	*Azotobacter* sp.	*Mycobacterium* sp	*Bacillus* sp	شاهد
		(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)
Citral	۱۲٤۰	۱۵/۹	۱٦/۷	۱٦/۵	۱۵/٦	۱۷/۳	۱۲/٤
Geranial	۱۲۷۰	۲۷/۵	۲۸/۹	۲۵/٤	۳۳/٤	۳۵/۸	۲۲/۳
Neral	۱۲٤۰	۱۵/۵	۱۸/۲	۱۷/۳	۱۸/۷	۱۹/٦	۱٦/٤
1,8-cineol	۱۰۳۳	۵/۷	٤/٦	۳/٦	٤/۵	۳/۲	٦/٦
trans-Caryophyllene	۱٤٤٤	۳/٤	۳/۲	۳/۵	۲/۲	۱/۵	۵/۳
spathulenol	۱٦۰٦	۳/۸	۳/۵	٤/۷	۳/۳	۲/۹	٤/۲
tau.-Cadinol	۱٦۲۰	۲/٤	۲/۵	۲/۱	۱/۹	۱/٤	۳/۲
limonene	۱۰۳۱	۷/۲	٤/۵	۷/٦	٤/۹	۲/۸	۵/۸
γ-elemene	۱٤۳۹	۳/۲	۲/٤	۲/٦	۲/۸	۱/٦	۵/۳
Caryophyllene oxide	۱۵۸۱	۳/٦	۲/۵	۲/۵	۲/۳	۲/۷	۵/۳
globulol	۱۵۸۷	۱/۲	۱/۸	۱/٤	۱/۱	۰/۹	۲/۸
alpha.-Curcumene	۱۵۰۰	۲/٦	۳/۷	٤/٤	۲/۷	۱/۹	۲/٤
citronellal	۱۱۵۲	۱/۱	۰/۹	۱/۰	۰/۸	۰/۸	۲/۵
Other compound		۳/۵	۲/۷	۲/۷	۱/٤	۳/۳	٤/۱
جمع کل		۹٦/٦	۹٦/۱	۹۵/۳	۹۵/٦	۹۵/۷	۹۳/۳

منابع

Abbas-zadeh, P., Savaghebi, G.R., Asadi-Rahmani, H., Rejali, F., Farahbakhsh, M. Motesharezadeh, B. and Omidvari, M. 2012. The effect of fluorescent pseudomonas on increasing the solubility of zinc compounds and improve its absorption by bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Soil Research, 26(2): 197-206. [In Farsi]

Abdelaziz, M.E., Pokluda, R. and Abdelwahab, M.M. 2007. Influence of compost, microorganisms and NPK fertilizer upon growth, chemical composition and essential oil production of *Rosmarinus officinalis* L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluy 35: 86-90.

Adams, R. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. 4 th edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA.

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24, 1-15.

Banchio, E., Bojino, P., Zygadlo, J. and Giordano, W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology, 36:766-771.

Chavallier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants, Dorling Kindersley. London. 1996: p. 227.

Dastborhan, S., Zehtab-Salmasi, S., Nasrollahzadeh, S. and Tavassoli, A.R. 2011. Effect of biofertilizers and different amounts of nitrogen on yield of flower and essential oil and nitrogen use efficiency of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27(2): 290-305. (In Persian with English Summary).

El-Ghadbane, E.A.E., Shalan, M.N. and Abdel-Latife, T.A.T. 2006. Influence of biofertilizers on growth, volatile oil yield and constituents of fennel (*Foeniculum vulgar* Mill.). Egyptian Journal of Agricultural Research, 84(3): 977-992.

Han, H., Supanjan, S. and Lee, K.D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant Soil Environ, 52(3): 130-136.

Jamshidi, A., Gholavand, A., Sefidkon, F. and Mohamadi Gholtape, A. 2012. The effect of nutrition systems on quantitative and qualitative characteristics of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under water deficit stress. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants, 28(2): 309-323. [In Farsi]

Jahanshahi, Sh., Baghreizadeh, M. and Abotalebi, A. 2013. Effect of vermi compost, azotobacter and barvar II on some quantitative and qualitative traits of coriander (*Coriandrum sativum* L.) medicinal plant. Journal of Crop Production Research, 4(4): 391-400. [In Farsi]

Kazemalilou, S. and Rasouli-Sedghiani, M.H. 2012. Effect of soil cadmium pollution on some physiological parameters of Hyoscyamus plant (Hyoscyamusniger) in presence/absence of growth-promoting microorganisms. Journal of Water and Soil Science, 22(4): 17-30.

Kaymak, H.C., Yarali, F., Guvence, I. and Donmeze, M.F. 2008. The effect of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. African Journal of Biotchnology, 7: 4479-4483.

Leithy, S., El-Meseiry, T.A. and Abdallah, E.F. 2006. Effect of biofertilizers, cell stabilizer and irrigation regime on rosemary oil yield and quality. Journal of Applied Sciences Research, 2: 773-779.

Mafakheri, S., Omidbaigi, R., Sefidkon, F. and Rejali, F. 2012. Effect of vermicompost, biophosphate and azotobacter on quantity and quality of essential oil of Dracocephalum moldavica L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27(4): 245-254. [In Farsi]

Sarcheshmeh poor, M., savaghebi, G.R., Siadat, H. and Alikhani, H. A. 2014. The effect of plant growth rhizobacteria on improvement of growth and nutrition of pistachio seedlings under drought stress. Iranian Journal of Soil Research, 27(1): 107-119. [In Farsi]

Sheikhi-Ghahfarokhi, F. 2014. Effect of seed biopriming by PGPR bacteria on germination indices, growth and yield of Calendula of ficinalis L. M.Sc. Thesis in Seed Science and Technology, Shahrekord University, 93 pp. [In Farsi]

Sparks, D.L. (1996). Methods of soil analysis (SSSA, ASA Publishing: Madison).

Vital, W.M., Teixeira, N.T., Shigihara, R. and Dias, A.F.M. 2002. Organic manuring with pig biosolids with application of foliar biofertilizers in the cultivation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Ecossistema, 27: 69-70.

Youssef, A.A., Edris, A.E. and Gomaa, A.M. 2004. A comparative Study between some plant growth regulators and certain growth hormones producing microorganisms on growth and essential oil composition of Salvia of *ficinalis* L. Plant Annals of Agricultural Science, 49: 299-311.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of plant growth promoting rhizobacteria on quantitative and qualitative yield of Lemon verbena (*Lippia citriodora* L.)

Jalali[*1], M., Zare[2], A.A

[1] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran
[2] Phd graduated in Department of Soil Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on chlorophyll content and quantitative and qualitative characteristics of Lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) The field experiment was conducted in a complete randomized block design with three replications Treatments consisted of five type of bacteria, consist of inoculation with *Pseudomonas putida* ،*Azospirillum* spp. ،*Azotobacter* sp. ،*Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp. and without inoculation (control). The results showed that the application of bacterial treatments increased the chlorophyll content (1.2 mg gFW^{-1}), essential oil yield and essential oil composition compared to the control. Significant increase was observed in chlorophyll content in *Azospirillum* spp. treatments compared to other treatments. Also, the most essential oil was belonged to *Bacillus* sp. (0.2 g kg^{-1}) and *Mycobacterium* sp. (0.4 g kg^{-1}) Treatments. The analysis revealed that citral, geranial and neral were the predominant compounds in the essential oil in all treatments. The highest and lowest total of these three compounds were in *Bacillus* sp (72.7%) and control treatment (51.1%) respectively. According to the results of this study, the use of bacterial treatments *Azospirillum* spp, *Bacillus* sp. and *Mycobacterium* sp. can increase the quantitative and qualitative yield of the plant, so, they are recommended for Lemon verbena plants.

Keywords: Bio-fertilizer, chlorophyll, Essential oil compounds, Essential oil yields

[*] Corresponding author, Email: jalali.mah@lu.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی اثر کاربرد مواد آلی (باگاس نیشکر و کود گاوی) بر فعالیت زیستی خاک در تناوب گندم- ذرت در خوزستان

ابراهیم جواهری[۱]،سید محمد هادی موسوی فضل[۱]

[۱] اعضای هیات علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

چکیده

حدود ۸۳/۳ درصد اراضی خوزستان دارای کربن آلی کمتر از یک درصد می باشد در حالی که حد مطلوب کربن آلی برای اراضی کشاورزی در دامنه ۳-۲ درصد تعیین شده است. به منظور بررسی تاثیر کاربرد ماده آلی (باگاس نیشکر و کود گاوی) بر فعالیت جمعیت میکربی خاک در تناوب گندم- ذرت، این آزمایش در ایستگاه تحقیقات کشاورزی شاوور به مدت ۲ سال اجرا شد. نتایج نشان دادند که با افزودن مواد آلی به خاک و فراهم شدن کربن و نیتروژن موردنیاز اولیه میکرو ارگانیزم های خاک ابتدا جمعیت میکروبی خاک افزایش یافت و متعاقب آن انواع ترشحات میکروبی از جمله آنزیم های اوره آز، فسفاتاز و... در خاک فزونی گرفت. مصرف کود اوره(۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) تنفس میکروبی خاک را افزایش داد و به بیش از $۱۰^{۶}$ سلول در هر گرم رساند. همچنین جمعیت قارچهای حل کننده فسفات که کمتر از جمعیت باکتری ها بود بعد از کشت گیاه حدود یک واحد لگاریتمی افزایش یافت. بطوریکه مصرف کود اوره بر اساس آزمون خاک بیشترین تنفس میکروبی را به همراه داشت. همچنین نتایج نشان داد که مهم‌ترین عامل کنترل کننده فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک‌های مورد آزمایش درصد کربن آلی خاک بود. دامنه فعالیت آنزیم اوره‌آز ۱۴۱/۹۹- ۴۰۶/۴ میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک، در دو ساعت انکوباسیون تعیین شد.

کلمات کلیدی: مواد آلی، نیتروژن، اوره آز،گندم، ذرت

مقدمه

براساس آمارهای موجود در بیش از ۶۰/۶ درصد اراضی کشاورزی کشور میزان کربن آلی خاک کمتر از یک در صد می‌باشد. در حالی که حد مطلوب کربن آلی خاک برای دستیابی به تولید پایدار بایستی ۳-۲ درصد باشد. مقدار کربن آلی در ۲۱/۵ درصد از خاک‌های کشور کمتر از ۰/۵ درصد، ۳۹/۱ درصد بین ۰/۵ تا ۱ درصد، ۲۵/۳ درصد خاک‌ها بین ۱تا ۱/۵ درصد و ۱۴/۲ بیش از ۱/۵ درصد می‌باشد (شکل ۱). به عبارتی میزان کربن آلی ۶۰/۶ درصد خاک‌های کشور کمتر از یک درصد بوده که حکایت از ناپایداری حاصلخیزی خاک‌های کشور می‌نماید. توزیع استانی خاک‌های با درصد مواد آلی کمتر از یک درصد هشدار دهنده بوده و میزان آن در استان خوزستان به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد. منابع کودهای آلی در خورستان از تنوع زیادی برخوردار هستند اما بیشترین نوع مواد آلی که کشاورزان مورد استفاده قرار می دهند شامل انواع کودهای دامی از قبیل گاوی، گوسفندی، مرغی و بقایای کشاورزی است. هریک از این ترکیبات آلی با توجه به خصوصیات شیمیایی خود در کشت های معینی استفاده می شوند. بیشترین تفاوت این قبیل کودها در میزان عناصر غذایی و سرعت آزاد نمودن آن(معدنی شدن) می باشد. طبق سند چشم انداز، وزارت جهادکشاورزی موظف است میزان ماده آلی خاک را تا ۱٪ افزایش دهد. دستیابی به مدیریت بهینه مواد آلی با شناخت راهکارهای کاربردی جهت افزایش حاصلخیزی خاک و مصرف بهینه کودهای شیمیایی میسر خواهد بود. با توجه به این که ماده آلی قلب کشاورزی پایدار تلقی می‌شود ضرورت افزایش تدریجی میزان مواد آلی خاک بیش از پیش احساس می‌شود. . این آزمایش به منظور بررسی تاثیر کاربرد مواد آلی بر جمعیت میکروبی خاک در اراضی خوزستان و تاثیر آن بر برخی از خصوصیات بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی و نیز عملکرد گندم و ذرت در یک تناوب دوساله در ایستگاه تحقیقات کشاورزی شاوور خوزستان اجرا گردید. جدول ۱ و ۲ به ترتیب برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فعالیت تنفسی خاک پیش و پس از انجام آزمایش را نشان می دهد.

جدول ۱ برخی خصوصیات فیزیکی وشیمیایی خاک محل آزمایش

محل اجرا خوزستان شاوور	pH	EC ds m^{-1}	کربن آلی g kg^{-1}	کربنات کلسیم معادل g kg^{-1}	رطوبت اشباع ٪	فسفر قابل استفاده mg kg^{-1}	پتاسیم قابل استفاده mg kg^{-1}
	۷/۹	۱/۳	۸/۶	۳۸۸	۶۸	۴/۴	۲۷۹
آهن قابل استفاده	منگنز قابل استفاده	روی قابل استفاده	مس قابل استفاده	رس g kg^{-1}	سیلت g kg^{-1}	شن g kg^{-1}	بافت
۹/۴	۴/۰	۱/۲	۱/۳	۵۶۰	۳۸۰	۶۰	رسی

مواد و روش‌ها

آزمایش با استفاده از طرح بلوک های کامل تصادفی به شکل کرت های یکبار خرد شده به شرح زیر اجرا شد:
الف - مصرف کود آلی (فاکتور M): M0- عدم مصرف کود آلی، M1- مصرف ۱۰ تن در هکتار ماده خشک کود آلی نوع اول، M2- مصرف ۲۰تن در هکتار ماده خشک کود آلی نوع اول، M3- مصرف ۱۰ تن در هکتار ماده خشک کود آلی نوع دوم، M4- مصرف ۲۰ تن در هکتار ماده خشک کود آلی نوع دوم. ب – مصرف کود شیمیایی، P0- عدم مصرف کود شیمیایی، P1- مصرف ۱۰۰ درصد کود شیمیایی براساس آزمون خاک P2- مصرف ۷۵ درصد کود شیمیایی بر اساس آزمون خاک، P3- مصرف ۵۰ درصد کود شیمیایی براساس آزمون خاک. توصیه کود نیتروژن بر اساس آزمون خاک صورت گرفت. میزان فسفر و پتاسیم مورد نیاز پس از محاسبه ، برای هر تیمار قبل از کشت به طور یکنواخت با خاک هر کرت مخلوط شد. پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم ، فسفر از منبع سوپرفسفات تریپل و نیتروژن از منبع کود اوره تأمین شد. مقدار کودهای آلی بر مبنای وزن خشک محاسبه و در تیمارهای مختلف اعمال گردید. در زراعت گندم یک سوم نیتروژن مورد نیاز از منبع کود اوره قبل از کشت، یک سوم زمان پنجه زنی و یک سوم باقیمانده در زمان ساقه رفتن مصرف گردید. ابعاد کرت ها ۴ متر عرض و ۵ متر طول در نظر گرفته شد.. عملکرد کاه، دانه و وزن هزار دانه در هر تیمار اندازه‌گیری شد. بعد از برداشت گندم باقی مانده بقایای آن به خاک برگردانده و سپس زمین برای کشت ذرت آماده گردید. نتایج به دست آمده پس از تطابق خصوصیات خاک با سری های مشابه در کشت متناظر ایستگاه تحقیقاتی، قابل تعمیم به سطح بیشتری از اراضی زراعی گردید. همچنین جهت بررسی تجزیه کودهای آلی مصرفی در خاک میزان کربن آلی در پایان دو سال آزمایش اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش با استفاده از نرم افزارهای آماری مناسب از قبیل SAS و MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار داده شدند.

جدول۲میانگین اثر مصرف کودهای آلی بر تنفس میکروبی

تنفس میکروبی	قبل از کاشت	بعد از کاشت
کود دامی	۷/۲۶۵^{b}	۱۷/۹۳^{ab}
کمپوست	۷/۰۵۱^{b}	۱۷/۳^{ab}
بدون مصرف(شاهد)	۵/۵۵^{a}	۱۳/۸۸۸^{a}

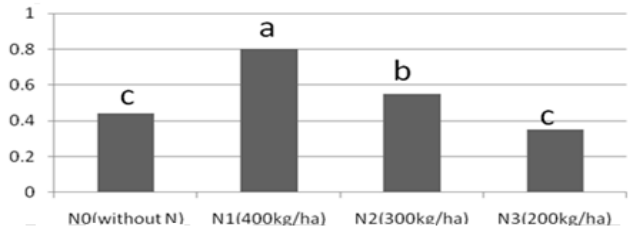
میانگین ها با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار می باشند

جدول ۳ برخی خصوصیات شیمیایی کودهای آلی مصرفی در محل اجرای پروژه

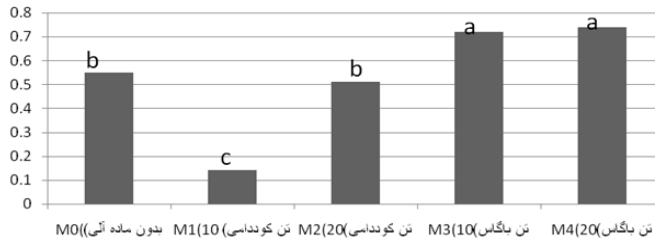
نوع کود آلی	pH*	EC*	کربن آلی	نیتروژن کل	C:N	فسفر کل	پتاسیم کل	افت در ۴۰۰ درجه
کود گاوی	۸/۳	۲۵/۶	۴۳/۳	۱/۹	۲۲/۷	۰/۳۳	۴/۴	۸۱/۳
کمپوست باگاس نیشکر	۶/۹	۱/۶	۵۱/۰	۰/۳۸	۱۳۴	۰/۰۶	۰/۳۲	۸۲/۱
	نیترات	آمونیوم	آهن کل	منگنز کل	روی کل	مس کل	کادمیوم کل	سرب کل
کود گاوی	۴۴۶	۲۱۰	۴۰۲۵	۱۴۶	۸۰	۲۷	۰/۸۶	۳۶
کمپوست باگاس نیشکر	۰	۲۰۰	۳۷۴۳	۱۰۳	۲۱	۱۶	۱/۵	۹

نتایج و بحث

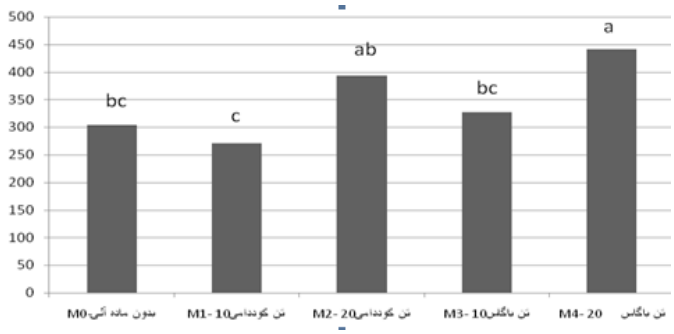
با افزایش مواد آلی به خاک و فراهم شدن کربن و نیتروژن مورد نیاز اولیه میکرو ارگانیزم های خاک، جمعیت میکروبی خاک افزایش یافت و متعاقب آن انواع ترشحات میکروبی از جمله آنزیم های اوره آز، فسفاتاز و... در خاک فزونی گرفت. این تغییرات بیولوژیک ضمن فراهمی عناصر غذائی برای جذب گیاه، موجب معدنی شدن ماده آلی و آزاد شدن عناصر غذائی و تشکیل ترکیبات هوموسی در خاکدانه سازی و بهبود خصوصیات فیزیکی گردید. مصرف کود اوره تنفس میکروبی خاک را افزایش داد، بطوریکه تیمار کود اوره بر اساس آزمون خاک (۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) بیشترین تنفس میکروبی را به همراه داشت و در واقع با رفع کمبود نیتروژن خاک، میزان تنفس میکروبی به همان نسبت افزایش یافت. هرچه میزان کربن آلی در کود آلی بیشتر باشد ، میکروب ها از آن به عنوان منبع کربن در ساختار بدن خود استفاده نموده و با فراهم کردن نیتروژن به میزان متناسب با کربن آلی، جمعیت میکروبی نیز افزایش خواهد یافت. در این رابطه یکی از منابعی که سبب افزایش بیشتر جمعیت میکروبی شد باگاس نیشکر بود، زیرا این ترکیب آلی دارای کربن با دارا بودن میزان کربن بالا، هنگامی که نیتروژن در حد کافی به خاک داده شد (بر اساس آزمون خاک) میکروب ها به بالا ترین میزان جمعیت خود دست یافتند. کود دامی که دارای میزان کربن کمتری است تاثیر کمتری در افزایش جمعیت میکروبی داشت. نوربخش (۱۳۸۳) طی تحقیقات خود نشان داد که نوع و کیفیت مواد آلی در میزان سوبسترا که منبع کربن و انرژی برای فعالیت میکروبی است تاثیر گذار می‌باشد. همبستگی بین ماده آلی و نیتروژن تأثیر بسیار معنی داری در تنفس میکروبی خاک به همراه داشت. بطورکلی با افزایش مصرف مواد آلی در خاک میزان نیتروژن قابل استفاده در خاک افزایش یافت و افزایش این دو عامل با یکدیگر تأثیر بسیار معنی در روند تنفس میکروبی و تجزیه مواد آلی داشتند. مقایسه میانگین اثر کود های دامی بر زیست توده میکروبی نشان داد که زیست توده میکروبی در مرحله بعد از کشت ذرت نسبت به مرحله قبل از کشت روند افزایشی داشت. در آزمایش بیومس میکروبی بیشترین شاخص برای تیمار ۲۰ تن کود باگاس به همراه ۷۵٪ کود اوره (۳۰۰ کیلوگرم در هکتار) و کمترین برای تیمار بدون مصرف ماده آلی و نیتروژن ۵۰٪ (۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) بود. در تنفس میکروبی بیشترین شاخص برای تیمار بدون مصرف کود شیمیایی و مصرف ۲۰ تن کود دامی و در مورد کمترین، برای تیمار ۵۰٪ کود اوره (۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) و ۲۰ تن باگاس نیشکر اندازه گیری شد. مقایسه میانگین سطوح مختلف مواد آلی نشان داد که تیمار M4 (۲۰ تن کود باگاس نیشکر) بیشترین و تیمار M1(۱۰ تن کود دامی در هکتار) کمترین میزان فعالیت آنزیم اوره آز را به خود اختصاص دادند، البته مصرف ۲۰تن کود دامی و باگاس تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشته و در یک سطح آماری قرار گرفتند. همچنین بین شاهد بدون ماده آلی، ۱۰تن کود دامی و ۱۰تن باگاس نیز تفاوت معنی دار مشاهده نشد. به عبارت دیگر مصرف ۱۰تن ماده آلی از منبع کود دامی یا باگاس تاثیر معنی داری بر فعالیت انزیم اوره آز نداشته در حالیکه مصرف ۲۰تن آنها باعث افزایش معنی دار فعالیت آوره آز گردید و در این خصوص اثر کمپوست باگاس نیشکر اندکی بهتر از کود دامی ظاهر شد (شکل ۱و ۳). محاسبه عملکرد بر اساس مقایسه اختلاف عملکرد تیمار کودی آزمون خاک (N0) و تیمار کاهش مصرف نیتروژن به میزان ۲۵ درصد کمتر از آزمون خاک به همراه مصرف توام (N0) ۱۰ و ۲۰ تن کود الی (از منابع کمپوست باگاس نیشکر و کود گاوی) انجام شد(شکل ۲). بر این اساس با کاهش مصرف ۲۵ درصد از نیتروژن توصیه شده در آزمون خاک و مصرف ۱۰ تن کود آلی (از منبع کود گاوی) در سال اول افزایش عملکرد گندم حداقل به میزان ۵ درصد حاصل شد(جدول ۳). در حالی که این تیمار موجب کاهش عملکرد ذرت در سال اول گردید. این روند در سال دوم معکوس و موجب کاهش عملکرد گندم و افزایش ذرت شد. جدول ۲ برخی خصوصیات شیمیایی کودهای آلی استفاده شده در آزمایش را نشان می دهد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر کود شیمیایی اوره بر تنفس میکروبی خاک mg CO2/gr Soil



شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف مواد آلی بر تنفس میکروبی خاک mg CO2/gr Soil



شکل۳- مقایسه میانگین اثر سطوح موادآلی بر فعالیت آنزیم اوره آز خاک($\mu g\ NH_4N ml^{-5} dwt\ 2\ h^{-1}$)

جدول ۴ متوسط اختلاف عملکرد محصول ناشی از مصرف کود آلی به تنهایی و کاربرد توام کود آلی و نیتروژن

اثر کود	مقدار کود آلی تن در هکتار	گندم سال ۹۱	ذرت سال ۹۲	گندم سال ۹۲	ذرت سال ۹۳
نیتروژن+ کود آلی	۱۰	+۳۴۰	−۱۵۷۱	−۴۲	+۱۷۹۰
	۲۰	+۵۳۰	−۶۰۸	+۱۸۵	+۳۴۳۰
متوسط کود آلی به تنهایی	۱۰	+۱۸۰	+۵۰۵	+۲۲۳	+۲۲۷۷
	۲۰	+۴۷۰	+۳۷۰۳	+۷۶۱	+۵۶۹۶

جدول ۵ وسعت مناطق قابل تعمیم نتایج طرح به دشت منطقه مورد مطالعه

	ایستگاه مورد مطالعه	مناطق تحت پوشش ایستگاه	وسعت مناطق تحت پوشش	وسعت مناطق قابل تعمیم هکتار	وسعت مناطق قابل تعمیم درصد
منطقه خوزستان	شاوور	دشت شاوور	۱۶۹۶۰۰	۳۱۲۷۸	۱۸/۴۴
	ایستگاه تحقیقات کشاورزی شاوور	دشت شاوور	سری خاک مشابه با مناطق مورد آزمایش		سید عباس، عبدل خان ، شیخ حسین، شیخ معبود، رسن، بربوتی و سعد، شیخ داخل و کاظم احمد

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج نشان دادند که مهم‌ترین عامل کنترل کننده فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک‌های مورد آزمایش درصد کربن آلی خاک بود. دامنه فعالیت آنزیم اوره‌آز برای خاک‌های مورد بررسی ۱۴۱/۹۹- ۴۰۶/۴ میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک، در دو ساعت انکوباسیون تعیین شد. مصرف توام کودهای آلی و شیمیایی (۲۵ درصد کمتر از آزمون خاک) در تناوب گندم- ذرت دارای اثر مثبت در افزایش عملکرد بود. از این روند می توان چنین استنباط کرد که که احتمالا باقیمانده کودهای آلی پس از برداشت گندم و ذرت معدنی شده و می تواند موجب افزایش عملکرد شود. همچنین مصرف ۲۰ تن ماده آلی دارای برتری نسبی به نسبت ۱۰ تن است. با توجه به تفاوت کودهای آلی از نظر رسیدگی، هر چه کود تازه تر باشد درجه رسیدگی آن کمتر و بر عکس هر کود پوسیده تر باشد درجه رسیدگی آن بیشتر است. بر این اساس با مصرف توام کود آلی (از منبع کمپوست باگاس نیشکر و یا کود پوسیده گاوی به میزان ۱۰ تا ۲۰ تن در هکتار) می توان تا ۲۵ درصد در مصرف کود شیمیایی نیتروژن بدون کاهش عملکرد استفاده نمود. دستیابی به افزایش عملکرد از ۵ تا ۲۰ درصد برای گندم و از ۵ تا ۱۰ درصد برای ذرت در تیمار مصرف کود شیمیائی نیتروژن به میزان ۲۵ درصد کمتر از میزان توصیه شده بر اساس آزمون خاک بهمراه کود آلی به میزان حد اقل ۱۰ تن در هکتار از دیگر نتایج این آزمایش بود. بنابراین اگر در اراضی تحت کشت گندم و ذرت(با متوسط تولید ۵۵۰۰ و ۷۵۰۰ کیلوگرم در هکتار) فقط ۱۰ درصد افزایش عملکرد حاصل شود، در گندم حدود ۵۵۰ کیلوگرم و در ذرت دانه ای ۷۵۰ کیلوگرم در هکتار خواهد شد. بهبود ویژگی‌های فیزیکی خاک شامل بهبود وضعیت خاکدانه سازی به میزان ۴۰-۳۰ درصد، افزایش آب قابل استفاده گیاه به میزان ۱۰-۵ درصد ناشی از مصرف کودهای آلی. بهبود ویژگی‌های شیمیائی خاک توسط گیاه به میزان ۴۰-۱۰ درصد و تعیین میزان تقریبی هدر رفت کربن آلی از منابع آلی مختلف به میزان ۹۰-۷ در صد در خلال دو سال آزمایش از دیگر نتایج این پژوهش بود. با توجه به درجه پوسیدگی منابع کودهای آلی(کود حیوانی تازه –کمپوست کاملا پوسیده) مورد استفاده و تفاوت در نسبت C/N آنها، اثر کودهای با درجه پوسیدگی کمتر در تامین نیتروژن مورد نیاز گیاه بیشتر بود. این نتایج قابل تعمیم به سری های متناظر با سری خاک محل اجرای آزمایش است(جدول۲و۵).

منابع

خاوازی، کاظم و همکاران.۱۳۹۳- برنامه جامع حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه ۱۴۰۴-۱۳۹۳. جلد اول- موسسه تحقیقات خاک و آب.

دهقانمنش، ح، بهمنیار، م، لکزیان، الف، سالک گیلانی، س، قنبری، ه، ۱۳۹۰، اثرات اصلاح کننده های مختلف آلی بر بیوماس میکروبی و فعالیت آنزیم اوره آز خاک تحت کشت گیاه دارویی ریحان (Ocimumbasilicum). دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران تبریز،۱۲ الی ۱۴.

طهرانی، محمد مهدی.۱۳۹۳. برنامه جامع حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه ۱۴۰۴-۱۳۹۳. جلد دوم- موسسه تحقیقات خاک و آب.

محمدی،خ و سهرابی،ی.۱۳۹۲.تاثیر روشهای تلفیقی کود دهی بر غلظت نیتروژن،فسفر و خواص زیستی خاک وصفات کلزا. / ۱۳۹۳ مجله پژوهشهای خاک) علوم خاک و آب / (الف / جلد / ۲۸ شماره

سماوات. س. ۱۳۷۵. *بررسی پتانسیل معدنی شدن ازت آلی در شرایط* . خلاصه مقالات پنجمین کنگره علوم خاک ایران، کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، آموزشکده کشاورزی کرج، انجمن علوم خاک ایران، ۱۳۷۵. ص ۹۶.

سماوات، س . ۱۳۸۳. خلاصه مقالات اولین همایش علمی-کاربردی مدیریت بقایای گیاهی با تاکید بر نقش تخریبی سوزاندن-دفتر محیط زیست وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران.

نوربخش، ف، ۱۳۸۳، بررسی سینیتیک تجزیه بقایای گیاهی جو در خاک در شرایط آزمایشگاه. مجله پژوهش در علوم کشاورزی ۱- ۷۷- ۶۹.

Ebrahim, M. A. Ul-Hassan, M. Iqbal, and E. Elahi Valeem. 2008. Response of wheat growth and yield to various levels of compost and organic manure. Pak. J Bot. 40(5): 2135-2141

Feichtinger F., Erhart E., Hartl W. (2004): Net N-mineralisation related to soil organic matter pools. Plant Soil Environ., 50: 273-276.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizer

Effect of used organic fertilizers on biological activities of soil under the corn-wheat crop rotation in Khuozesfan province

Javaheri[1], E., Mousavifazl[1], S.M.H. Samavat, S.[2]

[1,2,3] Scientific members and expert (respectively) of Soil and Water Research Department of Khouzestan Agricultural and Natural Resources Research and Extensions Center, ARREO, Iran

Abstract

The possibility of replacing at least 25 percent of the fertilizer nitrogen with organic fertilizer without compromising crop yields. To achieve the enhancement of yield in different areas, ranging from 5 to 20 percent for wheat and from 5 to 10 percent for corn in treatment of chemical fertilizers by as much as 25% less than the recommended amount based on soil test with organic fertilizers at a rate of at least 10 tons per hectare. Thus, if just 10 percent increases in irrigated fields of wheat and corn, the resulting performance is equivalent to 550 kg per ha in wheat and 750 kg per hectare for maize. Improving soil physical properties, like soil aggregate stability up to 40-30%, increasing available water content in soil at a rate of 5-10 percent due to the use of organic fertilizers in all experimental areas. Accordingly, the accounting for 5-10 percent savings in annual water consumption in wheat-corn rotation, nearly 2000-1000 cubic meters of water per ha Will have been saved.

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های سیلیکاتی از ریزوسفر توتون (*Nicotiana tabacum* L.) و بررسی کارایی آن‌ها در فراهمی پتاسیم خاک

رحمت‌اله رنجبر[1*]، ابراهیم سپهر[2]، عباس صمدی[3]، میرحسن رسولی صدقیانی[3]، محسن برین[4]، بهنام دولتی[4]

[1] محقق خاک و آب اداره امور تحقیقاتی شرکت دخانیات ایران، تهران

[2] دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[3] استاد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[4] استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

برخی از ریزجانداران خاک توانایی انحلال کانی‌های حاوی پتاسیم و آزادسازی پتاسیم آن را دارند. این مطالعه به منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (KSBs) از خاک ریزوسفر توتون و بررسی تاثیر آن‌ها بر آزادسازی پتاسیم از خاک انجام شد. نمونه‌های خاک از ریزوسفر توتون رقم بارلی۲۱ در مرحله گلدهی بوته برداشت شد. با استفاده از محیط‌کشت جامد الکساندروف، ۹ جدایه KSB جداسازی و خالص‌سازی شدند. سپس ارزیابی‌های کیفی (شاخص حلالیت) و کمی (آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار) به ترتیب در محیط‌کشت جامد و مایع الکساندروف و بررسی تاثیر جدایه‌های KSBs بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. بیشترین شاخص حلالیت در اثر فعالیت جدایه‌های باکتری KSB22، KSB42 و KSB10 به ترتیب ۲/۸، ۲/۷ و ۲/۵ در محیط‌کشت جامد الکساندروف به دست آمد و بیشترین مقدار پتاسیم محیط‌کشت مایع الکساندروف با مقدار ۹/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تلقیح جدایه‌های باکتری KSB42 و KSB10 بود که مقدار آن نسبت به شاهد (محیط‌کشت بدون تلقیح)، سه برابر افزایش یافت. جدایه‌های KSB42 و KSB10 در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار و خاک کاراتر بودند به طوری که مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در تلقیح با این جدایه‌ها در مقایسه با شاهد، حدود ۲۹ درصد افزایش یافت. این تحقیق نشان داد که از برخی باکتری‌های ریزوسفر توتون را می‌توان در متحرک نمودن منابع نامحلول پتاسیم خاک استفاده کرده و بخشی از نیاز گیاه توتون را که یک گیاه پرنیاز نسبت به پتاسیم است، تامین نمود.

کلمات کلیدی: محیط‌کشت، شاخص حلالیت، پتاسیم، کانی سیلیکاتی

مقدمه

تنها یک تا دو درصد پتاسیم خاک برای گیاهان قابل‌جذب است (Malinovskaya، ۱۹۹۰) و بقیه به شکل غیرقابل استفاده گیاه در ساختمان کانی‌ها وجود دارد. به نظر می‌رسد تبدیل شکل غیرتبادلی و ساختمانی پتاسیم خاک به شکل قابل دسترس آن اقتصادی باشد تا گیاه بتواند از منبع بومی پتاسیم استفاده کند (Nihala، ۲۰۱۷). توانایی برخی از ریزجانداران خاک در حل نمودن کانی‌های سیلیکاتی پتاسیم‌دار و آزادسازی پتاسیم یک موضوع مهم در افزایش عملکرد گیاهان پرنیاز به پتاسیم است. بسیاری از ریزجانداران خاک با ترشح اسیدهای آلی و پلی‌ساکاریدها سبب انحلال مستقیم کانی‌های پتاسیم‌دار از جمله میکاها، ایلایت و ارتوکلاز می‌شوند و یا با کلاته نمودن یون‌های سیلیکون، سبب آزاد شدن پتاسیم خاک می‌شوند (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). در نتیجه، فراهمی آن را برای جذب گیاهان بهبود می‌بخشند (Parmar و Sindhu، ۲۰۱۳).

برخی باکتری‌های ساپروفیتی از جمله سودوموناس[1] و جدایه‌های قارچ از جمله آسپرژیلوس[2] توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های خاک را دارند (Nihala، ۲۰۱۷). در سال‌های اخیر، باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (KSB[3]) در تولید کودهای بیولوژیک به کار رفته‌اند. در

* ایمیل نویسنده مسئول: ranjbarrahim14@gmail.com

[1] *Pseudomonas* sp.

[2] *Aspergillus* spp.

[3] Potassium solubilizing bacteria (KSB

تحقیق ژانگ و کانگ، چهار جدایه GL7، JM3، XF4 و XF11 به عنوان باکتری حل‌کننده پتاسیم جداسازی شدند که ماده خشک و جذب پتاسیم نشاء توتون در تلقیح با تمام جدایه‌ها بخصوص جدایه XF11 به طور معنی‌دار افزایش یافت (Zang و Kong، ۲۰۱۴). در سال ۲۰۱۴، Subhashini نشان داد که جدایه باکتری فراتوریا آئورانتیا[1]قادر به افزایش کارایی جذب پتاسیم توسط گیاه توتون بوده و مقدار پتاسیم برگ توتون را حدود ۳۹ درصد افزایش داد. اشرفی سعیدلو و رسولی صدقیانی نشان دادند که پتاسیم محلول خاک با تلقیح جدایه KSB1 باکتری باسیلوس[2]و جدایه KSF3 قارچ آسپرژیلوس نیگر[3]حل‌کننده سیلیکات به ترتیب ۹۲/۳ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت و قارچ نقش بیش‌تری را در کاهش pH خاک داشت (اشرفی‌سعیدلو و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۶). Sarikhani و همکاران (2017) نشان دادند که جدایه باکتری S14-3 متعلق به جنس سودوموناس، بیشترین تاثیر را در آزادسازی پتاسیم (۳/۲۳mg g-1) از محیط‌کشت داشت. بنابراین، حل کردن زیستی[4]عناصر معدنی خاک بخش مهمی از راه‌کارهای مدیریت تلفیقی عناصر غذایی[5]است (Adesemoye و همکاران، ۲۰۰۸). مصرف کود پتاسیمی را می‌توان با تلقیح زیستی ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم کاهش داد که کم‌هزینه و دوست‌دار اکوسیستم[6]نیز است (Subhashini، ۲۰۱۳). توتون (Nicotiana tabacum L.) از محصولات مهم صنعتی و اقتصادی دنیا می‌باشد (Subhashini و همکاران، ۲۰۱۶) و به عنوان گیاه پرنیاز پتاسیم، این عنصر را بیش از سایر عناصر غذایی جذب می‌کند (Richmond و همکاران، ۲۰۱۶). کیفیت و به‌سوزی برگ توتون در صنعت دخانیات مهم‌ترین فاکتور کیفی است که وجود ۲/۵ تا ۴ درصد پتاسیم در وزن خشک برگ توتون در بهبود آن‌ها نقش مهمی دارد. به طوری که در کشورهای تولیدکننده عمده توتون، مقدار زیادی کود پتاسیمی در مزارع توتون با هدف تامین نیاز گیاه و حفظ پتاسیم خاک در سطح بالا مصرف می‌شود (Subhashini، ۲۰۱۳، Vann و همکاران، ۲۰۱۲). در حالی‌که، هزینه کودهای شیمیایی و خطرات زیست‌محیطی آن‌ها بالا بوده و راندمان مصرف آنها پایین است. از طرفی، برگ توتون به عنوان محصول اقتصادی توتون بوده و مصرف بیش از حد آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی سبب کاهش کیفیت و پتانسیل صادرات آن می‌شود که ضرورت استفاده از راه‌های جایگزین از جمله استفاده از ریزجانداران حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار را ایجاب می‌کند. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف جداسازی ریزجاندارن از ریزوسفر توتون و بررسی توانایی آن‌ها در حل نمودن کانی‌های سیلیکاتی پتاسیم‌دار و افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه خاک: تعداد ۲۵ نمونه خاک از ریزوسفر توتون منطقه شمال غرب ایران تهیه شده و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آماده‌سازی کانی‌های میکایی: کانی‌های خالص میکای ایلایت و فلدسپار از گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه و آسیاب شدند. مقدار پتاسیم قابل جذب موجود در پودر کانی‌ها (با قطر کمتر از ۶۰ میکرون) با استفاده از عصاره‌گیر یک مولار کلریدکلسیم و اسیدکلریدریک ۰/۰۱ مولار اندازه‌گیری شد و دو گرم از آن به هر لیتر محیط‌کشت جامد و مایع الکساندروف اضافه شد (اشرفی‌سعیدلو و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۶).

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از ریزوسفر: جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از نمونه‌های خاک پس از تهیه سری‌های رقت در محیط‌کشت اختصاصی جامد الکساندروف (Hu و همکاران، ۲۰۰۶) حاوی دو گرم مخلوط رس‌های ایلایت و فلدسپار در هر لیتر محیط‌کشت انجام شد. سوسپانسیون ۱:۱۰ خاک به آب داخل ارلن تهیه شد و داخل یک انکوباتور دارای شیکر دورانی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شدند. در لوله‌های آزمایش، رقت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ خاک به آب نیز تهیه شد. مقدار پنج میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده به محیط کشت جامد الکساندورف اضافه شد و به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شد.

---

[1] *Frateuria aurantia*
[2] *Bacillus* sp.
[3] *Aspergilus niger*
[4] Bio-dissolution
[5] Integrated nutrient management, INM
[6] Eco-friendly

کلونی‌های دارای هاله شفاف، جداسازی شده و برای خالص‌سازی، چند بار روی نوترینت آگار بصورت خطی کشت داده و بعد از بدست آوردن جدایه خالص، جدایه مذبور دوباره روی محیط کشت الکساندروف جامد به صورت نقطه‌ای و خطی بازکشت شد و از طریق خالص‌سازی، نه جدایه به دست آمده در اسلنت کشت و پس از انکوباسیون، این کلونی‌ها جهت بررسی برخی ویژگی‌ها و ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌ها، در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌های باکتری: به منظور بررسی کیفی و کمی جدایه‌ها، ۲۵ میلی‌لیتر از محیط‌کشت نوترینت براث به داخل هر کدام از نه ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و استریل شد. محیط‌کشت داخل ارلن‌ها با هر کدام از جدایه‌های خالص‌سازی شده باکتریایی تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر دورانی تکان داده شدند. سپس برای غربالگری جدایه‌های برتر باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات، از محیط‌کشت الکساندروف جامد (ارزیابی کیفی) و مایع (ارزیابی کمی) استفاده گردید (Hu و همکاران، ۲۰۰۶). نه جدایه باکتری در محیط‌کشت استریل الکساندروف در سه تکرار به صورت نقطه‌ای و مجزا کشت شدند و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز انکوباسیون شدند و در پایان دوره انکوباسیون، شاخص حلالیت[1] برای جدایه‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (ابراهیمی کریم آباد، ۱۳۹۶).

$$\text{شاخص انحلال} = \frac{\text{قطر کلونی + قطر هاله}}{\text{قطر کلونی}} \qquad \text{(رابطه 1)}$$

قطر کلونی و هاله شفاف بر حسب میلی‌متر است. هشت جدایه باکتری از بین نه جدایه که توانایی انحلال بالایی در محیط جامد در ارزیابی کیفی نشان داده بودند برای ارزیابی کمی انتخاب شدند و جدایه باکتری KSB70 به دلیل داشتن کمترین شاخص حلالیت (۱/۳)، مورد ارزیابی کمی قرار نگرفت. در ارزیابی کمی باکتری‌ها، یک میلی‌لیتر از محیط‌کشت نوترینت براث حاوی جدایه باکتری (کشت شبانه) به داخل ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع الکساندروف حاوی کانی‌های پتاسیم‌دار (دو گرم بر لیتر مخلوط کانی‌های رسی ایلایت و فلدسپار) در سه تکرار و به طور مجزا کشت شدند و هم‌زمان یک نمونه شاهد نیز در نظر گرفته شد و در آن یک میلی‌لیتر محیط‌کشت نوترینت براث استریل استفاده شد. نمونه‌ها در ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر دورانی به مدت ۱۰ روز و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شدند. پس از پایان مدت ۱۰ روز، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت برداشته شد و پس از سانتریفیوژ و صاف کردن، میزان پتاسیم آزاد شده در محیط‌کشت مایع با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد (Sugumaran و Janarthanam، ۲۰۰۷). جدایه‌های با شاخص انحلال بالا و توانایی بالا در آزادسازی پتاسیم محیط‌کشت به عنوان جدایه‌های کارا انتخاب شدند (Hu و همکاران، ۲۰۰۶).

ارزیابی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

تست هیدرولیز نشاسته: برای این کار محیط‌کشت نوترینت آگار حاوی ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب تهیه و استریل شد. جدایه‌های باکتری روی محیط‌کشت داخل پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای کشت شدند. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محلول لوگول جهت نمایان نمودن نشاسته در محیط‌کشت داخل پلیت‌ها، اضافه شد که وجود هاله زرد در زمینه آبی نشان دهنده فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتری است (خوشرو و همکاران، ۱۳۹۳).

تست قندها (گلوکز و ساکارز): دو محیط‌کشت مجزا از مایع پپتون تهیه شد که یکی حاوی ۱٪ گلوکز و دیگری حاوی ۱٪ ساکارز بود. محیط‌کشت پپتون داخل لوله‌های آزمایش پس از استریل با جدایه باکتری معین تلقیح شد و پس از سه روز انکوباسیون، در صورت مصرف قند مورد نظر توسط باکتری، محیط کشت اسیدی شده و در نتیجه به رنگ زرد نمایان می‌شود (خوشرو و همکاران، ۱۳۹۳).

تست فلورسنتی: محیط‌کشت King B استریل شده داخل پلیت‌ها با جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای کشت شد. پس از ۷۲ ساعت، خاصیت فلورسنتی باکتری‌ها در زیر نور فرابنفش با مشاهده نور رنگ سبز- آبی مشخص شد (خوشرو و همکاران، ۱۳۹۳).

تست رنگ‌آمیزی: گسترده مناسبی از باکتری روی لام ایجاد و تثبیت شد. لام دارای باکتری ابتدا با محلول کریستال ویوله و سپس با محلول ید به مدت یک دقیقه پوشانده شد. گسترده باکتری روی لام به آرامی با الکل شستشو داده شد و سپس با سافرانین به مدت ۴۵ ثانیه پوشانده

[1] Solubility index

شده و پس از هر مرحله با آب شستشو شد. لام‌ها بعد از هواخشک شدن، برای بررسی میکروسکوپی آماده شد (Deaker و همکاران، ۲۰۰۱ و خوشرو و همکاران، ۱۳۹۳۲).

آزمایش انکوباسیون برای ارزیابی توانایی جدایه‌های باکتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک

برای ارزیابی توانایی و کارایی جدایه‌های کارآمد باکتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک، هشت جدایه باکتری همراه با شاهد (بدون تلقیح KSB) مورد مقایسه قرار گرفتند. برای این منظور، یک نمونه خاک رسی (رس ۳۹٪) با مقدار پتاسیم قابل جذب پایین (۱۵۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) انتخاب شد و سایر خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن اندازه‌گیری گردید. مایه تلقیح هر جدایه باکتری (حاوی 10^8 سلول در یک میلی‌لیتر مایه تلقیح) به طور مجزا تهیه شد. مقدار آب مورد نیاز برای تامین ۷۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی نمونه ۳۰ گرمی خاک محاسبه شد و یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح جدایه باکتری به آب اضافه گردید و همراه با آب به نمونه خاک استریل اضافه شد و در شاهد نیز این کار با مصرف یک میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت‌براث انجام شد. نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۵ درصد ظرفیت زراعی خاک و به مدت ۹۰ روز انکوباسیون شدند. پس از ۹۰ روز انکوباسیون، مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک با استات آمونیوم یک مولار در pH=7 (Malinovskaya، ۱۹۹۰) عصاره‌گیری و اندازه‌گیری شد (اشرفی‌سعیدلو و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۶).

آنالیز داده‌ها: تجزیه واریانس مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌های حاوی پتاسیم و شاخص حلالیت در محیط‌کشت مایع و جامد الکساندروف و مقدار پتاسیم آزاد شده از خاک در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و ۹ تیمار، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از تست مقایسه میانگین Student-Newman-Keuls (SNK) در نرم افزار SPSS 16.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی و ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌های باکتری حل‌کننده پتاسیم: نه جدایه باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (ایلایت و فلدسپار) شامل KSB70، KSB20، KSB22، KSB30، KSB40، KSB42، KSB90، KSB92 و KSB10 جداسازی و خالص‌سازی شدند. بسیاری از جدایه‌ها باکتری گرم مثبت بوده و کلونی سفید رنگ داشتند. هاله شفاف طی ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون ظاهر شد.

خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری: جدایه‌های باکتری به غیر از KSB22 و KSB4 و KSB2، توانایی ترشح آنزیم آلفا آمیلاز و هیدرولیز نشاسته را در محیط‌کشت نوترینت آگار (حاوی ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب) داشتند. جدایه‌های باکتری KSB2، KSB3، KSB42 و KSB10 به مقدار بیشتر توانایی هضم ساکارز و گلوکز و ایجاد رنگ زرد را در محیط‌کشت مایع پپتون داشتند. علاوه بر آن، جدایه باکتری KSB10 دارای ویژگی فلورسنتی در محیط کشت King B بود.

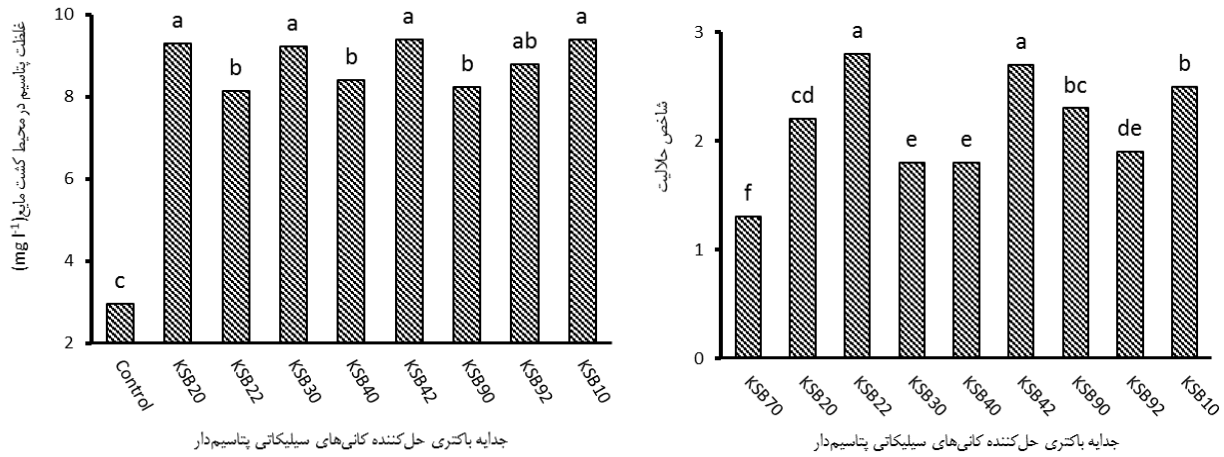
طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی کیفی ۹ جدایه باکتری مورد تحقیق، جدایه‌های باکتری از لحاظ توان حل کردن کانی‌های پتاسیمی و ایجاد هاله شفاف روی محیط‌کشت جامد الکساندروف (شاخص حلالیت) تفاوت معنی‌داری ($P\leq 0.01$) با هم داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس شاخص حلالیت، پتاسیم آزاد شده در محیط‌کشت و پتاسیم قابل‌استفاده خاک بعد از تلقیح باکتریایی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پتاسیم آزاد شده در محیط‌کشت مایع	شاخص حلالیت	پتاسیم قابل استفاده خاک ۹۰ روز بعد از تلقیح
تلقیح باکتری	۸	۱۲/۳۵۶***	۲/۱۳۶**	۶۲۰/۹۸**
خطای آزمایشی	۱۸	۰/۱۳۹	۰/۰۱۸	۱۳/۹۶

** و *** به ترتیب نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد است.

نتایج مقایسه میانگین شاخص حلالیت حاصل از حل شدن کانی‌های پتاسیمی (میکا و فلدسپار) در محیط‌کشت جامد الکساندروف توسط جدایه‌های باکتری مورد تحقیق در شکل (۱ الف) نشان داده شده است. شاخص حلالیت در اثر فعالیت جدایه باکتری‌های KSB22، KSB42 و KSB10 در محیط‌کشت الکساندروف جامد حداکثر (به ترتیب ۲/۸، ۲/۷ و ۲/۵) و در اثر فعالیت جدایه باکتری KSB70 حداقل (۱/۳) بود. مقدار شاخص حلالیت KSB30، KSB40 و KSB92 نیز کمتر از دو (به ترتیب ۱/۸، ۱/۸ و ۱/۹) بود.



(الف) (ب)

شکل ۱- تاثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر شاخص حلالیت در محیط‌کشت جامد الکساندروف (الف) و غلظت پتاسیم در محیط‌کشت مایع الکساندروف (ب). حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبود تفاوت معنی‌دار است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی کمی ۸ جدایه باکتری مورد تحقیق نشان داد که جدایه‌های باکتری از لحاظ توانایی حل کردن کانی‌های پتاسیمی و مقدار آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا و فلدسپار در محیط‌کشت مایع الکساندروف تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.001$) با هم دارند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌های پتاسیمی (میکا و فلدسپار) توسط جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار در شکل (۱ ب) نشان داده شده است. همه ۸ جدایه باکتری مورد تحقیق توانایی حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار را داشتند و سبب افزایش معنی‌دار و حداقل ۲/۷ برابری غلظت پتاسیم در محیط‌کشت مایع الکساندروف نسبت به محیط‌کشت بدون تلقیح باکتریایی (شاهد) شدند. به طوری‌که، غلظت پتاسیم در محیط‌کشت بدون تلقیح باکتریایی (شاهد) ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر بود در حالی‌که، غلظت آن در محیط‌کشت تلقیح شده با جدایه‌های باکتری KSB42 و KSB10 به ۹/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت (شکل ۱ ب). ریزجانداران با ترشح اسیدهای آلی سبب رهاسازی پتاسیم و سایر عناصر غذایی از کانی‌ها می‌شوند که مقدار پتاسیم رها شده از کانی‌ها به pH، اکسیژن و نوع جدایه باکتری حل کننده کانی و نوع کانی پتاسیم‌دار بستگی دارد (Sheng و Huang، ۲۰۰۲).

پس از ارزیابی کمی جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار در افزایش غلظت پتاسیم محیط‌کشت، چهار جدایه باکتری KSB20، KSB22، KSB42 و KSB10 به عنوان جدایه‌های کارآمد باکتری در حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار انتخاب شدند. باکتری‌ها ممکن است مواد اسیدی و قلیایی باکتریایی و یا کلات تولید کنند که آزادسازی پتاسیم را از کانی‌های پتاسیم‌دار در خاک افزایش می‌دهند (Sugumaran و Janarthanam، ۲۰۰۷). آزادسازی پتاسیم در محیط‌کشت توسط جدایه‌های تلقیح شده باکتری دلیل لازم برای امکان استفاده از این باکتری‌ها در بهبود قابلیت دسترسی به پتاسیم است. در تحقیق سینگ و همکاران (۲۰۱۰)، تلقیح گیاهان ذرت و گندم با انواع ریزجاندارن حل‌کننده پتاسیم سبب تحرک زیاد پتاسیم در خاک شد (Singh و همکاران، ۲۰۱۰). لذا غربالگری این جدایه‌های موثر و بومی، امکان استفاده از این باکتری‌ها را در تلقیح زیستی توتون به تنهایی یا همراه با مقدار کمی کود پتاسیمی فراهم می‌کند.

تاثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده پتاسیم بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک

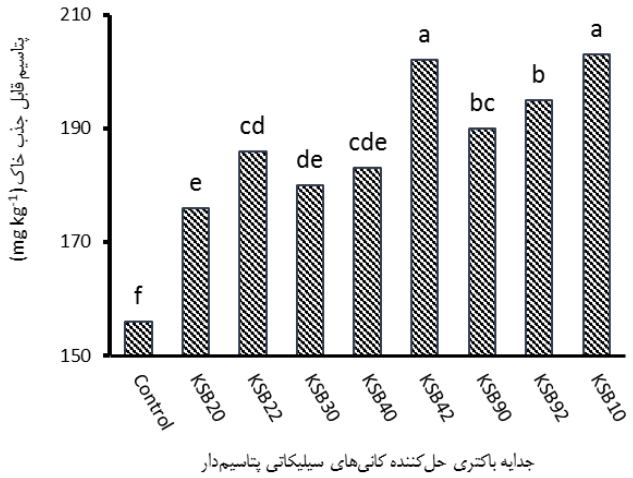
خاک مورد آزمایش غیرآهکی (کربنات کلسیم معادل برابر با ۰/۲۵ درصد) و دارای ۳۹ درصد رس و ۱۵۸ میلی‌گرم در کیلوگرم پتاسیم قابل استخراج با استات آمونیوم یک مولار بود.

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه

pH	کربنات کلسیم معادل (٪)	کربن آلی (٪)	ظرفیت تبادل کاتیونی (meq/100g)	پتاسیم (mg/Kg)	٪		
					رس	سیلت	شن
۶/۷۹	۰/۲۵	۰/۵۲	۱۹/۲	۱۵۸	۳۹/۲	۳۷/۴	۲۳/۴

طبق نتایج تجزیه واریانس، تاثیر باکتری‌های مورد مطالعه بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک معنی‌دار ($P < 0.01$) بود و جدایه‌های مورد مطالعه باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از لحاظ تاثیر بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک (۹۰ روز بعد از تلقیح باکتریایی خاک و انکوباسیون) تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۱).

نتایج بررسی توانایی باکتری‌های جدا شده در افزایش مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در شکل (۲) نشان داد که میزان پتاسیم قابل استفاده خاک در تلقیح با جدایه‌های KSB42 و KSB10 حداکثر (به ترتیب ۲۰۰ و ۲۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود که در مقایسه با شاهد (خاک بدون تلقیح KSB)، به ترتیب به مقدار ۴۴ و ۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک افزایش یافت. تاثیر جدایه باکتری KSB30 و KSB40 و KSB20 در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک کمتر (۲۰ تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک افزایش نسبت به شاهد) بود.



شکل۲. تاثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر میانگین پتاسیم قابل استفاده خاک

مقدار پتاسیم آزاد شده توسط باکتری‌های جدا شده KSB30، KSB20، KSB42 و KSB10 به محیط‌کشت الکساندورف مایع حداکثر بود ولی جدایه‌های باکتری KSB20 و KSB30 علی‌رغم توانایی بالا در حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار در محیط‌کشت مایع، توانایی کمتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک داشته‌اند.

نتیجه‌گیری

در بین جدایه‌های باکتری خالص‌سازی شده از ریزوسفر توتون، حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار و افزایش مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در جدایه‌های KSB42 و KSB10 در مقایسه با سایر جدایه‌ها به طور معنی‌دار بیشتر بود به طوری که این باکتری‌ها غلظت پتاسیم

محیط‌کشت مایع الکساندروف را بیش از سه برابر و مقدار پتاسیم قابل جذب خاک را حدود ۳۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش دادند. در نتیجه می‌توان از این جدایه‌ها (KSB42 و KSB10) به عنوان یک کود زیستی در راستای کاهش مصرف کودهای پتاسیمی و افزایش کیفیت توتون پس از آزمایش‌های مزرعه‌ای استفاده کرد.

منابع

ابراهیمی کریم‌آباد، ر و رسولی صدقیانی، م.ح. و برین، م. ۱۳۹۳. جداسازی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات از ریزوسفر گندم و ارزیابی توانایی انحلال آنها در حضور دو منبع نامحلول فسفات. تحقیقات کاربردی خاک، ۳(۲): ۴۱-۲۹.

اشرفی سعیدلو، س، و رسولی صدقیانی، م.ح. ۱۳۹۶. اثر ریزجانداران حل‌کننده سیلیکات بر سینتیک آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار. مجله تحقیقات آب و خاک ایران. ۴۸: ۶۴۹- ۶۳۹.

خوشرو، ب.، ساریخانی، م.ر. و علی اصغرزاده ن. ۱۳۹۳. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری مورد استفاده در کودهای زیستی معمول در ایران. دانش آب و خاک، ۲۵ (۴/۲): ۲۶-۱۳.

Adesemoye A.O., Torbert H.A., and Kloepper J.W. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. Canadian Journal of Microbiology, 54(10):876-86.

Deaker R., Kecskes M.L., Rose M.T., Amprayn K., Ganisan K., Tran T.K.C., Vu T.N., Phan T.C, Hien N.T., and Kennedy I.R. 2011. Practical methods for the quality control of inoculant bio-fertilizers. ACIAR Monograph Series No.147, Australian Center for International Agricultural Research: Canberra.

Hu X.F., Chen J., and Guo J.F. 2006. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannu Mountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22:983-990.

Liu W., Xu X., Wu X., Yang Q., Luo Y., and Christie P. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health, 28:133–140.

Malinovskaya I.M., Kosenko L.V., Votselko S.K., and Podgorskii V.S. 1990. Role of *Bacillus mucilaginosus* polysaccharide in degradation of silicate minerals. Microbiology, 59:49–55.

Nihala J.P.P. 2017. Solubilization of Insoluble Potassium by Different Microbial Isolates in vitro Condition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6: 3600-3607.

Parmar P., and Sindhu S.S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. Journal of Microbiological Research, 3(1):25-31.

Richmond M.D., Pearce R.C., and Bailey W.A. 2016. Dark fire- cured tobacco response to potassium and application method. Tobacco Science, 53:12-15.

Sarikhani M.R., Khoshru B, and Oustan Sh. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in vitro conditions. Geomicrobiology Journal, 33 (9): 832-838.

Sheng X.F., and Huang W.E. 2002, Mechanism of potassium release from feldspar affected by the strain NBT of silicate bacterium. Acta Pedologica Sinica, 39 (6): 863-871.

Singh G., Biswas D.R., and Marwaha T.S. 2010. Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum* L.): a hydroponics study under phytotron growth chamber. Journal of Plant Nutrition, 33(8):1236-1251.

Subhashini D.V. 2013. Effect of bio-inoculation of AM fungi and PGPR on the growth, yield and quality of FCV tobacco (*Nicotiana tabacum*) in vertisols. Indian Journal of Agricultural Science. 83(6):667-672.

Subhashini D.V. 2014. Growth promotion and increased potassium uptake of tobacco by potassium-mobilizing bacterium *frateuria aurantia* grown at different potassium levels in vertisols. Communication in Soil Science and Plant Analysis. 46(2):210-220.

Subhashini D.V., Anuradha M., Reddy D., and Vasanthi J. 2016. Development of bioconsortia for optimizing nutrient supplementation through microbes for sustainable tobacco production, International Journal of Plant Production, 10 (4):479-490

Sugumaran P., and Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Sciences, 3:350-355.

Vann M.C., Fisher L.R., Jordan D.L., Hardy D.H., Smith W.D., and Stewart A.M. 2012. The effect of potassium rate on the yield and quality of flue-cured tobacco (Nicotiana tabacum L). Tobacco Science, 49:14–20.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation of Silicate Minerals-Solubilizing Bacteria from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Rhizosphere and Evaluation of Their Efficiency on Soil Potassium Release

Rahmatollah Ranjbar[1], Ebrahim Sepehr[2], Abbas Samadi[3], MirHassan Rasouli Sadagiani[3], Mohsen Barin[4], Behnam Dovlati[4]

[1] Soil and water researcher, Research Department, Iran Tobacco Company, Iran
[2] Assosiate Prof., Soil Science Department, College of Agriculture, Urmia University, Iran.

[3] Prof., Soil Science Department, College of Agriculture, Urmia University, Iran.

[3] Prof., Soil Science Department, College of Agriculture, Urmia University, Iran.

[4] Assist. Prof., Soil Science Department, College of Agriculture, Urmia University, Iran.

[4] Assist. Prof., Soil Science Department, College of Agriculture, Urmia University, Iran.

Abstract

Some microorganisms in the soil solubilize K-bearing minerals and release their K ions into the soil solution. The present study was conducted to isolate potassium-solubilizing bacteria (KSBs) from the tobacco rhizosphere soil and evaluation of their potential to release potassium from tobacco-growing soil. In order to isolate KSBs, soil samples were prepared from tobacco- growing soils at plant flowering stage. Tobacco seeds (var. burley21) grown in these soils. Soil samples were taken from rhizosphere at flowering stage. The nine KSB isolates were isolated and purified on optimized Aleksandrov agar medium. Then, qualitative (solubility index) and quantitative evaluation (K-releasing potential of KSB from K-containing minerals) of KSB isolates were achieved on solid and liquid Aleksandrov medium, respectively. Also, the effect of bacteria isolates on available potassium of inoculated soil were investigated. The highest solubility index (2.8, 2.7 and 2.5) obtained from the activity of KSB22, KSB42 and KSB10 isolates in solid Aleksandrov medium, respectively. The highest concentration of potassium into liquid Aleksandrov medium (9.40 and 9.40 mg L^{-1}) related to the KSB42 and KSB10 isolates, respectively. The KSB42 and KSB10 isolates increased medium K concentration approximately three times more than non-inoculated medium. Also KSB42 and KSB10 isolates were more effective in potassium release from soil potassium-bearing minerals. So that the amount of soil available potassium in inoculation with these isolates increased by 29% compared to the control. As a result, these isolates (KSB42 and KSB10) can be used as a bio-fertilizer to reduce potassium fertilizer application and increase the quality of tobacco after field experiments.

Key words: Medium, Solubility index, Potassium, Silicates mineral

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثرات برخی از باکتری‌های محرک رشد گیاه بر صفات رشدی و بهبود جذب N، P و K گیاه ذرت

رعنا صحت‌مند[۱]، محمدرضا ساریخانی*[۲]، نصرت ا... نجفی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] دانشیار حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در راستای نیل به کشاورزی پایدار ضرورت استفاده از پتانسیل‌های کودهای زیستی بیش از پیش احساس می‌شود. در این پژوهش جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس‌های سودموناس (AZ-8، AZ-19، AZ-21)، استنوتروفوموناس (16SP7-2)، انتروباکتر (S16-3)، سیتروباکتر (44A-4)، ازتوباکتر (14SP-I) و ریزوبیوم (14A-4) برای تلقیح گیاه ذرت در خاکی با کمبود عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم استفاده شد. با این فرض که جدایه‌های مورد استفاده قادر به تأمین حداقل ۲۰ تا ۵۰ درصد نیاز فسفر، نیتروژن و پتاسیم گیاه هستند، در تیمارهای باکتریایی ۵۰ درصد از این عناصر از منابع اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم تأمین شد و آزمایش گلخانه‌ای با کشت گیاه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و با لحاظ کنترل منفی (بدون کود شیمیایی و بدون باکتری)، کنترل مثبت ۵۰ درصد (شامل کاربرد کود نیتروژن، فسفر، پتاسیم به میزان نصف مقدار توصیه شده بر اساس آزمون خاک)، کنترل مثبت ۱۰۰ درصد (شامل کاربرد کود نیتروژن، فسفر، پتاسیم بر اساس آزمون خاک به مقدار توصیه شده)، و تلقیح شده با جدایه‌های باکتری با ۵۰ درصد کودهای NPK انجام شد. در این آزمایش پارامترهایی نظیر قطر ساقه، ارتفاع بوته، شاخص کلروفیل، وزن خشک بخش هوایی و ریشه، همچنین غلظت و مقدار عناصر غذایی نیتروژن، فسفر، پتاسیم کل اندازه‌گیری شد. آنالیز شاخص‌های رشدی نشان داد بیشترین مقادیر اندازه‌گیری شده صفات فوق مربوط به تیمار NPK100 بوده است، اما از میان جدایه‌های باکتریایی در بخش اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی گیاه، جدایه AZ-19 با ۸۵ درصد و همچنین 14SP-I با ۷۲ درصد افزایش نسبت به شاهد بیشترین وزن خشک کل را به خود اختصاص دادند. در بخش اندازه‌گیری غلظت عناصر، بیشترین مقدار پتاسیم کل، فسفر کل و نیتروژن کل در جدایه AZ-19 مشاهده شد که به ترتیب با ۸۵، ۱۰۵ و ۹۲ درصد افزایش جذب نسبت به تیمار شاهد، بهترین تیمار باکتریایی بود.

کلمات کلیدی: نیتروژن، فسفر، پتاسیم، ذرت

مقدمه

استفاده بیش از حد از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها برای دستیابی به تولید بیشتر، سلامتی بشر و محیط زیست را به خطر می‌اندازد. به همین دلیل در سال های اخیر در پی بحران آلودگی‌های زیست محیطی تلاش‌های گسترده‌ای برای یافتن راهکارهای مناسب برای بهبود کیفیت خاک و محصولات کشاورزی، حذف آلاینده‌ها و حفظ پایداری بوم‌نظام‌های طبیعی آغاز شده است (verma و همکاران، ۲۰۱۴) و عملیات کشاورزی به سمت روش‌های پایدار و سازگار با محیط زیست سوق پیدا کرده است (Leach and Mumford, 2008).

امروزه کودهای زیستی به عنوان یک جایگزین برای کودهای شیمیایی با هدف افزایش حاصخیزی خاک و تولید محصولات در کشاورزی پایدار محسوب می‌شوند (Viviene and Felix, 2004). هدف اصلی از توسعه زیست فناوری در مورد باکتری‌های محرک رشد گیاه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های موثر و مفید از خاک، کاربرد و استفاده از آنها در خاک و افزایش جمعیت آنها می‌باشد (Adesemoye and Kloepper, 2009). در بررسی گونه‌های مؤثر PGPR با ویژگی‌های متعدد، جنس‌های مختلف باکتری‌ها نتایج قابل قبولی نشان داده‌اند و از این میان جنس‌های باکتریایی شامل Azotobacter، Pseudomonas، Rhizobium و Bacillus به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند (Teaumroong و همکاران، ۲۰۱۰). این باکتری‌ها علاوه بر تأثیر مستقیم با سازوکار تامین عناصر غذایی و تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه از راهکارهای غیرمستقیم مثلاً مقابله با عوامل بیماریزا می‌توانند برای گیاه سودمند باشند (Van Loon, 2007).

*ایمیل نویسنده مسئول: rsarikhani@yahoo.com

اثر سویه‌های مختلف از باکتری‌های محرک رشد (A. lipoferum و Azospirillum brasilense،P. putida ،P. fluorescens) روی رشد و عملکرد ذرت حاکی از افزایش معنی‌دار در جوانه زنی دانه، قدرت گیاهچه‌های ذرت، وزن خشک اندام‌هوایی و برگ و خوشه، مساحت سطح برگ، ارتفاع گیاه، وزن ۱۰۰ دانـه و تعـداد دانـه در هـر خوشه بوده است (Gholami و همکاران، ۲۰۰۹). به دلیل اهمیت تغذیه گیاه و افزایش راندمان تولید و در جهت نیل به کشاورزی پایدار و کاهش خطرات استفاده از کودهای شیمیایی برای محیط زیست و استفاده از پتانسیل ریزجانداران مفید خاکزی برای ارزیابی همزمان تأمین نیتروژن، فسفر و پتاسیم این جدایه‌های PGP، آزمایش پیش‌رو طراحی شده است. این مطالعه با اهداف زیر انجام گرفت:

۱- بررسی اثر بخشی باکتری‌های مورد استفاده در بهبود رشد گیاه و بهبود جذب N، P، K برای ذرت در مقایسه با تیمارهای کنترل کود شیمیایی.

۲- انتخاب جدایه‌های باکتریایی با کارایی بیشتر.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ در گلخانه گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد و خاک مورد استفاده از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان واقع در شمال شرق شهر تبریز نمونه‌برداری شد و جدایه‌های مورد استفاده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تأمین شد. این جدایه‌ها شامل Pseudomonas sp. AZ-8، Pseudomonas sp. AZ-19، Pseudomonas sp. Az-21، Enterobacter sp. S16-3، Stenotrophomonas sp. 16SP7-2، Azotobacter chroococcum. 14SP-I، Rhizobium sp. 14A-4 و Citrobacter sp. 44A-4 بودند.

به منظور انجام تلقیح میکروبی از کشت شبانه[2]باکتری‌ها در محیط NB استفاده شد (۲۰ میلی لیتر) و سپس بر حامل استریل باگاس و پرلیت (۱:۱) افزوده (۱۰ گرم) و به خوبی آغشته شدند. ۱۰ گرم از هر حامل باکتریایی با رطوبت اولیه ۱۵٪ پس از اضافه شدن ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری، به‌طور مساوی بین ۳ تکرار از تیمار یعنی در ۳ گلدان پخش شد. به‌طور میانگین هر گرم حاوی 10^8 باکتری بود. بذرهای ذرت از رقم سینگل کراس ۷۰۴ بود که پس از ضدعفونی شدن با هیپوکلریت سدیم ۰/۵درصد به مدت ۵ دقیقه، درون ظروف پتری دیش جوانه‌دار شده و سپس جهت کشت در گلدان آماده شدند (Aliasgharzad و همکاران، ۲۰۰۹). خاک پس از هوا خشک شدن از الک ۴ میلی‌متری عبور داده شد و پس از استریل در اتوکلاو (فشار ۱/۲ اتمسفر، دما ۱۲۱درجه سلسیوس با بخار آب و به مدت ۴۵ دقیقه)، مورد استفاده قرار گرفت. در هر گلدان ۳/۵ کیلوگرم خاک استریل ریخته شد و سپس در عمق ۴-۳ سانتیمتری زیر سطح خاک، ۱۰ گرم حامل آغشته شده به سوسپانسیون باکتری به به همراه بذور ضدعفونی شده قرار گرفت. در ابتدا ۴ بذر در هر گلدان کشت شد و بعد از استقرار گیاهان، تعداد ۲ گیاه سالم تا پایان آزمایش حفظ شد در طول آزمایش رطوبت گلدان‌ها در حدود FC ۰/۸ ظرفیت مزرعه نگهداری شد. دوره رشد به مدت ۶۰ روز به طول انجامید. دمای روزانه و شبانه گلخانه به ترتیب ۲±۲۸ و ۲±۲۰ درجه سلسیوس بود (شکل ۱). برای تأمین ماده آلی مورد نیاز باکتری از کود دامی استریل شده به مقدار ۴۰ گرم در هر گلدان استفاده شد و سایر نیازهای عناصر غذایی به جز NPK به مقدار لازم به صورت محلول برای هر گلدان تأمین شد که معادل ۱/۲۲ mg B/kg soil از منبع اسید بوریک (H_3BO_3)، ۲/۹۵mg Cu/kg soil از منبع سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)، ۱۰/۴ mg Fe/kg soil از منبع سکوسترین آهن (Fe-EDDHA)، ۴/۳۷ mg Mn/kg soil از منبع سولفات منگنز ($MnSO_4.4H_2O$)، ۱۰/۵۵ mg Zn/kg soil از منبع سولفات روی ($ZnSO_4.7H_2O$) بود. اما در مورد عنصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم، در تیمار شاهد (منفی) هیچ مقدار کودی استفاده نشد اما در مورد تیمار شاهد (مثبت) بر اساس آزمون خاک ۱۰۰٪ مقدار توصیه شده معادل۷۲ mg N/kg soil از منبع اوره، ۲۱/۹۹ mg P/kg soil از منبع سوپرفسفات تریپل ($Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$) و ۳۸/۸۲ mg K/kg soil از منبع سولفات پتاسیم (K_2SO_4) استفاده شد و در تیمار کنترل ۵۰٪ نصف این مقادیر به گلدانها افزوده شد (ملکوتی و غیبی، ۱۳۸۲)، همچنین در تیمارهای باکتریایی، ۵۰٪ مقادیر نیتروژن، فسفر و پتاسیم استفاده شد زیرا که فرض آزمایش این بود که باکتری‌ها قادر هستند تا ۵۰٪ نیاز گیاه به این عناصر را تأمین کنند. در پایان دوره رشد رویشی گیاه، ویژگی‌های قطر ساقه، ارتفاع گیاه، شاخص کلروفیل، وزن خشک بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه و حجم ریشه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. و پس از برداشت گیاه و آون خشک کردن نمونه‌های گیاهی، نمونه‌ها هضم شده و غلظت و مقدار عناصر پتاسیم، فسفر و نیتروژن اندازه‌گیری شد. پس از هضم نمونه‌ها (Walling et al., 1989) برای اندازه‌گیری عناصر پتاسیم و فسفر، فسفر به روش رنگ زرد(Olsen and Summers, 1982) و پتاسیم به روش فلیم‌فتومتری (Walling et al., 1989) تعیین شد و نیتروژن نیز از روش تقطیر و تیتراسیون (کجلدال) اندازه گیری شد. این آزمایش با در نظر گرفتن سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه‌ای به انجام

[2] Over night

رسید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام شد. تحلیل آماری با نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها به کمک Excel انجام شد.



شکل ۱. نمایی از گلدان‌های مورد آزمایش در گلخانه

نتایج و بحث

شاخص کلروفیل

نتایج مربوط به تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها بر شاخص کلروفیل اندازه‌گیری شده در گیاهان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین‌های داده‌ها بیشترین شاخص کلروفیل ۳/۷۷ در تیمار AZ-8 دیده شد و با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت و ۱۲۸ درصد افزایش نسبت به آن نشان داد و پائین‌ترین مقدار این شاخص متعلق به تیمار شاهد بود. جدایه 44A-4 با ۲/۷۷ مقدار نسبتاً بالایی از کلروفیل را به خود اختصاص داده و بقیه تیمارها همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند و با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند (شکل ۲).

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس اثر تیمارها بر شاخص‌های رشدی گیاه ذرت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		کلروفیل	قطر ساقه	ارتفاع گیاه	وزن خشک هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	حجم ریشه
تیمار	۱۰	۰/۸۴۴ *	۰/۰۲ *	۲۶۶/۶۹۱ **	۵۲/۷۵۲ *	۱۶۷/۰۲۲ ns	۴/۴۲۸ ns	۰/۰۲۸ ns
خطای آزمایشی	۲۲	۰/۳۵۲	۰/۰۰۸	۵۱/۳۳۳	۱۹/۴۱۵	۲۵۲/۰۸۴	۲/۱۰۲	۰/۰۱۸
ضریب تغییرات		۲۴/۳۴	۳/۵۳	۷/۸۹	۲۱/۳۰	۲۰/۴۳	۱۸/۷۴	۶/۵۹

ns و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد.

قطر ساقه

جدول تجزیه واریانس حاکی از آن است که قطر ساقه گیاهان ذرت در سطح احتمال ۵٪ متاثر از تیمارهای کاربردی بوده است (جدول ۱). پس از مقایسه میانگین داده‌ها مشاهده شد که بیشترین میزان قطر ساقه مربوط به تیمار تلقیح شده با جدایه 44A-4 با قطر ۲/۷۴ سانتی‌متر بود که ۹/۶

درصد افزایش نسبت به شاهد داشته است. و کمترین قطر ساقه با ۲/۵ سانتی متر مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین تیمار باکتریایی 16SP7-2 و تیمار NPK100 با ۲/۶۹ سانتی‌متر قطر مقادیر نسبتاً بالایی را به خود اختصاص داده در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۳).

ارتفاع گیاه

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تلقیح با جدایه‌های باکتری و تیمارهای کودی بر ارتفاع گیاهان ذرت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده، بیشترین ارتفاع گیاه ۱۰۷ سانتی‌متر، مربوط به تیمار NPK100 بوده که افزایش ۴۳ درصدی نسبت به شاهد داشت و دارای اختلاف آماری معنی‌دار با شاهد بود، پس از آن، تیمار NPK50 با ۱۰۳ سانتی‌متر طول دارای بیشترین ارتفاع بوده و با NPK100 در یک گروه آماری قرار گرفتند. جدایه 14SP-I با ۹۳/۸۳ سانتی‌متر بالاترین ارتفاع را بین تیمارهای باکتریایی به خود اختصاص داد. کمترین ارتفاع گیاه مربوط به شاهد با میانگین ۷۵ سانتی‌متر می‌باشد و تیمار 44A-4 با ۸۱ سانتی‌متر کمترین ارتفاع گیاه را بین تیمارهای باکتریایی داشت و با AZ-8 (۸۱/۶ سانتی‌متر) در یک گروه آماری قرار گرفت. تیمارهای 16SP7-2، S16-3، AZ-21، 14A-A و AZ-19 با ۹۱/۱۶ الی ۹۳/۸۳ سانتی متر ارتفاع، مقادیر نسبتاً بالایی را به خود اختصاص دادند که همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند.

وزن خشک بخش هوایی

اثر تلقیح با جدایه‌های باکتری و تیمار کودی بر وزن خشک بخش هوایی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از وزن خشک بخش هوایی نشان داد بیشترین میانگین وزن همانند وزن تر بخش هوایی متعلق به تیمار NPK100 با ۲۸/۶۰ گرم و با افزایش ۱۱۲ درصد نسبت به شاهد بود و کمترین وزن خشک اندام هوایی با ۱۳/۴۷ گرم مربوط به تیمار شاهد بوده است و از بین تیمارهای باکتریایی AZ-19 با ۲۵/۵۱ گرم بیشترین وزن خشک بخش هوایی را به خود اختصاص داد که نسبت به شاهد ۸۹ درصد افزایش داشت و با 14SP-I و 16SP7-2 در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۴).

لیلاسی و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی کارایی تثبیت نیتروژن برخی از جدایه‌های ازتوباکتر در مایه‌زنی ذرت مشاهده کردند که 14SP-1 بیشترین مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی را بعد از تیمارهای NPK100 و NPK50 دارد که احتمالا به علت توانایی بالای ازتوباکترها در جذب و انتقال نیتروژن به بخش‌های هوایی گیاه بوده است و همچنین طبق گزارش مرادی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی اثر برخی جدایه‌های باکتریایی بر رشد ریشه و جذب عناصرغذایی در ذرت، تیمارهای تلقیح شده با جدایه AZ-19 مقادیر نسبتا بالایی از وزن تر و خشک بخش هوایی را به خود اختصاص دادند همانند آن چیزی که در آزمایش ما مشاهده شد، شاید دلیل این افزایش به تولید اکسین در سودوموناس‌ها مربوط باشد که در نهایت منجر به رشد بیشتر گیاه شده و به دنبال آن ماده خشک گیاهی نیز افزایش یافته است.

وزن تر و خشک و حجم ریشه

تجزیه واریانس اثر تلقیح جدایه‌های مورد استفاده بر وزن تر و خشک ریشه و حجم ریشه معنی‌دار نبود (جدول ۱).

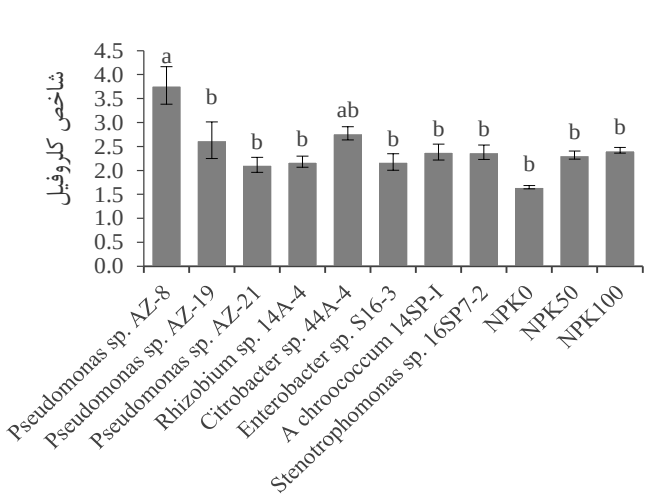
مقدار جذب عناصر NPK

مقدار کل پتاسیم در سطح احتمال ۵٪ متاثر از اعمال تیمارهای آزمایشی بود. بر اساس مقایسه میانگین بیشترین مقدار پتاسیم کل مربوط به تیمار NPK100 با مقدار ۲۴۶۷ میلی‌گرم بر گیاه بود و بین تیمارهای باکتریایی تیمار تلقیح شده با باکتری AZ-19 با ۲۳۷۸ میلی‌گرم بر گیاه بیشترین مقدار پتاسیم کل گیاه را به خود اختصاص داد که با 14SP-I در یک گروه آماری قرار گرفت (جدول ۲). تجزیه واریانس نشان داد که مقدار فسفر کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار کل فسفر با ۲۹۵/۶۱ میلی‌گرم در گیاه مربوط به تیمار NPK100 بود. در بین تیمارهای باکتریایی، AZ-19 با ۲۹۴/۷۶ میلی‌گرم در گیاه بالاترین مقدار فسفر کل را به خود اختصاص داد و تیمار 16SP7-2 نیز مقدار نسبتاً بالایی را داشت (جدول ۲).

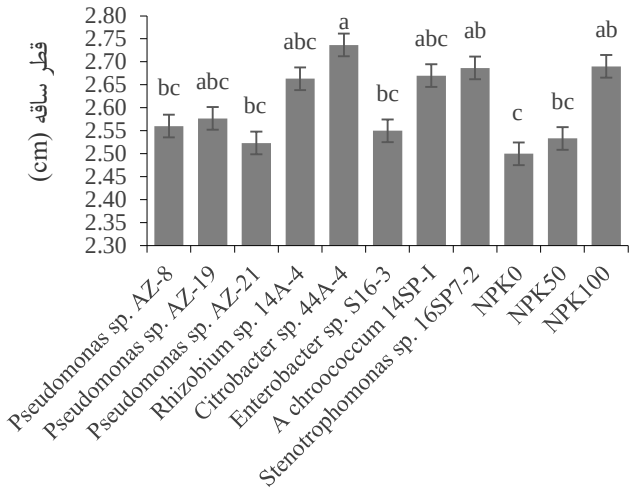
تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها بر مقدار کل نیتروژن در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین مقدار جذب نیتروژن در تیمار NPK100 به میزان ۵۲۵ میلی‌گرم در گیاه بود که ۱۳۰/۲۶ درصد افزایش جذب نسبت به شاهد داشت و در بین تیمارهای باکتریایی

AZ-19 با مقدار ۴۴۰ میلی‌گرم در گیاه، ۹۲/۹۸ درصد افزایش جذب نسبت به تیمار شاهد داشت و کمترین مقدار نیتروژن کل با ۲۲۸ میلی‌گرم در گیاه مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۲).

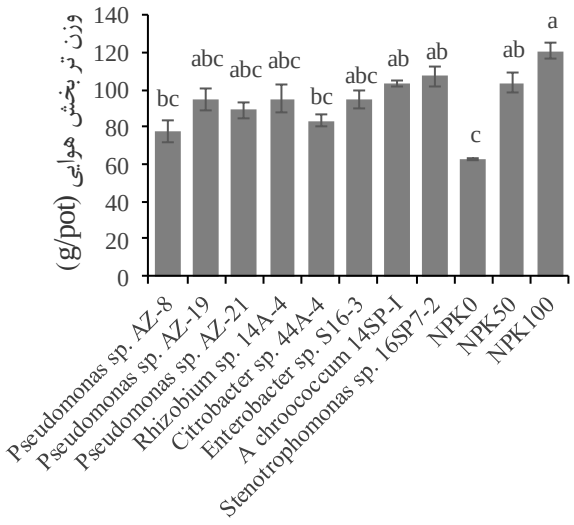
مرادی و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیقی بر روی توان آزادسازی پتاسیم و فسفر برخی جدایه‌های باکتریایی در شرایط درون شیشه‌ای و شناسایی باکتری‌های کارآمد، در بین تیمارهای تلقیح شده مقادیر جذب نسبتاً بالایی در تیمار AZ-19 مشاهده کردند. این دسته از ریزجانداران گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند؛ ولی بخشی از آن را که در محیط آزاد شده در اختیار گیاه قرار می‌دهند. همچنین فسفر موجود در وزن میکروبی که به شکل غیرمتحرک می‌باشد، نیز به گونه بالقوه برای گیاهان قابل استفاده است (Fageria, 2009). نتایج مطالعه موسوی و همکاران (۱۳۹۴) نشان داد استفاده از ریزجانداران حل‌کننده فسفات بر روی همه پارامترهای رشد و شاخص های کارایی تأثیر معنی‌دار داشت و باعث افزایش عملکرد اندام هوایی و غلظت و مقدار فسفر کل اندام هوایی گیاهان شدند، همچنین در نتیجه تلقیح های میکروبی روند افزایشی در کارایی جذب فسفر مشاهده شد (اشکیود و همکاران، ۱۳۹۵). با توجه به توانایی ازتوباکترها در تثبیت نیتروژن گیاهان چنین انتظار می‌رفت که بالاترین غلظت و مقدار نیتروژن را جدایه 14SP-I داشته باشد ولی بیشترین غلظت و مقدار نیتروژن بین تیمارهای باکتریایی در جدایه AZ-19 مشاهده شد و احتمالا دلیل این امر تأمین ۵۰ درصد نیتروژن گیاه توسط کود شیمیایی باشد احتمالاً تیمار 14SP-I به غلظت نیتروژن حساس بوده است. تثبیت نیتروژن در گیاهان تلقیح شده، فقط بخش کوچکی از نیتروژن مورد نیاز گیاه را تأمین می‌کند و به نظر می‌رسد به‌دلیل نقش سودوموناس‌ها در تنظیم و تولید هورمون‌های محرک رشد، جدایه AZ-19 توانسته است از این طریق باعث افزایش رشد، نمو و بیوماس گیاه شود و در کنار کود نیتروژن منجر به افزایش جذب نیتروژن گیاه گردد.



شکل ۲. اثر تلقیح جدایه‌های باکتری بر شاخص کلروفیل در گیاه ذرت



شکل ۳. اثر تلقیح جدایه‌های باکتری بر قطر ساقه ذرت



شکل ۴. اثر تلقیح جدایه‌های باکتری بر وزن خشک بخش هوایی

نتیجه‌گیری

در این پژوهش که در شرایط گلخانه‌ای انجام شد چند جدایه نسبت به بقیه هم از لحاظ شاخص‌های رشدی و هم آنالیز غلظت عناصر نتایج بهتری داشتند. با افزایش جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم و همچنین آهن و روی، گیاهان رشد بیشتری داشته و ماده خشک گیاهی نیز افزایش یافته است. باکتری‌های محرک رشد مانند ازتوباکترها دارای توان تثبیت نیتروژن بوده و با تأمین نیتروژن گیاه و یا تولید برخی متابولیت‌ها مانند تولید سیدروفور و مواد محرک رشد سبب افزایش رشد گیاه و مخصوصاً افزایش وزن خشک بخش هوایی گیاه و در نتیجه افزایش سطح برگ و افزایش ماده خشک هوایی گیاه می‌شوند. در میان جدایه‌های باکتریایی بیشترین افزایش وزن خشک گیاهی و بیشترین مقدار پتاسیم کل در جدایه AZ-19 از سوددوموناس‌ها و جدایه 14SP-I از ازتوباکترها به دست آمد. بهبود تغذیه فسفری و پتاسیمی گیاه با توجه به در نظر گرفتن مقدار جذب فسفر و پتاسیم بافت گیاهی به ترتیب در تیمارهای AZ-19، 16SP7-2 و 14SP-I حاصل شد. بهبود تغذیه نیتروژنی بعد از NPK100 تنها در جدایه AZ-19 حاصل شد، هرچند جدایه 14SP-I متعلق به ازتوباکتر بود و انتظار می‌رفت این باکتری اثر بهتری بر تأمین نیتروژن گیاه داشته باشد. در کل باکتری سودوموناس AZ-19 بیشترین کارایی جذب عناصر را داشت و پس از آن باکتری استنوتروفوموناس 16SP7-2 بالاترین کارایی را در بین بقیه باکتری‌ها نشان داد و ازتوباکتر 14SP-I نیز شرایط بهتری داشت. در کل جدایه‌های AZ-19 ، 14SP-I و 16SP7-2 در میزان افزایش شاخص‌های رشدی نتیجه بهتری داشتند و بر طبق این تحقیق باکتری‌های مذکور به عنوان جدایه‌های کارآمد معرفی و برای انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای توصیه می‌شوند.

جدول ۲. جدول مقایسه میانگین مقدار پتاسیم، فسفر و نیتروژن کل گیاه ذرت

تیمار ها	مقدار پتاسیم کل	مقدار فسفر کل	مقدار نیتروژن کل
	(mg/pot)		
AZ-8	۱۸۰۴^{ABC}	۱۸۰/۷۸^{BC}	۳۳۲^{BC}
AZ-19	۲۳۷۸^{AB}	۲۹۴/۷۶^{B}	۴۴۰^{AB}
AZ-21	۱۷۷۰^{ABC}	۱۱۶/۶۵^{CDE}	۲۷۱^{BC}
S16-3	۱۸۲۴^{ABC}	۸۷/۶۱^{DE}	۲۷۳^{BC}
16SP7-2	۱۹۲۶^{ABC}	۲۴۸/۳۶^{BC}	۲۸۸^{BC}
14SP-I	۱۹۵۰^{AB}	۱۱۹/۵۷^{BCDE}	۳۰۴^{BC}
14A-4	۱۸۴۲^{ABC}	۱۵۳/۲۲^{BCDE}	۲۴۲^{C}

44A-4	۱۵۱۶^{BC}	۷۵/۹۹^{E}	۲۶۰^{C}
NPK0	۱۲۷۹^{C}	۸۷/۶۰^{E}	۲۲۸^{C}
NPK50	۱۸۱۰^{ABC}	۱۷۲/۴۸^{BCD}	۳۵۹^{BC}
NPK100	۲۴۶۷^{A}	۲۹۵/۶۱^{A}	۵۲۵^{A}

NPK0: تیمار شاهد بدون دریافت کود، NPK50: تیمار دریافت کننده ۵۰ درصد نیاز کودی، NPK100: تیمار کودی دریافت کننده ۱۰۰ نیاز کودی

منابع

اشکیود ز.، موسوی ر.، سپهر ا.، رسولی صدقیانی م.ح. و صمدی ع. ۱۳۹۵. بررسی تأثیر تلقیح میکروبی بر کارایی جذب فسفر ذرت و آفتابگردان. نشریه زیست شناسی خاک، جلد ۴، شماره ۱: ۳۶-۲۸.

لیلاسی، م.، ساریخانی م.ر. و طلوعی ع. ۱۳۹۶. تأثیر تلقیح باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، انتروباکتر و ازتوباکتر بر جذب پتاسیم و رشد ذرت. پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران. ۶-۸ شهریور، اصفهان، ایران.

مرادی ش.، ساریخانی م.ر. و علی‌اصغرزاد ن. ۱۳۹۵. بررسی توان آزادسازی پتاسیم و فسفر برخی جدایه‌های باکتریایی در شرایط درون‌شیشه‌ای و شناسایی باکتری‌های کارآمد. تحقیقات آب و خاک ایران. جلد ۴۸، شماره ۲: ۳۹۵-۳۸۵.

ملکوتی، م.ج. و غیبی، م.ن. ۱۳۸۲. ضرورت مصرف بهینه کود برای افزایش عملکرد و بهبود کیفی ذرت دانه ای. مجموعه مقالات اصول تغذیه و ذرت دفتر نباتات علوفه ای. ۷۰-۵۷.

موسوی، ر.، سپهر ا.، صمدی ع.، رسولی صدقیانی م.ح. و صادق زاده ب. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر تلقیح میکروبی بر فسفرکارایی ارقام مختلف جو در استفاده از سنگ فسفات. پژوهش های آب و خاک, جلد ۲۹، شماره ۶: ۱۴۹۲-۱۴۸۱.

Adesemoye, A.O. and Kloepper, J.W., 2009. Plant microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 1–12.

Aliasgharzad, N., Shirmohamadi, E. and Oustan, Sh. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil and Environ, 28(2): 119-123.

Fageria N.K., 2009. The use of nutrients in crop plants. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. New York, NY, USA.

Gholami, A., Shahsavani, S. and Nezarat, S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Academy of Science, Engineering and Technology, 49: 19-24.

Leach, A.W. and Mumford, J.D. 2008. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. Environ Pollut, 151:139–147.

Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. Methods of Soil Analysis. Part 1, chemical and biological properties. Soil Science Society of America, 403–427.

Teaumroong, N., Wanapu, C., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K., Boonkerd, N. 2010. Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand. Microbes at Work, Springer, Berlin Heidelberg. pp: 293-312.

Van Loon, L.C. 2007. Plan responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119:243-254.

Verma, J.P,, Yadav, J., Tiwari, K.N. and Jaiswal, D.K. 2014. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (Cicer arietinum L.) in India. Soil Biology & Biochemistry, 70: 33-37.

Viviene, N.M. and Felix, D.D. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African Journal of Biotechnology, 3(1), pp.1-7.

Waling, I., Vark, W.V., Houba, V.J.G. and Van der lee, J.J. 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, The Netherland.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effects of Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Growth and Enhancement of K, P, N Uptake in Corn

Sehatmand[1], R., Sarikhani[*2], M.R., and Najafi[3], N

[1] M. Sc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

[2] Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

[3] Associate Prof. of Soil Science and Engineering, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

Abstract

In recent years, the application of biofertilizers has become popular due to its importance in sustainable agriculture. The assumption of this research was that the 8 studied isolates- i.e. AZ-8, AZ-19, AZ-21, 14A-4, S16-3, 14SP-I, 16SP7-2 and 44A-4, can provide at least 20-50% of phosphorus, nitrogen, and potassium needed for the plants. For this reason, 50% of these elements were supplied from proper resources such as urea, triplesuperphosphate and potassium sulfate along with bacterial inoculation treatments. The greenhouse experiment was performed in a completely randomized design with three replications. In this study treatments were included, negative control (without fertilizer and without bacteria), 50% control (including application of half of the recommended value of nitrogen fertilizer, phosphorus, potassium based on the soil test), 100% positive control (including application of recommended amount of nitrogen fertilizer, phosphorus, potassium based on soil test), and pot plants inoculated with bacterial isolates plus 50% NPK fertilizers. In this experiment, some parameters including stem diameter, plant height, chlorophyll index, the dry weight of shoot and dry and wet weight of root and nutrient concentrations and content of total nitrogen, phosphorus and potassium were measured. Analysis of growth indices showed that the highest amount was related to NPK100. Among bacterial isolates, AZ-19 isolate with 85%, as well as 14SP-I with 72% increase compared to control, had the highest total dry weight. The results of measuring the content of the elements showed that, AZ-19 isolate with 85% increase, had the highest amount of total potassium. The highest amount of total phosphorus, with 105 percent increase compared with control treatment, were observed into AZ-19 treatment; also, the highest amount of total nitrogen with 92 percent increase, was measured in AZ-19 isolate.

Keywords: Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Corn

*Corresponding Author: rsarikhani@yahoo.com

بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثر دو نوع علف‌کش بر روی فراهمی آهن قابل جذب خاک توسط میکروارگانیسم‌ها

حدیثه محمودی[۱]، شکوفه رضائی[۲*]، علی خانمیرزایی‌فرد[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

به منظور بررسی تاثیر دو نوع علف‌کش بر فراهمی آهن توسط میکروارگانیسم‌ها، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. ۲۴ نمونه یک کیلوگرمی خاک توزین و با مایه تلقیح حاوی باکتری سودوموناس و ازتوباکترکروکوم۱۸۷ مخلوط و در انکوباتور نگهداری شد. پس از یک شبانه‌روز نمونه‌ها از انکوباتور خارج، علف‌کش بنتازون در چهار سطح صفر، ۲، ۳/۵ و ۵ لیتر در هکتار و علف‌کش تریفلورالین در چهار سطح صفر، ۱، ۲ و ۳ لیتر در هکتاردر سه تکرار و بر اساس وزن خاک به نمونه‌ها اضافه و با حفظ رطوبت در ۶۰ درصد ظرفیت زراعی در انکوباتور نگهداری شدند. در فواصل زمانی ۷، ۳۰ و ۶۰ روز از خاک‌ها نمونه‌برداری و غلظت آهن قابل جذب اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر زمان، غلظت علف‌کش و اثر متقابل زمان و نوع علف‌کش بر غلظت آهن قابل جذب خاک در سطح یک درصد و اثر زمان در غلظت علف‌کش بر غلظت آهن قابل جذب خاک درسطح پنج درصد معنی‌دار شد. با گذشت زمان مقدار آهن قابل جذب افزایش یافت. با افزایش غلظت علف‌کش‌ها مقدار آهن قابل جذب کاهش پیدا کرد.

کلمات کلیدی: بنتازون، تری‌فلورالین، سودوموناس، عناصر کم‌مصرف

مقدمه

آهن یکی از عناصر ضروری در تغذیه گیاهان بوده که به مقدار فراوان در خاک وجود دارد ولی به دلایل متعددی از جمله آهکی بودن و pH قلیایی، قابلیت جذب آن بسیار کم و محدود می‌باشد. میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه می‌توانند با ترشح اسیدهای آلی و سیدروفورها حلالیت عناصر آهن و درنتیجه دسترسی گیاه به آن را افزایش دهند (Vessey، ۲۰۰۳). از طرفی جمعیت، فعالیت و کارکرد این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند تحت تاثیر علف‌کش‌ها قرار بگیرد که استفاده از انها اجتناب‌ناپذیر است ولی شرایط و نحوه استفاده از آن‌ها باید به نحوی تنظیم کرد تا خصوصیات جامعه زیستی خاک که از مهمترین شاخص‌های سلامت، پایداری و حاصل‌خیزی خاک و اکوسیستم هستند، درمعرض خطر و تهدید قرارنگیرند (Pedersen، ۱۹۸۸). نتایج تحقیقات منصورزاده و رئیسی(۱۳۹۱) نشان داد که مصرف علف‌کش‌ها می‌تواند بر روی جمعیت و فعالیت ریزجانداران خاکزی و درنتیجه واکنش‌های بیوشیمیایی خاک تاثیرگذار باشند و به تبع آن حاصلخیزی خاک و رشد گیاه تغییر می‌یابد. با افزایش غلظت علف‌کش تری‌بنورون-متیل(گرانستار) و بروموکسینیل (پاردنر) کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت دهیدروژناز و اوره‌آز(فعالیت میکروارگانیسم‌ها) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید. (پوربابایی و بهرامی، ۱۳۹۴). با توجه به نقش میکروارگانیسم‌ها در افزایش قابلیت جذب آهن و تاثیر علف‌کش‌ها بر کارکرد میکروارگانیسم‌ها، هدف از انجام این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف دو نوع علف‌کش برفراهمی آهن توسط میکروارگانیسم‌ها بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در سال ۹۶-۹۵ اجرا شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک از قبیل اسیدیته و هدایت الکتریکی، بافت، آهن قابل جذب و ظرفیت زراعی خاک بر طبق روش‌های استاندارد مؤسسه خاک و آب اندازه‌گیری شد(علی‌احیایی و بهبهانی‌زاده، ۱۳۷۲). ۲۴ نمونه یک کیلوگرمی خاک توزین و به ظروف مناسب منتقل و با مایه تلقیح حاوی باکتری سودوموناس و ازتوباکترکروکوم۱۸۷ مخلوط و در انکوباتور نگهداری شد. پس از یک شبانه‌روز نمونه‌ها از انکوباتور خارج علف‌کش بنتازون در چهار سطح صفر، ۲ لیتر در هکتار(حداقل غلظت توصیه شده)، ۳/۵ لیتر در هکتار(میانگین غلظت توصیه شده) و ۵ لیتر در هکتار(حداکثر غلظت توصیه شده) و علف‌کش تریفلورالین در چهار سطح صفر، ۱ لیتر در هکتار(حداقل غلظت توصیه شده)، ۲ لیتر در هکتار (میانگین غلظت توصیه شده) و ۳ لیتر در هکتار(حداکثر غلظت توصیه شده) در سه تکرار و بر اساس وزن خاک به نمونه‌ها اضافه و خوب مخلوط و با حفظ رطوبت در ۶۰ درصد ظرفیت زراعی

*ایمیل نویسنده مسئول: Rezaee_sh@yahoo.com

در انکوباتور نگهداری شدند. در فواصل زمانی ۷، ۳۰ و ۶۰ روز از خاک‌ها نمونه‌برداری و غلظت آهن (Lindsay و Norvell، ۱۹۷۸) با دستگاه جذب اتمی قرائت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و رسم نمودارها با Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول۱-برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

بافت	رس	سیلت	شن	هدایت الکتریکی	pH	آهن قابل جذب
	(٪)			(dSm^{-1})		ppm
لومی رسی	۲۸/۸	۲۶	۴۵/۲	۳/۰۵	۷/۶	۴/۵

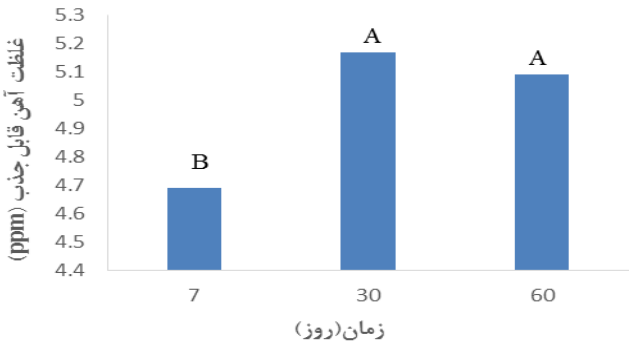
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر زمان، غلظت علف‌کش و اثرمتقابل زمان و نوع علف‌کش بر غلظت آهن خاک در سطح یک درصد و اثر زمان در غلظت علف‌کش بر غلظت آهن قابل جذب خاک درسطح پنج درصد معنی‌دار شده است(جدول۲).

جدول۲- تجزیه واریانس تاثیر دو نوع علف‌کش بر فراهمی آهن قابل جذب

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع علف‌کش	۱	۰/۱۲۹^{ns}
زمان	۲	۱/۵۵**
غلظت علف‌کش	۳	۰/۹۹۶**
علف‌کش ×زمان	۲	۰/۰۵۲**
علف‌کش ×غلظت علف‌کش	۳	۰/۰۸۵^{ns}
زمان ×غلظت علف‌کش	۶	۰/۲۶۷*
زمان ×علف‌کش×غلظت علف‌کش	۶	۰/۰۸۸^{ns}
خطا	۴۸	۰/۱۱۱^{ns}
ضریب تغییرات(cv)		۶/۶

ns،**،* به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

با گذشت زمان غلظت آهن در خاک افزایش یافت به‌طوریکه کمترین و بیشترین مقدار آهن قابل جذب در زمان ۷ و ۳۰ روز مشاهده شد. مقدار آهن در زمان۶۰ روز نسبت به ۷ روز افزایش معنی‌دار داشته است ولی نسبت به ۳۰ روز تغییر قابل ملاحظه نداشته است(شکل ۱). استفاده از باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش عناصر قابل جذب خاک از جمله آهن و روی می‌شود. این باکتری‌ها می‌توانند ترکیبات نامحلول روی را توسط مکانیسم‌های مختلفی از جمله کاهش pH، تولید اسیدهای آلی و تولید ترکیبات کلات‌کننده، تولید اسیدهای معدنی مانند اسید سولفوریک، نیتریک و کربنیک به صورت محلول در آورند(Battisti و Naylor، ۲۰۰۹).



شکل ۱- اثر زمان بر غلظت آهن قابل جذب خاک

همان‌طور که شکل۲ نشان می‌دهد در غلظت صفر علف‌کش‌ها، غلظت آهن بیشترین مقدار را داشته و با افزایش غلظت علف‌کش، غلظت آهن قابل جذب کاهش می‌یابد. علت کاهش را می‌توان به این صورت بیان کرد که در غلظت صفر علف‌کش‌ها میکروارگانیسم‌ها حداکثر فعالیت را داشته و باعث افزایش آهن قابل جذب شده‌اند ولی با افزایش غلظت علف‌کش، علف‌کش‌ها بر روی میکروارگانیسم‌ها اثر گذاشته و باعث کاهش فعالیت و اثرات مثبت آن‌ها بر افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی شده‌اند. به طوری‌که در غلظت ۵ لیتر در هکتار بنتازون و ۳ لیتر در هکتار تریفلورالین کمترین مقدار آهن قابل جذب مشاهده شده است. با افزایش کاربرد تری‌فلورالین غلظت آهن، منیزیم، پتاسیم و منگنز در برگهای سویا کاهش یافت. در خاک‌های آهکی احتمال کمبود آهن زیاد است و کاربرد تری‌فلورالین کمبود آهن در سویا را ایجاد و یا تشدید می‌کند(Udoh و Nelson، ۱۹۸۶).



شکل۲- اثر سطوح مختلف علف‌کش بر روی آهن قابل جذب خاک

نتیجه‌گیری

باکتری‌های استفاده شده باعث افزایش آهن قابل جذب شد ولی استفاده از علف‌کش‌ها مقدار آهن قابل جذب را کاهش داد. با افزایش غلظت علف‌کش‌ها مقدار آهن کاهش یافت. نوع علف‌کش بر میزان آهن قابل جذب تاثیری نداشت. در هنگام استفاده از علف‌کش‌ها، غلظت باید به گونه‌ای انتخاب شود که حداقل تاثیر منفی را بر روی کارکرد میکروارگانیسم‌ها داشته باشد.

منابع

پوربابایی، ا. و بهرامی، ا. ۱۳۹۴. پاسخ آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز به دو علف‌کش تری‌بنورون‌متیل و بروموکسینیل در خاک تحت کشت گندم. نشریه زیست‌شناسی خاک، ۳(۱)، ۲۰-۱۳.

علی‌احیایی، م. و بهبهانی‌زاده، ع. ا. ۱۳۷۲. شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. نشریه‌ی مؤسسه‌ی تحقیقات خاک و آب، شماره ۸۹۲.

منصورزاده، م. و رئیسی، ف.۱۳۹۱. اثر علف‌کش ارادیکان بر کربن ونیتروژن توده زنده میکروبی و فعالیت اوره‌آز و آریل‌سولفاتاز دریک خاک آهکی تحت شرایط مزرعه‌ای. مجله علوم فنون کشاورزی ومنابع طبیعی (علوم آب وخاک)، ۱۶(۵۹)، ۱۶۷-۱۵۳.

Battisti, D.S. and Naylor, R.L. 2009. Historical warning of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. Science, 323, 240–244.

Lindsay, W.L. and Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper1. Soil science society of America journal, 42(3), 421-428.

Pedersen, T.L. 1988. Elements of toxicology and chemical risk assessment, a handbook for nonscientists. Attorneys and decision makers (2nd Ed). Environmental Corporation. Washington DC. USAl.

Udoh, U.J. and Nelson, L.E. 1986. Trifluralin-induced chlorosis in soybeans (Glycine max (L.) Merr.) grown on clayey, high pH soils. Plant and soil, 96(2), 175–184.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255, 571-586.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Microbial induced Fe availability in two herbicides application

Mahmoodi[1], H., Rezaei[*2], Sh., Khanmirzaei[2], A

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

In order to evaluate the effect of two type of herbicide on microbial induce Fe availability was carried out a completely randomized design. 24 samples of soil were inoculated with Pseudomonas and Azotobacter Chroococcum 187 and incubated. After one day, samples were treated with two herbicides: bentazon at four rates 0, 2, 3.5 and 5 Lha^{-1} and trifluoralin at four rates 0, 1, 2 and 3 Lha^{-1} in three replicates. The samples of soil were incubated in 60% field capacity. After 7, 30 and 60 days of incubation, soil were sampled and measured soil available Fe. The results showed that incubation time, concentration of herbicide and time and type of herbicide interaction on available Fe was significant at 1% level. Time incubation and concentration of herbicides interaction had significant effect on available Fe ($p<.0.05$). The amount of available Fe increased with increasing incubation time and decreased by increasing herbicide concentration.

Keywords: bentazon, Micronutrients, Pseudomonas, Trifluoralin

[*] Corresponding author, Email: Rezaee_sh@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر بیوچار و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های فسفومنواسترازها و زیست فراهمی فسفر

رقیه واحدی [۱*]، میرحسن رسولی صدقیانی [۲]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

بیوچار و ریزجانداران حلالیت و تحرک فسفر را در ریزوسفر تحت تأثیر قرار داده و زیست‌فراهمی آن را در خاک بهبود می‌بخشند. برای ارزیابی تأثیر کاربرد بیوچار بقایای هرس درختان سیب و انگور و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (PGPR) بر فعالیت آنزیم‌های فسفومنواسترازها و زیست فراهمی فسفر در خاک آهکی آزمایشی به گونه فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه‌ای در رایزوباکس انجام شد. فاکتورها شامل ماده آلی (بیوچار بقایای هرس و شاهد)، تلقیح میکروبی (باکتری‌های PGPR و بدون تلقیح) و خاک (خاک ریزوسفر و غیرریزوسفر) بودند. برخی ویژگی‌های خاک شامل فسفر قابل دسترس، فعالیت آنزیم‌های فسفومنواسترازهای اسیدی و قلیایی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد کاربرد بیوچار و تلقیح باکتری‌های PGPR منجر به تغییرات معنی‌دار، در شاخص‌های اندازه‌گیری شده گردیدند. همچنین تیمار بیوچار فعالیت آنزیم‌های اسیدی و قلیایی را به ترتیب ۱/۳۷ و ۱/۵۵ برابر در خاک ریزوسفر نسبت به غیرریزوسفر افزایش داد. با این وجود مقدار فسفر قابل دسترس در خاک غیرریزوسفری تیمار بیوچار ۱/۳۴ برابر بیشتر از خاک ریزوسفر بود. به طور کلی استفاده از ماده آلی و تلقیح میکروبی به دلیل تحریک فعالیت فسفومنواسترازها تأثیر قابل توجهی در افزایش زیست فراهمی فسفر دارد.

کلمات کلیدی: بقایای هرس، ریزجانداران حل کننده فسفات، رایزوباکس

مقدمه

استان آذربایجان غربی بیشترین باغ‌های سیب و انگور را در کشور به خود اختصاص داده است. همچنین نیاز به هرس سالیانه این باغ‌ها بیش از هزاران تن بقایای هرس پدید می‌آورد. بنابراین یکی از راه‌های درست و کاربردی برای بهبود ماده آلی خاک، مدیریت استفاده از بقایای هرس درختان میوه است که متاسفانه بخش بزرگی از آن سوزانده و یا در طبیعت رها می‌شوند. ماده آلی نه تنها منبع بزرگ عنصرهای غذایی است بلکه با تشدید فعالیت زیستی در خاک، به چرخش بهتر مواد غذایی کمک می‌کند. خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک، با نبود پوشش گیاهی کافی و بازگشت مقدار اندک بقایای گیاهی به خاک، دارای مادهٔ آلی کمی هستند. این خاک‌ها اغلب آهکی می‌باشند و در نتیجه بسیاری از گیاهان در این خاک‌ها با مشکل تغذیهٔ عناصر غذایی به ویژه فسفر روبه‌رو می‌باشند. بقایای هرس درختان با تبدیل شدن به بیوچار با جایگزینی یا فراهم کردن عناصر غذایی در خاک، علاوه بر بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نقش مهمی نیز در پویایی و زندگی ریزجانداران خاک و ایجاد نوعی تعادل دینامیکی در بین اجزای زنده و غیر زنده خاک ایفا می‌کنند (Chan و همکاران ۲۰۰۸). بیوچار ماده جامد غنی از کربن تولید شده توسط گرما کافت توده‌های زیستی با مقدار کمی اکسیژن یا بدون اکسیژن می‌باشد (Liu و همکاران ۲۰۱۱). همچنین آنزیم‌های خاک به عنوان یکی از شاخص‌های قابل استفاده برای حاصلخیزی و کیفیت خاک پیشنهاد شده‌اند. در این میان، فسفومنواسترازها گروه گسترده‌ای از آنزیم‌ها می‌باشند که از بین آن‌ها فسفومنواسترازهای اسیدی و قلیایی به علت اهمیتی که در معدنی شدن فسفر آلی خاک و تغذیه گیاهان دارند بیش از سایر گروه‌های فسفومنواسترازها مورد توجه قرار گرفته‌اند. فسفاتاز آنزیمی است که از طریق هیدرولیز کردن منواسترهای اسید فسفریک و تبدیل آن‌ها به یون فسفات و مولکولی با یک گروه هیدروکسیل آزاد، گروه فسفات را از پیش ماده خود جدا می‌سازد و فسفات آزاد شده در خاک می‌تواند توسط گیاهان یا ریزجانداران جذب شود (Quiquampoix و همکاران ۲۰۰۵). اگرچه ریشه‌های گیاه در تولید فسفومنواسترازها نقش دارند اما ترشح آنزیم فسفومنواستراز توسط باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR[1]) نیز گزارش شده است (Mishra، ۲۰۰۷).

* ایمیل نویسنده مسئول: r.vahedi@urmia.ac.ir

[1] Plant growth promoting rhizobacteria

گزارش‌های متناقضی پیرامون زیست فراهمی فسفر توسط بیوچار وجود دارد. با توجه به حضور غلظت‌های بالایی از اکسیدهای عناصر قلیایی (Ca2+ و Mg2+) و غلظت کم Al+3 محلول در خاک (Chintala و همکاران ۲۰۱۳)، با افزودن بیوچار به خاک قلیایی جذب فسفر افزایش یافته و فراهمی فسفر کاهش می‌یابد. در حالیکه Atkinson و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که بیوچار فراهمی فسفر خاک و جذب فسفر توسط گیاهان را بطور غیر مستقیم با تغییر محیط ریزجانداران تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از راهکارهای دیگر برای افزایش زیست فراهمی فسفر بهره‌گیری از پتانسیل ریزجانداران حل کننده فسفات[2]می‌باشد. باکتری‌های PGPR از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند تولید متابولیت‌های موثر در رشد گیاه همانند هورمون‌های گیاهی (اکسین، سیتوکنین، جیبرلین)، تثبیت نیتروژن در ریزوسفر، افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول و کم محلول عناصر غذایی همانند فسفر و افزایش فراهمی آن‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی و معدنی، تولید فسفومنواسترازها، تولید سیدروفور و تنظیم تولید اتیلن در ریشه‌ها رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Reis و همکاران ۲۰۰۱). Liang و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که قرار دادن ماده آلی در اطراف ریزوسفر یا خارج از ریزوسفر تاثیر چشمگیری در فعالیت میکروبی در ریزوسفر و توده‌ی خاک در پی داشته است. در ریزوسفر تغییراتی مانند اسیدی شدن و افزایش مقدار ماده‌ی آلی در هر دو فاز جامد و محلول خاک، منجربه تغییر در فعالیت میکروبی می‌شود که باعث ایجاد تفاوت بین خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری می‌گردد. به طور کلی، ریشه گیاه با جذب یا آزاد سازی عنصر غذایی از محیط احاطه کننده ریشه منجر به تخلیه و یا تجمع و در نتیجه ایجاد تغییر در غلظت عناصری همانند فسفر در اطراف خود می‌شود. مشاهده و اندازه گیری سیستم ریشه در گیاه بسیار وقت گیر است. مطالعه‌ی خاک ریزوسفری اغلب با مشکلاتی همراه است زیرا لایه‌ی خاکی که مستقیما تحت تاثیر ریشه قرار می‌گیرد بسیار نازک بوده و از طرف دیگر توزیع ریشه در خاک بسیار گسترده است. برای مطالعه دقیق‌تر فرایندهای ریزوسفری، محدود کردن رشد ریشه‌ها در حجم معینی از خاک سبب افزایش تراکم ریشه شده و نمونه-برداری از خاک ریزوسفری را تسریع می‌نماید. لذا بر این هدف از رایزوباکس استفاده می‌شود. رایزوباکس شرایطی همانند گلدان دارد با این تفاوت که خاک را از تماس مستقیم با ریشه جدا کرده بدون اینکه در حرکت محلول خاک خللی وارد شود. با توجه به اهمیت روز افزون ماده آلی و کودهای بیولوژیک در کشاورزی و نظر به اینکه ارتباط بین بیوچار و باکتری‌های PGPR و تاثیرات آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های خاک فسفومنواستراز هنوز به اندازه کافی توصیف نشده است و اکثر مطالعات بیوچار در خاک‌های اسیدی و در شرایط آب هوایی گرم و مرطوب انجام گرفته است. همچنین پژوهش‌های کمی در این ارتباط در رایزوباکس انجام گرفته است. لذا هدف از این تحقیق هدف از این تحقیق تاثیر کاربرد بیوچار و بقایای هرس درختان میوه بر فعالیت آنزیم‌های فسفومنواستراز و فراهمی فسفر در یک خاک آهکی در حضور باکتری‌های PGPR در شرایط رایزوباکس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار که فاکتورها شامل ماده آلی (بیوچار بقایای هرس و شاهد بدون ماده آلی)، تلقیح میکروبی (باکتری‌هایPGPR و شاهد بدون تلقیح) و خاک (خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری) بود، در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه اجرا گردید. نمونه‌برداری خاک غیر زراعی با بافت سبک از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری شهرستان سلماس واقع در استان آذربایجان غربی تهیه شد و بعد از هوا خشک کردن از غربال ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس در دستگاه اتوکلاو و با دمای ۱۲۱درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲ ساعت استریل شدند. قبل از استریل کردن خاک، برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (جدول۱). برای تهیه بیوچار، بقایای هرس درختان سیب و انگور در قطعات ۲۰ میلی‌متری ابتدا به راکتور (استوانه فلزی به قطر۷ و ارتفاع ۳۱ سانتی‌متر) و سپس به کوره الکتریکی منتقل گردید. تولید در دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس در شرایط عدم وجود اکسیژن انجام گردید. در نهایت بیوچار تولید شده آسیاب و از الک ۰/۵ میلیمتری عبور داده شد. pH و EC بیوچار در عصاره صاف شده سوسپانسیون ۱ به ۱۰ بیوچار به آب، فسفر کل بیوچار به روش هضم با اسید (Rajkovich و همکاران ۲۰۱۱)، نیتروژن و کربن بیوچار نیز به روش سوزاندن خشک با دستگاه ESC 4010 CHNSO Analyzer اندازه-گیری گردید(جدول۱). جهت انجام آزمون گلخانه‌ای و برای کشت گیاه از رایزوباکس استفاده شد. باکس‌های ریزوسفر در ابعاد۲۰×۱۵×۲۰ سانتی‌متر (طول، عرض، ارتفاع) استفاده شد. فضای هر باکس با بهره‌گیری از صفحات مشبک نایلونی ۳۲۵ مش به دو قسمت: ۱) ناحیه ریزوسفری به ضخامت دو سانتی‌متر، ۲) ناحیه غیرریزوسفری به ضخامت ۵/۸ سانتی‌متر (این ناحیه در طرف دیگر ناحیه ریزوسفری نیز با همان ضخامت تکرار شد) تقسیم شد. برای انجام آزمایش گلخانه‌ای، بیوچار بقایای هرس سیب و انگور برحسب ۱/۵ درصد کربن آلی خالص به خاک (هر باکس شامل ۵/۸۰ کیلوگرم خاک) اضافه و مخلوط شدند و سپس به باکس‌ها منتقل گردیدند. در تیمارهای شاهد بدون ماده آلی خاک استریل دارای تلقیح میکروبی استفاده گردید. در

[2] Phosphate Solubilizing Microorganisms

تیمارهای شاهد بدون تلقیح میکروبی نیز خاک استریل دارای ماده آلی استفاده گردید. همچنین مقدار ۸۰ میلی‌گرم فسفر از منبع خاک فسفات به عنوان منابع نامحلول فسفر در هر کیلوگرم خاک به فاصله‌ی ۵ سانتی متری زیر بذرها قرار داده شد. برای تلقیح میکروبی از سویه‌های میکروبی موجود در بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه که شامل سودوموناس‌های گروه فلورسنت (ترکیبی از گونه‌های P aeruginosa، P.fluorescens و P. putida) بودند، استفاده گردید. برای تلقیح بذرها از روش افزودن محلول باکتری‌ها (یک میلی لیتر از سوسپانسیون برای هر بذر) به خاک اطراف بذرها همزمان با کاشت استفاده شد. پس از افزودن مایه‌های تلقیح، برای کشت گیاه، بذرهای گندم (Triticum aestivum L.) رقم پیشتاز پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به تعداد شش بذر در بخش ریزوسفری رایزوباکس‌ها کشت گردیدند. پس از جوانه زدن بذرها، چهار بوته (بوته‌های سالم‌تر و قوی‌تر) نگه‌داشته شدند. در طول دوره کشت از آب مقطر برای آبیاری و جهت تامین مواد غذایی مورد نیاز برای تغذیه گیاهان از محلول غذایی Rorison عاری از فسفر استفاده گردید. در پایان پس از ۶۵ روز رایزوباکس‌ها باز شدند. از هر رایزوباکس دو نمونه خاک، یکی از بخش ریزوسفر و دیگری از بخش غیرریزوسفری برداشت شد. فسفر قابل استفاده به روش اولسن و آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی (Tabatabaiو Bremner، ۱۹۶۹) اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسات میانگین داده‌ها با بهره‌گیری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار MSTATC و رسم شکل‌ها با نرم افزار Execl انجام گرفت.

جدول-۱ نتایج برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شنی و بیوچار

	بافت خاک	pH	EC	کربن آلی	کربنات کلسیم معادل	نیتروژن کل	فسفر قابل استفاده	فسفر کل	پتاسیم قابل استفاده
			$ds\ m^{-1}$		٪			$mg.kg^{-1}$	
خاک	شن لومی	۷/۵۳	۰/۴۷	۰/۲۵	۱۴/۲۵	۰/۰۸	۷/۶۴	-	۹۸
بیوچار بقایای هرس سیب و انگور	-	۷/۲۹	۰/۰۸	۶۷/۵۳	-	۰/۵۴	-	۲۷۴۸/۰۷	

نتایج و بحث

زیست فراهمی فسفر

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی و برهمکنش (منابع آلی × تلقیح میکروبی، منابع آلی × خاک و تلقیح میکروبی × خاک) بر میزان فسفر قابل دسترس خاک ($p<۰/۰۰۱$) معنی‌دار گردید. مقایسه میانگین اثر منابع آلی و تلقیح میکروبی بر فسفر قابل دسترس نشان داد که افزودن مواد آلی همراه با تلقیح میکروبی تاثیر معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تلقیح و نیز شرایط بدون ماده آلی و بدون تلقیح بر زیست فراهمی فسفر داشت (جدول۲). به طوری که در تیمار بیوچار، حضور باکتری‌های PGPR منجر به افزایش ۸۶/۸۸ درصدی زیست فراهمی نسبت به شرایط بدون تلقیح شد. Siddiqui و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بیوچار با فراهم کردن زیستگاه و تامین کربن برای باکتری‌های حل کننده فسفات می‌تواند ترکیبات کم محلول فسفر را حل کرده و به بهبود فراهمی فسفر در خاک کمک کند. بطور کلی مقدار فسفر در خاک غیرریزوسفری تیمارها در مقایسه با خاک ریزوسفری بالاتر بود (جدول۳). حضور بیوچار در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری منجر به افزایش معنی‌دار زیست فراهمی فسفر نسبت به تیمار شاهد در هر دو سطح خاک شد. Moritsuka و همکاران (۲۰۰۰) تغییرات فسفر را در ریزوسفر گیاه ذرت با بهره‌گیری از رایزوباکس مطالعه کردند. آن‌ها مشاهده کردند که غلظت فسفر در بخش مرکزی رایزوباکس (ریزوسفر) کاهش یافت. همچنین آنان دریافتند که میزان عناصر محلول در نزدیک ریشه کاهش یافت که میزان این کاهش به مقدار پخشیدگی عنصر در ریزوسفر بستگی داشت. بیوچار بقایای هرس مقدار فسفر را در خاک غیرریزوسفری نسبت به خاک ریزوسفر ۳۴/۵۷ درصد افزایش داد (جدول۳). تلقیح میکروبی بیشترین تاثیر را در افزایش فراهمی زیست فراهمی فسفر در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری داشت (جدول۴). باکتری‌های PGPR، ۲۶/۷۴ درصد زیست فراهمی فسفر را در خاک غیرریزوسفری نسبت به ریزوسفر افزایش دادند. به نظر می‌رسد جذب فسفر توسط ریشه گیاه و ریزجانداران منجر به تخلیه مخازن فسفر قابل دسترس در خاک‌های ریزوسفری شده و در نتیجه مقدار فسفر استخراج شده به روش اولسن سرعت آزادسازی فسفر در خاک‌های ریزوسفر پایین‌تر از خاک‌های غیرریزوسفری است.

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش منابع آلی و تلقیح میکروبی بر میزان فسفر قابل دسترس خاک

	مقدار فسفر قابل استفاده خاک($mgkg^{-1}$)	
تلقیح میکروبی	شاهد	بیوچار
تلقیح	۱۰/۱۳c	۲۹/۷۷a
بدون تلقیح	۷/۶۲d	۱۵/۹۳b
ضریب تغییرات	۴/۶۰	
$LSD_{0.05}$	۱/۲۶۲	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش منابع آلی و خاک بر میزان فسفر قابل دسترس خاک

	مقدار فسفر قابل دسترس خاک($mg\ kg^{-1}$)	
خاک	شاهد	بیوچار
ریزوسفر	۷/۸۲d	۱۹/۰۶a
غیرریزوسفر	۹/۹۲c	۲۵/۶۵b
ضریب تغییرات	۴/۶۰	
$LSD_{0.05}$	۱/۲۶۲	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین برهمکنش تلقیح میکروبی و خاک بر میزان فسفر قابل دسترس خاک

	مقدار فسفر قابل دسترس خاک ($mg\ kg^{-1}$)	
خاک	تلقیح	بدون تلقیح
ریزوسفر	۱۰/۰۱d	۱۶/۸۷b
غیرریزوسفر	۱۳/۵۴c	۲۳/۰۳a
ضریب تغییرات	۴/۶۰	
$LSD_{0.05}$	۱/۲۶۲	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

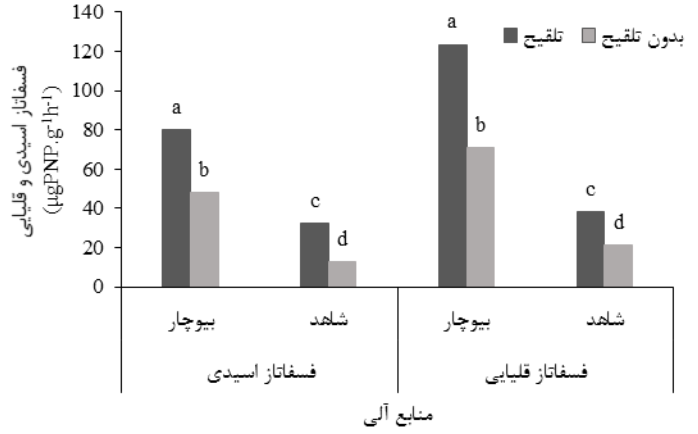
فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی ماده آلی، خاک و تلقیح میکروبی بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی ($p<۰/۰۰۱$) معنی‌دار بود. همچنین اثرات متقابل (ماده آلی× تلقیح میکروبی و ماده آلی × خاک) نیز بر میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی ($p<۰/۰۰۱$) و قلیایی ($p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$) معنی‌دار بود. در ارتباط با میزان فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی قلیایی ($p<۰/۰۰۱$) نتایج نشانگر معنی‌دار بودن اثر متقابل تلقیح میکروبی و خاک بر مقدار این شاخص‌ها بود. نتایج شکل ۱ نشان داد که میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی بیشتر از فسفاتاز اسیدی بود. تیمار مشترک بیوچار و تلقیح میکروبی بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی را به خود اختصاص داد. بطوریکه در تیمار بیوچار تلقیح باکتریایی منجر به افزایش که ۱/۶۶ و ۱/۷۴ برابری بترتیب میزان آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در مقایسه با تیمار بیوچار بدون تلقیح شد (شکل ۱- A). کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در مقایسه با فسفاتاز قلیایی با افزودن بیوچار به خاک دور از انتظار نبود چرا که خاک مورد مطالعه با pH قلیایی و شرایط آهکی (جدول۱) برای فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی مناسب‌تر است. بر پایه بررسی‌های انجام شده خاکستر بیوچار دارای کاتیون‌های بازی بوده و منجر به افزایش pH خاک می‌شودکه این افزایشpH خاک بدلیل افزودن بیوچار به خاک باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک می‌شود (Chen و همکاران ۲۰۰۰). اثر خاک ریزوسفری بر میزان فعالیت آنزیم‌ها در مقایسه با خاک غیرریزوسفری معنی‌دار بود (شکل۱-B). Balík و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی پیامد کاربرد کود آلی بر فعالیت‌های آنزیم‌های فسفاتاز در ریزوسفر گیاهان با بهره‌گیری از رایزوباکس گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی به طور معنی‌دار نسبت به توده خاک افزایش یافت. بر پایه نتایج، در شرایط بهره‌گیری از بیوچار، فعالیت آنزیم

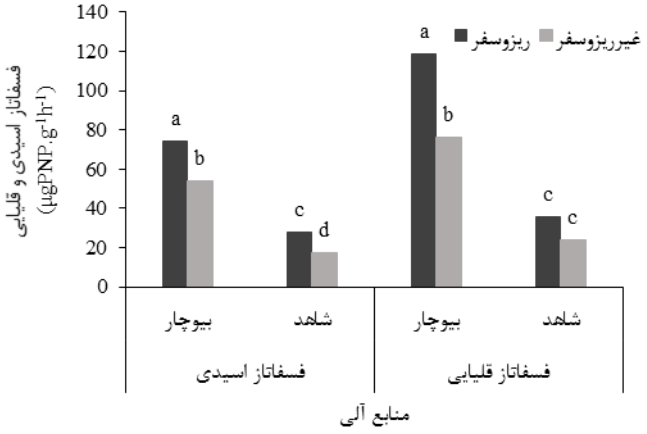
فسفاتاز اسیدی و قلیایی در ریزوسفر به ترتیب ۱/۳۷ و ۱/۵۵ برابر بیشتر از خاک غیرریزوسفر بود. همچنین، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی قلیایی در شرایط تلقیح باکتریایی، در خاک ریزوسفر ۱/۴۵ برابر بیشتر از فعالیت این آنزیم‌ها در خاک غیرریزوسفری بود (شکل ۲- C). بالا بودن فعالیت فسفاتاز قلیایی در تیمار تلقیح PGPR ممکن است بدلیل شرایط محیط رشد میکروبی باشد به‌عنوان مثال فسفاتاز اسیدی بیشتر توسط قارچها ترشح شده و pH مطلوب برای این آنزیم شرایط اسیدی تا خنثی بوده و فسفاتاز قلیایی بیشتر توسط باکتری‌ها ترشح شده و در pH > ۷ فعالیت بالاتری دارد (Eivazi و Tabatabai، ۱۹۷۷). افزایش فعالیت فسفاتاز قلیایی درخاک ریزوسفری نسبت به خاک غیرریزوسفری را می توان ناشی از فعالیت میکروبی و ریشه‌ای گیاه دانست.

بطور کلی می‌توان بیان کرد که معدنی‌شدن فسفر یک فرآیند آنزیمی است و آنزیم‌های فسفاتاز با کاتالیز واکنش‌ها، ترکیبات فسفر آلی به صورت فسفات‌ها در محلول خاک رها می‌کنند. وقتی ماده آلی همانند بیوچار به خاک اضافه می‌شود ریزجانداران آنزیم‌های فسفاتاز به محلول خاک ترشح می-کنند تا واکنش‌های معدنی شدن هیدرولیزی را کاتالیز کند. در صورتی‌که فسفر معدنی شود، یا توسط گیاه جذب و یا در ساختمان سلول‌های میکروبی غیر متحرک و یا اینکه کمپلکس معدنی غیر محلول را تشکیل می‌دهند. نتایجی که از فسفر قابل دسترس در خاک مشخص شد اثر متقابل تلقیح میکروبی و منابع آلی و اثر متقابل منابع آلی و خاک نشان داد که تیمار بیوچار بقایای هرس بیشترین مقدار فسفر قابل استفاده را نسبت به تیمار شاهد داشت. لذا از بالا بودن میزان آنزیم فسفاتاز در این تیمار در تلقیح با باکتری‌های حل کننده فسفات می‌توان نتیجه گرفت که فسفر معدنی شده احتمالا توسط گیاه جذب شده است. هر چند در مورد رابطه بین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و اسیدی با فسفر قابل دسترس خاک اختلاف وجود دارد (Garg و Bahl، ۲۰۰۸؛ Yuو همکاران، ۲۰۰۶). برخی محققین گزارش کردند رابطه مستقیم بین مقدار فسفر قابل دسترس خاک و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی وجود دارد (Colvan و همکاران، ۲۰۰۱؛ Garg وBahl ، ۲۰۰۸). همچنین، شواهدی هم مبنی بر وجود رابطه منفی بین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و فسفر قابل استفاده خاک گزارش شده است (Yuو همکاران، ۲۰۰۶). نتیجه‌ای که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد نشان داد که ارتباط مستقیمی در میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در تیمار بیوچار مشاهده شد. تیمار بیوچار در اثر متقابل منابع آلی و خاک، منابع آلی و تلقیح میکروبی بیشترین مقدار فسفر قابل دسترس خاک را داشت. همچنین در اثر متقابل تلقیح میکروبی و خاک نیز تلقیح باکتریایی بیشترین مقدار فسفر قابل استفاده را داشت که نشان دهنده ارتباط مستقیم با آنزیم‌های فسفاتاز می‌باشد.

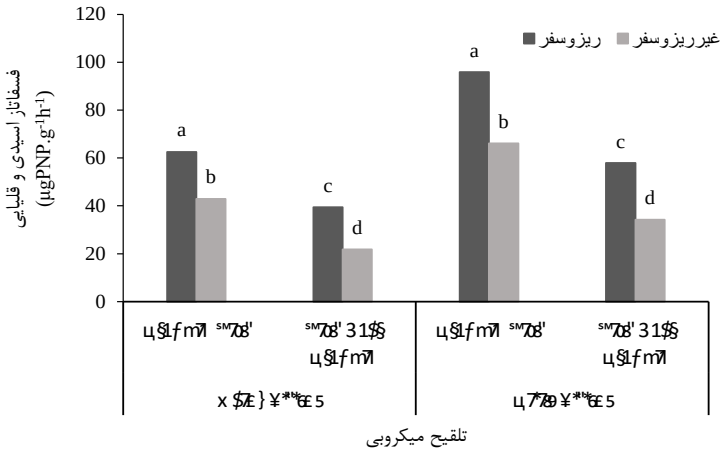
(A



(B



(C



شکل ۱- مقایسه میانگین منابع آلی و تلقیح میکروبی، منابع آلی و خاک بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی
ضریب تغییرات آنزیم‌های فسفومنواسترازهای اسیدی و قلیایی به‌ترتیب ۱۲/۸۹ و ۱۰/۵۶ بود.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که افزودن بیوچار به خاک در تلقیح با باکتری‌های PGPR در محیط ریشه منجر به افزایش فراهمی فسفر در خاک گردید. به دنبال کاربرد مواد آلی، ریزجانداران به سرعت رشد کرده و افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی همانند افزایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز در ریزوسفر خاک شد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات با استقرار در منطقه ریزوسفر از ترشحات ریشه استفاده نموده و با ترشح آنزیم‌ها، شرایط را برای تبدیل فسفر نامحلول به شکل قابل استفاده فراهم کرد. بنابراین تبدیل بقایای هرس درختان سیب و انگور به بیوچار و بهره‌گیری از پتانسیل ریزجانداران حل کننده فسفات بیولوژیکی به عنوان مکمل برای کودهای شیمیایی گردیده و اثرات آن‌ها به صورت بهبود زیست فراهمی فسفر و کاهش کودهای شیمیایی نمایان می‌شود.

منابع

Atkinson, C.J., Fitzgerald, J.D. and Hipps, N.A .2010. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: A review. Plant and Soil, 337, 1–18.

Balík, J., Pavlíková, D. and Vaněk, V. 2007. The influence of long-term sewage sludge application on the activity of phosphatases in the rhizosphere of plants. Plant and Soil Environmental, 53, 375–381.

Chan, K.Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A. and Joseph, S. 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. Australian Journal of Soil Research, 46,437.

Chen, J., Liu, X., Zheng, J., Zhang, B., Lu, H., Chi, Z., Pan, G., Li, L., Zheng, J. and Zhang, X. 2013. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. Applied Agriculture and Soil Ecology, 71, 33–44.

Chintala, R., Mollinedo, J., Schumacher, T.E., Malo, D.D and Julson, J.L. 2013. Effect of biochars on chemical properties of acidic soil. Archives of Agronomy and Soil Science, 60, 393–404.

Colvan, S.R., Syers, J.K., and O'Donnel, A.G. 2001. Effect of long-term fertiliser use on acid and alkaline phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in managed grassland. Biology and Fertility of Soils, 34, 258–263.

Eivazi, F., and M.A. Tabatabai. 1977. Phosphatase in soils. Soil Biology and Biochemistry, 9, 167-172.

Garg, S., and Bahl, G.G. 2008. Phosphorus availability to maize as influenced by organic manures and fertilizer phosphorus associated with phosphatase activity in soils. Bioresource Technology, 5773–5777.

Liang, Y., Nikolic, M., Peng, Y., Chen, W. and Jiang, Y. 2005. Organic manure stimulates biological activity and barley growth in soil subject to secondary salinization. Soil Biology and Biochemistry, 37,1185–1195.

Liu, Y., Yang, M., Wu, Y., Wang, H., Chen, Y. and Wu, W. 2011. Reducing CH4 and CO2 emission from waterlogged paddy soil with biochar. Journal of Soils and Sediments, 11,930–939.

Mishra, R.R. 2007. Soil microbiology. Translated by: A. Fallah, H. Besharati, & H. Khosravi, Aeeizh publisher, 179.

Moritsuka, N., Yanai, J. and Kosaki, T. 2000. Effect of plant growth on the distribution and forms of soil nutrients in the rhizosphere, Soil Science and Plant Nutrition, 46, 439-447.

Quiquampoix, H. and Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) Organic phosphorous in the environment. CABI, Wallingford, UK, 89–112.

Rajkovich, S. Enders, A. Hanley, K. Hyland, C. Zimmerman, A.R. and Lehmann, J. (2011). Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. Biology and Fertility of Soils, 48(3), 271-284.

Reis, V.J., Reis, F.B.J., Quesada, D.M., de. Oliveira, O.C.A., Alves, B.J.R., Urquiaga, S. and Boddey, R.M. 2001. Bilogical nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. Australian Journal of Plant Physiology, 28,837–844.

Siddiqui, A.R., Nazeer, S., Piracha, M.A., Saleem, M.M., Siddiq, I., Shahzad, S.M. and Sarwar, G. 2016. The production of biochar and its possible effects on soil properties and phosphate solubilizing bacteria, Journal of Applied Agriculture and Biotechnology, 1(1), 27−40.

Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry, 1, 301-307.

Yuan, L., Fang, D.H., Wnag, Z.H., Shun, H. and Huang, J.G. 2000. Bio-mobilization of potassium from clay minerals: I. By ectomycorhizas. Pedosphere, 10, 339- 346.

Yu, S., Hea, Z.L., Stoffellaa, P.J., and Calverta, D.V., Yanga X.E., Banksa D.J., and Baligar V.C. 2006.Surface runoff phosphorus (P) loss in relation to phosphatase activity and soil P fractions in Florida sandy soils under citrus production. Soil Biology and Biochemistry, 38, 619–628.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of biochar and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on phosphatase enzymes activity and bioavailability of phosphorus

R.Vahedi[*1], MH. Rasouli-sadaghiani [2]

[1] PhD Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

[2] Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Biochar and microorganisms affect the solubility and mobility of soil phosphorus in the rhizosphere and thus would improve its bioavailability. In order to evaluate the effect of pruning waste biochar of apple and grape trees and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on phosphatase activity and phosphorus bioavailability in calcareous soil, an experiment was carried out using a completely randomized design under greenhouse conditions in Rhizobox. The factors included the organic matter (pruning waste biochar and control), microbial inoculation (PGPR and Control (without microbial inoculation)) and soil (rhizosphere and non-rhizosphere soil). Some soil properties including available phosphorus of soil, activity of acid and alkaline phosphomonostases enzymes were measured. The results showed that application of biochar and microbial inoculation led to significant changes in the studied parameters. Furthermore, biochar increased the acidic and alkaline phosphatase enzymes activities in the rhizosphere soil by 1.37 and 1.55 times compared with non-rhizosphere, respectively. However, the content of phosphorus availability in the non-rhizosphere soil of the biochar treatment was 1.34 times higher than rhizosphere soil. In general, the use of organic matter and microbial inoculation has a significant effect on bioavailability of phosphorus.

Keywords: pruning waste, Phosphate-solubilizing microorganisms, Rhizobox

[*] Corresponding author, Email: r.vahedi@urmia.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر بیوچار بقایای هرس بر تنفس در حضور باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد در شرایط رایزوباکس

میرحسن رسولی صدقیانی [۱]، رقیه واحدی [۲*]

[۱] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

فعالیت‌های بیولوژیکی خاک در مناطق خشک و نیمه خشک بدلیل کمبود ماده آلی با محدودیت کربن مواجه است. لذا بیوچار همراه با تلقیح میکروبی از راه‌کارهای بهبود خصوصیات بیولوژیک در خاک‌های آهکی می‌باشد. به منظور بررسی تاثیر بیوچار بر تنفس پایه و برانگیخته در حضور باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (PGPR) آزمایشی بصورت فاکتوریل با طرح کاملا تصادفی در رایزوباکس اجرا گردید. فاکتورها شامل منابع آلی (بیوچار بقایای هرس و شاهد)، تلقیح میکروبی (تلقیح باکتری‌های PGPR و بدون تلقیح) و خاک (خاک ریزوسفر و غیرریزوسفر) بودند. پس از پایان دوره رشد گیاه، تنفس پایه، تنفس برانگیخته با سوبسترا و کسر متابولیک تعیین گردید. نتایج نشان داد که کاربرد بیوچار و تلقیح میکروبی باعث افزایش معنی‌دار تنفس پایه، برانگیخته و کسر متابولیک نسبت به تیمار بدون تلقیح و بیوچار شد. همچنین بیوچار بقایای هرس مقدار تنفس پایه و برانگیخته را به ترتیب ۱۰/۴۹و ۱۶/۸۰ برابر در خاک ریزوسفر نسبت به غیرریزوسفر افزایش داد. تلقیح باکتریایی تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری نسبت به تیمار بدون تلقیح در هر دو سطح خاک داشت. در حالی‌که میزان کسر متابولیک اختلاف معنی‌داری در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری نشان نداد. بنابراین کاربرد بیوچار و باکتری‌های PGPR تأثیر مثبتی در بهبود برخی فعالیت‌های بیولوژیکی خاک دارد.

کلمات کلیدی: ماده آلی، خاک آهکی، ریزوسفر

مقدمه

شاخص‌های بیولوژیک همانند تنفس پایه (BR[1]) و تنفس برانگیخته با سوبسترا (SIR[2]) در مباحث میکروبی به خوبی شناخته شده و شاخص‌های حساسی برای تعیین اثر متغیرهای محیطی بر فعالیت میکروبی خاک هستند و به گونه وسیعی برای اندازه‌گیری و ارزیابی فعالیت میکروبی خاک و جمعیت میکروبی خاک بکار رفته‌اند که در ارزیابی‌های مرتبط با کیفیت و سلامت خاک استفاده می‌شود. با توجه به این‌که فرآیندهای میکروبی کنترل کننده فرآیندهای اکولوژیک در اکوسیستم و حاصلخیزی خاک نیز می‌باشند. جامعه میکروبی خاک مسئول تنظیم چرخه‌ی عناصر غذایی در خاک است و با فراهم ساختن شرایط جذب عناصر غذایی نقشی مهم در رشد گیاه و تولیدات کشاورزی دارد (Ghollarata و Raiesi، ۲۰۰۷). فراوانی ترکیبات آلی در ریزوسفر، منجر به افزایش تنفس می‌شود چرا که این مواد منبع عناصر غذایی و انرژی لازم برای آن‌ها محسوب می‌گردند. تنفس خاک که به آن تنفس پایه نیز گفته می‌شود، نشان‌دهنده‌ی فعالیت‌های بیولوژیکی است. افزون بر این، تنفس برانگیخته با سوبسترا یکی از روش‌های پایه‌ای برای برآورد کمی زیست‌توده میکروبی خاک به عنوان بخش بسیار فعال و ناپایدار کربن آلی خاک بررسی شده است (Lewandowski و Zumwinkle، ۱۹۹۹). در محیط خاک مهم‌ترین عامل محدود کننده فعالیت میکروبی قابلیت دسترسی به سوبسترای کربنه‌ی قابل مصرف است که با ورود سوبسترای کربنه به خاک جمعیت میکروبی در اطراف سوبسترا افزایش می‌یابد (Chen و همکاران ۲۰۰۳). با توجه به این‌که وجود ماده آلی در خاک بیانگر کیفیت و سلامت خاک است، لذا یکی از راه‌های صحیح و عملی برای بهبود ماده آلی خاک، مدیریت استفاده صحیح از بقایای هرس درختان میوه است. بقایای هرس درختان با تبدیل شدن به بیوچار علاوه بر جایگزینی یا فراهم کردن عناصر غذایی در خاک و بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نقش مهمی نیز بر پویایی و زندگی میکروارگانیسم‌های خاک و ایجاد نوعی تعادل دینامیکی در اجزای زنده و غیر زنده خاک ایفا می‌کنند. با این حال، اطلاعات کمی و همچنین نگرانی‌های زیادی درباره تبدیل بقایای هرس درختان به بیوچار بر خلاف سایر بقایای سبز وجود دارد. بیوچار ماده جامد غنی از کربن تولید شده توسط تجزیه گرمایی (Pyrolysis) یا گرماکافت توده‌های زیستی با مقدار کمی اکسیژن یا بدون اکسیژن می‌باشد. مقادیر نسبی و ویژگی بیوچار توسط شرایط گرما کافت مانند دما، میزان حرارت یا سرعت دمایی، مدت زمان، فشار و نوع ماده‌ی اولیه کنترل

* ایمیل نویسنده مسئول: r.vahedi@urmia.ac.ir

[1] Basal respiration
[2] Substrate-induced respiration

می‌شود (Roberts و همکاران ۲۰۱۰). Brik و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده کردند که تنفس پایه، رشد جمعیت و کارایی جذب میکروب‌ها بصورت خطی و بطور قابل توجهی با افزایش سطح کاربرد بیوچار چوب (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم در کیلوگرم خاک) افزایش یافته است. از طرف دیگر میکروارگانیسم‌هایی همانند باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (PGPR[3]) در خاک قادر به تحریک و افزایش فعالیت های میکروبی خاک می‌باشند (Kaur و Reddy، ۲۰۱۴). در یک سیستم ریشه‌ای فعال، ترکیبات آلی به‌طور منظم به ریزوسفر آزاد می‌شوند که باعث رشد و افزایش فعالیت جامعه‌ی میکروبی خاک شده و سلامت سیستم را بهبود می‌بخشند. بنابراین تلقیح بذر گیاهان با جمعیت‌های بالای باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌تواند تعداد این باکتری‌ها را در ریزوسفر به حد مطلوب رسانده و در نتیجه منجر به افزایش شاخص‌های بیولوژیک در خاک شود. مشاهده و اندازه‌گیری سیستم ریشه در گیاه بسیار وقت‌گیر است و مطالعه‌ی خاک ریزوسفری اغلب با مشکلاتی همراه است زیرا لایه‌ی خاکی که مستقیما تحت تاثیر ریشه قرار می‌گیرد بسیار نازک بوده و از طرف دیگر توزیع ریشه در خاک بسیار گسترده است، این عوامل سبب می‌شود که بخش کوچکی از حجم خاک به خاک ریزوسفری اختصاص یابد. بنابراین از رایزوباکس[4] به منظور مطالعه دقیق‌تر فرایندهای ریزوسفری، افزایش تراکم ریشه با محدود کردن رشد ریشه‌ها در حجم معینی از خاک و تسریع در نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری استفاده می‌شود. استفاده از بیوچار به عنوان شکل مقاوم به تجزیه کربن آلی در خاک‌ها می‌تواند سبب بهبود خصوصیات بیولوژیکی خاک‌های آهکی شود. همچنین روش رایزوباکس از تکنیک‌های نوین در ارزیابی خاک ریزوسفری بوده و به همراه تلقیح میکروبی در این شرایط بهتر می‌تواند فرایندهای میکروبی- ریزوسفری را توجیه نماید. لذا هدف از این تحقیق بررسی تاثیر بیوچار و تلقیح باکتری‌های PGPR بر تنفس خاک آهکی در شرایط رایزوباکس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه اجرا گردید.فاکتورها شامل ماده آلی (بیوچار بقایای هرس و شاهد بدون ماده آلی)، تلقیح میکروبی (باکتری‌هایPGPR و شاهد بدون تلقیح) و خاک (خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری) بود.. نمونه‌برداری از خاک غیرزراعی با بافت سبک از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری شهرستان سلماس واقع در استان آذربایجان غربی تهیه شد و بعد از هوا خشک کردن از غربال ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس در دستگاه اتوکلاو و با دمای ۱۲۱درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲ ساعت استریل شدند. قبل از استریل کردن خاک، برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (جدول۱). برای تهیه بیوچار بقایای هرس درختان میوه از باغ‌های استان آذربایجان غربی شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد. سپس در آون در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. نمونه‌های خشک شده ابتدا به راکتور (استوانه فلزی به قطر۷ و ارتفاع ۳۱ سانتی‌متر) و سپس به کوره الکتریکی برای تولید بیوچار منتقل گردید. تولید در دمای ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. در نهایت بیوچار از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شد. pH و EC بیوچار در عصاره صاف شده سوسپانسیون ۱ به ۱۰ بیوچار به آب (ASTM، ۲۰۰۹)، فسفر کل بیوچار به روش هضم با اسید (Rajkovich و همکاران ۲۰۱۱)، نیتروژن و کربن بیوچار نیز به روش سوزاندن خشک با دستگاه Rajkovich) ESC 4010 CHNSO Analyzer و همکاران ۲۰۱۱) اندازه‌گیری گردید (جدول۱). جهت انجام آزمون گلخانه‌ای و به‌منظور کشت گیاه از رایزوباکس استفاده شد. باکس‌های ریزوسفر در ابعاد۲۰×۱۵×۲۰ سانتی‌متر (طول، عرض، ارتفاع) استفاده شد. فضای هر باکس با استفاده از صفحات مشبک نایلونی ۳۲۵ مش به دو قسمت: ۱) ناحیه ریزوسفری به ضخامت دو سانتی‌متر، ۲) ناحیه غیرریزوسفری به ضخامت ۵/۸ سانتی‌متر (این ناحیه در طرف دیگر ناحیه ریزوسفری نیز با همان ضخامت تکرار شد) تقسیم شد (Youssefو Chino ، ۱۹۸۷). برای انجام آزمایش گلخانه‌ای، بیوچار برحسب ۱/۵ درصد کربن آلی خالص به خاک اضافه و مخلوط شد و سپس به باکس‌ها منتقل گردید. در تیمارهای شاهد بدون ماده آلی خاک استریل حاوی تلقیح میکروبی استفاده گردید. در تیمارهای شاهد بدون تلقیح میکروبی نیز خاک استریل حاوی ماده آلی استفاده گردید. برای تلقیح میکروبی از سویه‌های میکروبی موجود در بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه که شامل سودوموناس‌های گروه فلورسنت (ترکیبی از گونه‌های P aeruginosa، P. fluorescens و P. putida) بودند، استفاده گردید. برای تلقیح از روش اضافه کردن محلول باکتری‌ها فوق بصورت مخلوط (یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون برای هر بذر) به خاک اطراف بذرها همزمان با کاشت استفاده شد.

[3] Plant growth promoting rhizobacteria
[4] Rhizobox

پس از افزودن مایه‌های تلقیح، برای کشت گیاه، بذرهای گندم (Triticum aestivum L.) رقم پیشتاز (ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد) به تعداد شش بذر در قسمت ریزوسفری رایزوباکس‌ها کشت گردیدند. پس از جوانه زدن بذرها، چهار بوته (بوته‌های سالم‌تر و قوی‌تر) نگه‌داشته شدند. در طول دوره کشت از آب مقطر به منظور آبیاری و جهت تامین مواد غذایی مورد نیاز برای تغذیه گیاهان از محلول غذایی Rorison عاری از فسفر استفاده گردید. در پایان پس از ۶۵ روز رایزوباکس‌ها باز شدند. از هر رایزوباکس دو نمونه خاک، یکی از بخش ریزوسفر و دیگری از بخش غیرریزوسفری برداشت شد. تنفس پایه (Anderson، ۱۹۸۲) و تنفس برانگیخته با سوبسترا (Alef و Nannipieri، ۱۹۹۵) اندازه‌گیری شدند. همچنین برای برآورد کسر متابولیکی(Anderson و Domsch،۱۹۹۰) از تقسیم میزان تنفس پایه بر کربن زیست توده میکروبی (Jenkinson و Ladd، ۱۹۸۱) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار MSTATC و رسم شکل‌ها با نرم افزار Execl انجام گرفت.

جدول-۱ برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شنی و بیوچار

	بافت خاک	pH	EC	کربن آلی	کربنات کلسیم معادل	نیتروژن کل	C/N	فسفر قابل استفاده	فسفر کل	پتاسیم قابل استفاده
			$ds\ m^{-1}$		٪				$mg.kg^{-1}$	
خاک	شن لومی	۷/۵۳	۰/۴۷	۰/۲۵	۱۴/۲۵	۰/۰۸		۷/۶۴		۹۸
بیوچار بقایای هرس سیب و انگور		۷/۲۹	۰/۰۸	۶۷/۵۳		۰/۵۴	۱۲۵/۰۵		۲۷۴۸/۰۷	

نتایج و بحث

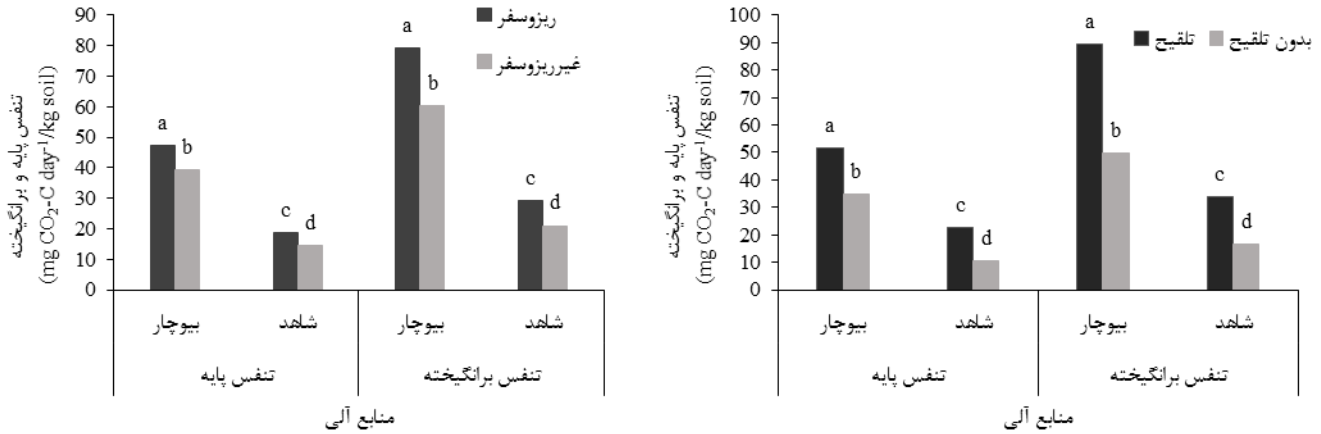
تنفس پایه و تنفس برانگیخته با سوبسترا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی و اثرات متقابل ماده آلی، تلقیح میکروبی و خاک بر تنفس پایه و تنفس بر انگیخته با سوبسترا معنی‌دار($p<۰/۰۰۱$) بود. بیوچار سبب افزایش تنفس پایه و برانگیخته شد که این افزایش در حضور باکتری‌های PGPR، بترتیب ۱/۴۹ و ۱/۸۰ برابر بیشتر از شرایط بدون تلقیح بود (شکل ۱-A). با افزودن ماده آلی به خاک تفاوت معنی‌داری در تنفس پایه و برانگیخته در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری مشاهده شد. بطوریکه بیشترین میزان تنفس پایه (۴۷/۱ میلی‌گرم دی‌اکسید کربن در هر کیلوگرم خاک در روز) و بر انگیخته (۷۹/۱ میلی‌گرم دی‌اکسید کربن در هر کیلوگرم خاک در روز) در خاک ریزوسفری مربوط به تیمار بیوچار بود (شکل۱-B). باکتری‌های PGPR تاثیر معنی داری بر میزان تنفس پایه و برانگیخته در خاک ریزوسفری و خاک غیرریزوسفری نسبت به تیمار شاهد در هر دو سطح خاک داشتند (شکل۱-C). این باکتری‌ها منجر به افزایش ۱/۲۳ و ۱/۳۱ برابری تنفس پایه و برانگیخته در خاک ریزوسفر در مقایسه با غیرریزوسفر شدند.

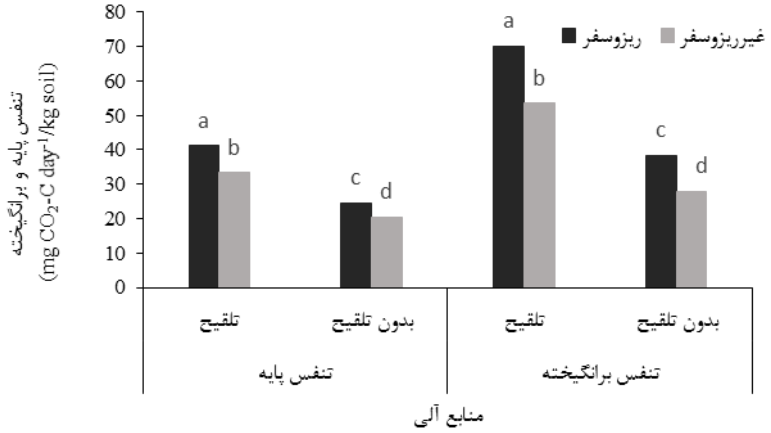
بیوچار تهیه شده از چوب می‌تواند فعالیت‌های میکروبی در خاک را با مناسب کردن زیستگاه، رطوبت، کربن و عناصر مغذی لبایل برای میکروارگانیسم-ها افزایش دهد. همچنین قطر منافذ۸۰-۲ میکرومتر در بسیاری از بیوچارهای مشتق شده از چوب مشاهده شده است، این محدوده اندازه منافذ می‌تواند فعالیت‌های میکروارگانیسم‌ها را پشتیبانی کند. بنابراین ایجاد چنین خلل و فرج در بیوچار قابل دسترس برای باکتری‌ها باعث افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها در تعامل با بیوچار می‌شود (Hammer و همکاران ۲۰۱۴). افزایش کوتاه مدت در فعالیت و همچنین تنفس خاک بلافاصله پس از کاربرد بیوچار مرتبط با اجزای لبایل مرتبط با بیوچار تازه تهیه شده می‌باشد (مقایسه بین بیوچار تازه تهیه شده و بیوچار قدیمی‌تر در خاک) (Smith و همکاران ۲۰۱۰). این امر به ویژه برای بیوچاری که از چوب در دمای گرماکافت پایین تهیه می‌شود صادق است که منجر به حفظ طیف گسترده‌ای از ترکیبات شامل قندها وآلدئیدها در سطح خود می‌شود که تاثیراتشان بر رشد میکروبی با گلوکز یکسان است (Smith و همکاران ۲۰۱۰). همچنین Vahedi و همکاران (۲۰۱۸) نیز با مطالعه‌ی خصوصیات کیفی خاک آهکی تیمار شده با بیوچار و کمپوست در حضور باکتری‌های محرک رشد گیاه مشاهده کردند که بیوچار به همراه تلقیح باکتریایی سبب افزایش معنی‌دار تنفس پایه و برانگیخته با سوبسترا شد، البته این افزایش در مقایسه با کمپوست کمتر بود. بیوچار با C/N بالا می‌تواند در تنفس (پایه و برانگیخته با سوبسترا) موثر باشد (جدول۱). Tejada و Gonzalez (۲۰۰۶) گزارش کردند که وقتی ماده آلی با نسبت C/N بالا به خاک اضافه می‌شود، فرایند آلی شدن اتفاق می‌افتد، و میزان جمعیت میکروبی و فعالیت آن‌ها افزایش یافته که به تبع آن میزان تنفس (پایه و برانگیخته باسوبسترا) افزایش می‌یابد. همچنین در شکل (۱-C) مشاهده شد که تلقیح باکتریایی منجر به افزایش تنفس شد. با توجه به اینکه ریزوسفر به عنوان نقطه داغ فعالیت و اشغال میکروبی می‌باشد که در مقایسه با خاک غیریزوسفری، جایی که

منابع آلی در حد پایینی است، ریزوسفر با سطوح بالاتری از عناصر، منبع تامین کننده عناصر غذایی طی فرآیند فتوسنتز شده و باعث می‌شود محیط مناسبی برای میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها ایجاد شود و در نهایت منجر بهبود فعالیت‌های بیولوژیک در خاک شود (Hinsinger و همکاران، ۲۰۰۵).

(A (B



(C



شکل۱- مقایسه میانگین منابع آلی و تلقیح میکروبی، منابع آلی و خاک بر میزان تنفس پایه و برانگیخته

کسر متابولیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی منابع آلی، تلقیح میکروبی و خاک بر کسر متابولیک معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) شد. اثرات متقابل منابع آلی × تلقیح میکروبی (p<۰/۰۰۱)، منابع آلی × خاک (p<۰/۰۵)، تلقیح میکروبی ×خاک (p<۰/۰۵) بر کسر متابولیک معنی‌دار شدند. مقایسه میانگین دادها نشان داد که بیشترین میزان کسر متابولیک در تیمار بیوچار بقایای هرس تلقیح باکتریایی مشاهده شد (جدول۲). بیوچار به‌طور معنی‌دار میزان کسر متابولیک را در هر دو سطح خاک (ریزوسفری و غیرریزوسفری) نسبت به تیمار شاهد افزایش داد و در تمامی تیمارها میزان این شاخص در خاک غیرریزوسفر و ریزوسفر معنی‌دار نبود. نتایج نشان داد که بیوچار سبب افزایش (۱/۵۰ برابری) کسر متابولیک در خاک ریزوسفری نسبت به خاک ریزوسفری تیمار شاهد گردید (جدول۳). اثر ریزوسفر و تلقیح میکروبی تاثیر معنی‌داری در کسر متابولیک در مقایسه با غیرریزوسفر در خاک نداشت، اما این شاخص در هر دو سطح خاک در تیمار بیوچار در حضور باکتری‌های PGPRبالاتر از شاهد بود (جدول ۴).

نسبت دی‌اکسید کربن متصاعد شده به کربن زیست توده میکروبی (کسر متابولیک) شاخصی از کارایی استفاده از سوبسترا توسط ریزموجودات است. هرچه کسر متابولیک بزرگتر باشد، منبع انرژی آنابولیسم میکروارگانیسم‌ها از کاتابولیسم کمتر است، به عبارتی هرچه کسرمتابولیک بزرگتر باشد، احتمال تجزیه میکروفلور بزرگتر و به دنبال آن متوسط سن میکروفلور کوچکتر خواهد بود (Meyer و همکاران، ۱۹۹۶). در تحقیق حاضر طبق آنچه

که گزارش شد تنفس پایه در تیمار بیوچار بالا بود. بنابراین دور از انتظار نبود که این تیمار موجب افزایش کسر متابولیک شود. چرا که این شاخص در حضور تنش‌های محیطی مختلف افزایش می‌یابد (Bunemann و همکاران، ۲۰۰۶). احتمالا تنش ایجاد شده در تیمار بیوچار میزان C/N بالا بود. میکروارگانیسم‌ها با وارد شدن تنش‌ها به خاک، فعالیت‌های زیستی خود را به گونه‌ی چشم‌گیری افزایش می‌دهند و انرژی بیشتری را برای روبرو شدن با تنش و زنده ماندن در زیستگاه به کار می‌برند که با افزایش تنفس نمایان می‌شود (Meyer و همکاران، ۱۹۹۶؛ رئیسی و آقابابائی، ۱۳۹۰). در تمامی تیمارها میزان این شاخص در خاک ریزوسفر و غیرریزوسفر معنی‌دار نبود. میزان کسر متابولیک کمتر نشان دهنده سطح پایین تنش در جامعه میکروبی خاک است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل منابع آلی و تلقیح میکروبی بر میزان کسر متابولیک

	کسر متابولیک ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$)	
تلقیح میکروبی	شاهد	بیوچار
تلقیح	۰/۰۸b	۰/۱۰a
بدون تلقیح	۰/۰۶d	۰/۰۷c
$LSD_{0.05}$	۰/۰۰۵	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل منابع آلی و خاک بر میزان کسر متابولیک

	کسر متابولیک ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$)	
خاک	شاهد	بیوچار
ریزوسفر	۰/۰۶b	۰/۱۰a
غیرریزوسفر	۰/۰۶b	۰/۰۹a
$LSD_{0.05}$	۰/۰۰۵	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح میکروبی و خاک بر میزان کسرمتابولیک

	کسر متابولیک ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$)	
خاک	تلقیح	بدون تلقیح
ریزوسفر	۰/۰۶b	۰/۰۹a
غیرریزوسفر	۰/۰۶b	۰/۰۹a
$LSD_{0.05}$	۰/۰۰۵	

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمالی ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که افزودن ماده آلی همراه با تلقیح میکروبی به خاک منجر به افزایش میزان تنفس پایه و برانگیخته با سوبسترا شد. همچنین تفاوتی در کسر متابولیک در خاک ریزوسفر و غیرریزوسفر تلقیح شده با باکتری‌های PGPR مشاهده نشد که بیانگر عدم تنش در دو سطح خاک بود. در بوم شناسی میکروبی، پارامترهای بیولوژیکی در خاک نظیر تنفس پایه و تنفس برانگیخته با سوبسترا به خوبی شناخته شده و شاخص‌های حساسی برای تعیین اثر متغیرهای محیطی بر فعالیت میکروبی خاک هستند و به گونه وسیعی برای اندازه‌گیری و ارزیابی فعالیت میکروبی خاک وجمعیت میکروبی خاک بکار رفته‌اند که در ارزیابی‌های مرتب با کیفیت و سلامت خاک استفاده می‌شود. با توجه به اینکه فرآیندهای میکروبی کنترل کننده فرآیندهای اکولوژیک در اکوسیستم و حاصلخیزی خاک می‌باشند. لذا کاربرد بیوچار و استفاده از پتانسیل بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها می‌تواند

یکی از راه‌های افزایش کیفیت خاک‌های کشاورزی باشد. البته لازم است که نتایج این مطالعه با انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای با کشت گیاهان مختلف تایید گردد.

منابع

رئیسی، ف.، آقابابائی، ف. ۱۳۹۰. تجزیه‌پذیری برخی پسماندهای گیاهی و پیامد کاربرد آن‌ها بر تنفس و زیست توده میکروبی، و فعالیت آنزیمی خاک. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۵(۴)، ۸۶۳-۸۷۳.

Alef, K. and Nannipieri, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London.

Anderson, J.P.E. 1982. Soil Respiration. PP. 831-872. In: A. L. Page et al. (eds). Methods of Soil Analysis. 2nd ed. Part 2. American Society of Agronomy, U.S.A.

Anderson, T.H. and Domsch, K.H. 1990. Application of eco-physiological quociente (qCO_2 and Dq) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. Soil Biology and Biochemistry, 22, 251–255.

ASTM standard. 2009. Standard test method for chemical analysis of wood charcoal. American Society for Testing and Materials (ASTM) International: Conshohocken, PA.

Chen, C.R., Condron, L.M., Davis, M.R. and Sherlick, R.R. 2003. Seasonal changes in soil phosphorus and associated microbial properties under adjacent grassland and forest in New Zealand. Forest Ecology and Management, 177, 35-43.

Birk, J.J., Steiner, C., Teixiera, W.C., Zech, W. and Glaser, B. 2009. Microbial response to charcoal amendments and fertilization of a highly weathered tropical soil. In: Woods, W.I. (Ed.), Amazonian Dark Earths: Wim Sombroeks Vision. Springer, Netherlands, 309-324.

Bunemann, E.K., Schwenke, G.D. and Van Zwieten, L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms, A paper review, Australian Journal of Soil Research, 44, 379-406.

Ghollarata, M. and Raiesi, F. 2007. The adverse effect of soil salinization on the growth of Trifolium alexandrinum L. and associated microbial and biological properties in a soil from Iran. Soil Bioliology and Biochemistry, 39, 1699-1702.

Hammer, E.C., Balogh-Brunstad, Z., Jakobsen, I., Olsson, P.A., Stipp, S.L.S. and Rillig, M.C. 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. Soil Biology Biochemistry, 77, 252–260.

Hinsinger, P., Gobran, G. R., Gregory, P. J. and Wenzel, W. W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytology, 168: 293-303.

Jenkinson, D.S., and Ladd, J.N .1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Powl EA, Ladd JN (eds) Soil biochemistry.Dekker, New York, 415–417.

Kaur, G. and Reddy, M.S.H. 2014. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. European Soil Biology, 158, 163-168.

Lewandowski, A. and Zumwinkle, M. 1999. Assessing the soil system a review of soil quality literature, Minnesota Department of Agriculture, Energy and Sustainable Agriculture Program.

Meyer, K., Joergensen, R.G. and Meyer, B. 1996. The effects of reduced tillage on microbial biomass C sandy loess soils. Applied Soil Ecology, 5, 71-79.

Rajkovich, S. Enders, A. Hanley, K. Hyland, C. Zimmerman, A.R. and Lehmann, J. 2011. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. Biology and Fertility of Soils, 48(3), 271-284.

Roberts, K.G., Gloy, B.A., Joseph, S., Scott, N.R. and Lehmann, J .2010. Life cycle assessment of biochar systems: Estimating the energetic, economic, and climate change potential. Environmental Science and Technology, 44, 827-833.

Smith, J.L., Collins, H.P. and Bailey, V.L. 2010. The effect of young biochar on soil respiration. Soil Biology and Biochemistry, 42, 2345–2347.

Tejada, M. and Gonzalez, J.L. 2006. Crushed cotton gin compost on soil biological properties and rice yield. European Journal of Agronomy, 25, 22–29.

Vahedi, R., Rasouli-Sadaghiani, M.H. and Barin, M. 2018. Evaluation of the Qualitative Characteristics of the Treated Calcareous Soils with Compost and Biochar in the Presence of Plant Growth Promoting Bacteria. Iranian Journal of Soil and Water Research, 50 (2), 259-272 (In Farsi).

Youssef R. A. and Chino M. 1987. Studies on the behavior of nutrients in the rhizosphere I: Establishment of a new rhizobox system to study nutrient status in the rhizosphere. Journal of Plant Nutrition, 10, 1185-1195.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of pruning waste biochar on soil microbial respiration in the presence of growth promoting bacteria (PGPR) under rhizobox conditions

MH. Rasouli-sadaghiani [1], R.Vahedi[*2]

[1] Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] PhD Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Soil biological activity are often limited by carbon availability in arid and semiarid regions, probably due to the low organic matter content. The biochar with microbial inoculation is a strategy for improving biological properties in calcareous soils. In order to investigate the biochar effect on microbial respiration and substrate-induced respiration in the presence of growth promoting bacteria (PGPR), a factorial experiment was carried out in a completely randomized design in the rhizobox condition. The factors were including organic sources (pruning waste biochar and control), microbial inoculation (PGPR and Control (without microbial inoculation)) and soil (rhizosphere and non-rhizosphere). At the end of the growth period, microbial respiration, substrate-induced respiration and metabolic quotient index were determined. The results showed that application of biochar and microbial inoculation significantly increased microbial respiration, substrate-induced respiration and metabolic quotient index compared to control treatment. Furthermore, biochar of pruning waste increased the microbial respiration and substrate-induced respiration in the rhizosphere soil by 49.10 and 80.16 percent regard to non-rhizosphere, respectively. However, the content of metabolic quotient was not significantly different in the rhizosphere and non-rhizosphere soil. The application of biochar and PGPR inoculation showed positive effect on improving some soil biological activity.

Keywords: Organic matter, Calcareous soil, Rhizosphere

[*] Corresponding author, Email: r.vahedi@urmia.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

مطالعه‌ی زیست توده میکروبی در یک خاک آهکی تحت تاثیر کاربرد بیوچار و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد

رقیه واحدی [۱*]، میرحسن رسولی صدقیانی [۲]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

گرماکافت بقایای هرس درختان با تبدیل شدن به بیوچار به همراه باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (PGPR) از راهکارهای بهبود خصوصیات شیمیایی و بیولوژیک در خاک‌های آهکی می‌باشند. به منظور بررسی تأثیر بیوچار و باکتری‌های PGPR بر کربن و فسفر زیست توده میکروبی در خاک آهکی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در رایزوباکس اجرا گردید. فاکتورها شامل منابع آلی (بیوچار بقایای هرس، شاهد بدون ماده آلی)، تلقیح میکروبی (باکتری‌های PGPR و عدم تلقیح) و خاک (ریزوسفر و غیرریزوسفر) بودند. پس از پایان دوره رشد کربن آلی، کربن زیست توده میکروبی و فسفر زیست توده میکروبی در خاک‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری تعیین گردید. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان مواد آلی به‌همراه تلقیح باکتری‌های PGPR باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های بیولوژیک در خاک نسبت به تیمار بدون تلقیح و مواد آلی شد. همچنین بیوچار، کربن آلی ،کربن زیست توده میکروبی و فسفر زیست توده میکروبی را به ترتیب ۱/۰۹، ۱/۰۳ و ۱/۲۳ برابر در خاک ریزوسفر نسبت به غیرریزوسفر افزایش داد. کربن زیست توده میکروبی و فسفر زیست توده در خاک ریزوسفری تیمار باکتریایی در مقایسه با خاک غیرریزوسفری به ترتیب ۱/۰۲ و ۱/۱۷ برابر افزایش یافت. چنین استنباط می‌گردد که کاربرد بیوچار در حضور باکتری‌های PGPR منجر به بهبود برخی خواص بیولوژیک خاک می‌گردد.

کلمات کلیدی: بقایای هرس، گرماگافت، رایزوباکس

مقدمه

استفاده از بقایای هرس درختان میوه به عنوان ماده اولیه در تهیه بیوچار در مناطقی مانند آذربایجان غربی علاوه بر تاثیرات مطلوب بر عملکرد محصولات کشاورزی و افزایش ماده آلی خاک از توجیح اقتصادی مناسب نیز برخوردار است. استفاده از بقایای آلی یکی از مهم‌ترین راه‌های تأمین ماده آلی خاک و بازچرخ طبیعی این ترکیبات است. وقتی بقایای گیاهی را در شرایط غیر هوازی و توسط تجزیه گرمایی (Pyrolysis) یا گرما کافت توده‌های زیستی می‌سوزاندند. آنچه که در اثر این فرآیند تولید می‌شد، نوعی زغال یا کربن فعال به نام بیوچار می‌باشد که اخیرا توجه بسیاری از دانشمندان، مهندسان، کشاورزان و کارآفرینان را به خود جلب کرده است (Maddox، ۲۰۱۳). ویژگی‌های بیوچار به علت تغییر پذیری نوع مواد اولیه و شرایط پیرولیز که بیوچار عموما از آن تولید می‌شود تغییر پذیر می‌باشد. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که بیوچار منبع بسیار مناسبی برای بهبود خواص شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی خاک‌ها می‌باشد، رشد گیاهان را بهبود بخشیده و خاک را برای کشت در طولانی مدت به ویژه در مناطق گرمسیری مناسب نگه می‌دارد (Chan و همکاران ۲۰۰۸). تحقیقات در زمینه تاثیرات سودمند بیوچار بیشتر در خاک‌های نواحی گرم و مرطوب انجام گرفته است و پژوهش‌های کمتری در این زمینه در خاک‌های خشک و نیمه خشک که دارای ویژگی‌های متعددی در درجه اول pH بالای آن‌ها می‌باشد (Abrishamkesh و همکاران ۲۰۱۵). گزارش شده است که گرماکافت با دمای پایین (۲۰۰-۳۵۰ در جه سانتی‌گراد) منجر به تولید بیوچار با pH کم می‌شود که می‌تواند کیفیت زیست محیطی در خاک‌های آهکی را بهبود ببخشد (Ippolito و همکاران، ۲۰۱۲). بیوچار غنی از کربن است و سبب افزایش ماده آلی خاک برای هزاران سال شود (Nguyen و همکاران ۲۰۱۰).). زیست توده میکروبی هم به عنوان منبع عناصر غذایی و هم به عنوان مصرف کننده عناصر غذایی در خاک می‌تواند فعالیت کند و موجب تنظیم کارکرد سیستم خاک شود. کربن زیست توده میکروبی به عنوان مخزن قابل توجه عناصرغذایی و تغییر و تبدیلات مواد آلی خاک است. فسفر زیست توده میکروبی هم می‌تواند منبع مهمی برای گیاهان باشد. در ریزوسفر، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها برای جذب فسفر متحرک شده رقابت می‌کنند. بنابراین، فسفر زیست توده میکروبی نقشی کلیدی در چرخه‌ی عناصر غذایی و تغذیه معدنی گیاهان ایفا می‌کند. سرعت تجزیه فسفر زیست توده میکروبی از سرعت تجزیه کربن زیست توده میکروبی سریعتر است. بنابراین، فسفر زیست توده میکروبی می‌تواند منبع مهمی در تأمین فسفر مورد نیاز گیاه باشد. گزارش شده است که زیست توده میکروبی در خاک‌های اسیدی برزیل اصلاح

* ایمیل نویسنده مسئول:r.vahedi@urmia.ac.ir

شده با بیوچار بدلیل افزایش pH، افزایش یافته است (Steiner و همکاران ،۲۰۰۴). از سوی دیگر یک سری میکروارگانیسم‌ها همانند باکتری-های PGPR در خاک قادر به تحریک و افزایش فعالیت های میکروبی خاک بوده و فعالیت زیست توده میکروبی را در خاک تشدید می‌کنند (Kaur و Reddy، ۲۰۱۴). در یک سیستم ریشه‌ای فعال، ترکیبات آلی به‌طور منظم در ریزوسفر آزاد می‌شوند که باعث رشد و افزایش فعالیت جامعه‌ی میکروبی خاک شده و سلامت سیستم را بهبود می‌بخشند. مشاهده شده است که قرار دادن ماده آلی در اطراف ریزوسفر یا خارج از ریزوسفر تأثیر قابل توجهی در فعالیت میکروبی در ریزوسفر و خاک غیرریزوسفری در پی داشته است (Liang و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین مطالعه ریزوسفر نتایج سودمندی در پی خواهد داشت. لذا، هدف از این تحقیق بررسی تاثیر کاربرد بیوچار بقایای هرس درختان میوه بر برخی خصوصیات شیمیایی و بیولوژیک یک خاک آهکی در در شرایط رایزوباکس می‌باشد.

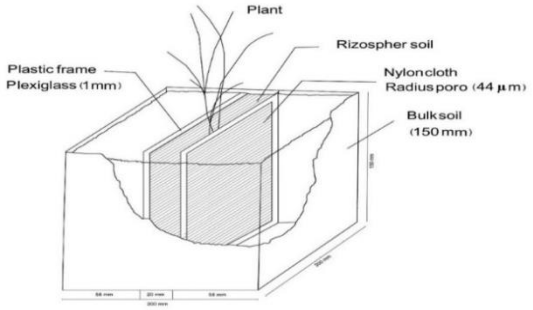
مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار که فاکتورها شامل ماده آلی (بیوچار بقایای هرس و شاهد بدون ماده آلی)، تلقیح میکروبی (باکتری‌هایPGPR و شاهد بدون تلقیح) و خاک (خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری) بود، در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه اجرا گردید. برای انجام این پژوهش، نمونه‌های خاک غیر زراعی از شهرستان سلماس از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متر جمع آوری شدند. پس از هوا خشک کردن و عبور از الک ۲ میلی‌متری توسط اتوکلاو استریل شد. قبل از استریل کردن خاک، برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (جدول۱). بقایای هرس درختان سیب و انگور از باغات استان آذربایجان غربی شهرستان ارومیه جمع آوری گردید. برای تهیه بیوچار، بقایای هرس در قطعات ۲۰ میلی‌متری ابتدا به راکتور (استوانه فلزی به قطر۷ و ارتفاع ۳۱ سانتی‌متر) و سپس به کوره الکتریکی منتقل گردید. تولید در دمای ۳۵۰ درجه سانتی گراد در شرایط عدم وجود اکسیژن انجام شد. در نهایت بیوچار تولید شده، آسیاب و از الک ۰/۵ میلیمتری عبور داده شد. pH و EC بیوچار در عصاره‌های صاف شده سوسپانسیون ۱ به ۱۰ بیوچار به آب ، فسفرکل بیوچار به روش هضم با اسید (Rajkovich و همکاران ۲۰۱۱)، ازت و کربن بیوچار نیز با به روش سوزاندن خشک (BS EN 15104; SASTM D5291) با دستگاه ESC 4010 CHNSO Analyzer اندازه‌گیری گردید (جدول ۱). به منظور کشت گیاه از رایزوباکس استفاده شد (شکل ۱). باکس‌های ریزوسفر در ابعاد۲۰*۱۵*۲۰ سانتی-متر (طول، عرض، ارتفاع) استفاده شد. فضای هر باکس با استفاده از صفحات مشبک نایلونی ۳۲۵ مش به ۲ قسمت: ۱) ناحیه ریزوسفری به ضخامت ۲ سانتی‌متر، ۲) ناحیه توده خاک یا ناحیه غیرریزوسفری به ضخامت ۵/۸ سانتی‌متر (این ناحیه در طرف دیگر ناحیه ریزوسفری نیز با همان ضخامت تکرار شد) تقسیم شد. برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای حدود ۵/۷۹۹ کیلوگرم خاک استریل در هر باکس ریخته شد. بیوچار بقایای هرس بعد از آسیاب شدن و عبور از الک ۰/۵ میلی‌متری برحسب ۱/۵ درصد کربن آلی خالص به خاک اضافه و مخلوط شد و به باکس‌ها منتقل گردید. خاک فسفات و اکسید آهن نیز به‌ترتیب به عنوان منابع نامحلول فسفر و آهن در تیمارها اعمال شدند. برای تلقیح میکروبی از سویه‌های میکروبی موجود در بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه که شامل سودوموناس‌های گروه فلورسنت (ترکیبی از گونه‌های Pseudomonas aeruginosa، Pseudomonas fluorescens و Pseudomonas putidad) بودند، استفاده گردید.

برای تلقیح بذرها از روش اضافه کردن محلول باکتری‌ها (یک میلی لیتر از سوسپانسیون برای هر بذر) به خاک اطراف بذرها هم‌زمان با کاشت استفاده شد. پس از افزودن مایه‌های تلقیح، برای کشت گیاه، بذرهای گندم (Triticum aestivum L.) رقم پیشتاز پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به تعداد شش بذر در قسمت ریزوسفری رایزوباکس‌ها کشت گردیدند. پس از جوانه زدن بذرها، ۴ بوته (بوته‌های سالم‌تر و قوی‌تری) نگه‌داشته شدند. در پایان پس از ۶۵ روز رایزوباکس‌ها باز شدند. از هر رایزوباکس دو نمونه خاک، یکی از بخش ریزوسفر و دیگری از بخش غیر ریزوسفر برداشت شد. کربن آلی(Nelson و Sommers، ۱۹۸۲)، کربن بیومس میکروبی (Jenkinson و Ladd، ۱۹۸۱) و فسفر بیومس میکروبی (Brookes و همکاران ۱۹۸۲) به روش تدخین- استخراج اندازه‌گیری گردید. تجزیه و تحلیل آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار MSTATC انجام گردید.

جدول-۱- نتایج برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شنی و بیوچار

	بافت خاک	pH	EC	کربن آلی	کربنات کلسیم معادل	نیتروژن کل	فسفر قابل استفاده	فسفر کل	پتاسیم قابل استفاده
			دسی زیمنس بر متر		(درصد)			(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	
خاک	شن لومی	۷/۵۳	۰/۴۷	۰/۲۵	۱۴/۲۵	۰/۰۸	۷/۶۴	-	۹۸
بیوچار بقایای هرس سیب و انگور	-	۷/۲۹	۰/۰۸	۶۷/۵۳	-	۰/۵۴	-	۲۷۴۸/۰۷	



شکل۱- شماتیکی از سیستم رایزوباکس

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار تلقیح میکروبی، منابع آلی و خاک همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر کربن آلی و پارامترهای اندازه‌گیری شده داشت ($p<۰/۰۰۱$). مقایسه میانگین اثرات متقابل منابع آلی و تلقیح میکروبی نشان داد که برهمکنش باکتری‌ها و منابع آلی سبب افزایش کربن آلی و شاخص‌های بیولوژیک اندازه‌گیری شده در تیمارهای ماده آلی در مقایسه با تیمارهای بدون تلقیح ماده آلی شد. حتی در تیمار شاهد به همراه تلقیح میکروبی نیز شاخص‌های بیولوژیک بیشتر از شاهد بدون تلقیح بود (جدول۳). به طوری که بیشترین مقدار کربن آلی در تیمار بیوچار همراه با تلقیح باکتریایی (۰/۹۸درصد) بود. هرچند به دلیل کربن بالای بیوچار مصرفی (جدول۱) این مطلب قابل انتظار بود. در تیمار بیوچار، حضور باکتری‌های PGPR منجر به افزایش ۱/۳۷ و ۲/۱۸ برابری کربن و فسفر زیست توده میکروبی نسبت به شرایط بدون تلقیح شد. افزایش کربن زیست توده میکروبی در نتیجه کاربرد کودهای آلی به دلیل تأمین بستر مناسب برای باکتری‌ها منجر به تحریک فعالیت آن‌ها شده و در نتیجه باعث افزایش فعالیت بیولوژیک خاک می‌شود (Fierer و همکاران، ۲۰۰۳). بیوچار تهیه شده از چوب نیز می‌تواند فعالیت‌های میکروبی در خاک را با فراهمی کردن زیستگاه، رطوبت، کربن، منابع به راحتی قابل تجزیه و قابل دسترس و عناصر مغذی برای میکروارگانیسم‌ها افزایش دهد. قطر منافذ ۲-۸۰ میکرومتر در بسیاری از بیوچارهای مشتق شده از چوب مشاهده شده است، این محدوده از اندازه‌ی منافذ می‌تواند فعالیت‌های میکروارگانیسم‌ها را حفاظت کند (Hammer و همکاران، ۲۰۱۴). بنابراین ایجاد چنین خلل و فرج در بیوچار قابل دسترس برای باکتری‌ها باعث افزایش فعالیت‌های بیولوژیک آن‌ها در تعامل با بیوچار می‌شود.

جدول ۳- اثرات متقابل تلقیح میکروبی و منابع آلی بر کربن آلی، کربن بیومس میکروبی و فسفر بیومس میکروبی

		کربن آلی	کربن بیومس میکروبی	فسفر بیومس میکروبی
تیمار تلقیح میکروبی	تیمار منابع آلی	(درصد)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)
تلقیح	بیوچار	۰/۹۸ a	۶۶۰/۶a	۵۴/۶۱a
	شاهد	۰/۴۶c	۳۲۰/۶c	۱۴/۹۲c
بدون تلقیح	بیوچار	۰/۸۱b	۴۷۹/۲b	۲۵/۰۰b
	شاهد	۰/۳۲d	۲۵۶/۶d	۶/۱۶d

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، براساس آزمون چند دامنه‌ایی دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

اثر ریزوسفر تاثیر معنی‌داری بر کربن آلی در مقایسه با غیرریزوسفر در خاک داشت. کاربرد بیوچار در خاک منجر به افزایش کربن آلی در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری شد که در خاک ریزوسفری بیوچار ۹/۴۱ درصد بیشتر از خاک غیرریزوسفری بود (جدول۴). ریزوسفر محیطی است که در آن تجمع و تجزیه ترکیبات آلی رخ می‌دهد بنابراین انتظار می‌رود که ماده آلی در ریزوسفر بیشتر از غیر ریزوسفر باشد. بنظر می‌رسد که بخش کربن فعال موجود در این ماده آلی پس از افزوده شدن به خاک تجزیه گردیده و هم‌چنین بخشی از کربن موجود در این کود به ذخایر کربن در خاک پیوسته و باعث افزایش سطح کربن آلی خاک شده است. همچنین بیوچار بقایای هرس میزان کربن بیومس میکروبی و فسفر بیومس میکروبی را در خاک ریزوسفری نسبت به خاک غیرریزوسفر به ترتیب ۳/۶۳ و ۱۹/۲۷ درصد افزایش داد (جدول۴). افزودن بیوچار به خاک باعث افزایش ماده آلی خاک و تاثیر مثبتی نیز بر میزان زیست توده‌ی میکروبی خاک داشت (Thiessen و همکاران ۲۰۱۳).Liu و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از شرایط رایزوباکس مشاهده کردند که کربن بیومس میکروبی درخاک ریزوسفری بیشتر از خاک غیرریزوسفر بود. بطور کلی فسفر بیومس میکروبی می‌تواند منبع مهمی برای فسفر محلول از طریق رقابت با گیاهان برای جذب فسفر باشد.. بنابراین فسفر بیومس میکروبی می‌تواند یک مکانیسم حفاظتی فسفر لبایل در خاک‌های با دسترسی پایین فسفر باشد. با افزایش نسبت‌های بیوچار به خاک فسفر بیومس میکروبی خاک افزایش می‌یابد. این افزایش در فسفر بیومس میکروبی را می‌توان بطور مستقیم به کربن بالا (جدول ۱) و قابل دسترس بودن عناصر غذایی بیوچار (Biederman و Harpole، ۲۰۱۲) یا بطور غیر مستقیم افزایش فعالیت ریشه گیاه توسط بیوچار نسبت داد.

جدول ۴- اثرات متقابل منابع آلی و خاک بر کربن آلی، کربن بیومس میکروبی و فسفر بیومس میکروبی

خاک	تیمار منابع آلی	کربن آلی (درصد)	کربن بیومس میکروبی (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)	فسفر بیومس میکروبی (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)
ریزوسفر	بیوچار	۰/۹۳a	۵۷۸/۲a	۴۴/۰۵a
	شاهد	۰/۴۳c	۲۹۶/۶b	۱۳/۵۵c
غیرریزوسفر	بیوچار	۰/۸۵b	۵۵۷/۹b	۳۵/۵۶b
	شاهد	۰/۳۵d	۲۸۰/۶d	۷/۵۲d

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، براساس آزمون چند دامنه‌ایی دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

تلقیح باکتری‌های PGPR منجر به افزایش کربن آلی در خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۵). به طوری که افزایش کربن آلی در خاک ریزوسفر تلقیح باکتریایی ۶/۹۵ درصد بیشتر از غیرریزوسفر بود. ترشحات ریشه‌ای مانند کربوهیدرات‌ها در ریزوسفر به عنوان محرک رشد میکروبی در خاک ریزوسفری بوده و زمانی که تجزیه می‌شوند سبب افزایش کربن آلی و عناصر غذایی غذایی در خاک می‌شوند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد به عنوان ذرات آلی بسیار فعال در خاک به شمار می‌روند که دارای سطحی فعال و باردار و نیز توانایی تولید و ترشح بسیاری از ترکیبات آلی، کربوهیدرات‌ها و آنزیم‌ها را داراست. همچنین حضور باکتری‌های PGPR منجر به افزایش ۱/۴ و ۲/۲۹ برابری کربن و فسفر زیست توده میکروبی در مقایسه با شرایط بدون تلقیح شد (جدول۵). معمولاً کربن زیست توده میکروبی را به عنوان برآوردی از فعالیت و حیات توده میکروبی خاک محسوب می‌کنند. بنابراین احتمالاً باکتری‌های PGPR بعد از پایان چرخه زندگی خود ازبین رفته اند و به کل زیست توده میکروبی خاک افزوده شده-اند و با این دیدگاه می‌توان بیان کرد اجساد سلولی اضافه شده به خاک ریزوسفری می‌تواند دلیل افزایش زیست توده میکروبی در اثر تلقیح باکتریایی در ریزوسفر باشد (Aghababaei و همکاران، ۲۰۱۴).

جدول ۵- اثرات متقابل تلقیح میکروبی و خاک بر کربن آلی، کربن بیومس میکروبی و فسفر بیومس میکروبی

تیمار تلقیح میکروبی	خاک	کربن آلی (درصد)	کربن بیومس میکروبی (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)	فسفر بیومس میکروبی (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)
تلقیح	ریزوسفر	۱/۲۳a	۶۰۸/۸a	۵۵/۷۴a
	غیرریزوسفر	۱/۱۵b	۵۹۲/۵b	۴۷/۶۱b
بدون تلقیح	ریزوسفر	۰/۹۶c	۴۳۵/۵c	۲۶/۰۳c
	غیرریزوسفر	۰/۸۸d	۴۲۰/۱d	۱۸/۹۱d

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، براساس آزمون چند دامنه‌ایی دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان این گونه بیان نمود که استفاده از بیوچار به همراه باکتری‌های PGPR در این مطالعه برخی از خصوصیات شیمیایی (کربن آلی) و بیولوژیکی (کربن و فسفر بیومس میکروبی) ریزوسفر را تغییر داد و منجر به افزایش این خصوصیات در خاک آهکی گردید. بنابراین تبدیل بقایای هرس درختان سیب و انگور به بیوچار منجر به حاصلخیزی خاک گردیده و اثرات آن‌ها به صورت بهبود کیفیت خاک ظاهر می‌گردد. البته لازم است نتایج این تحقیق با انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای با کشت گیاهان مختلف تایید گردد و ارزیابی اقتصادی کاربرد بیوچار انجام پذیرد.

منابع

Abrishamkesh, S., Gorji, M., Asadi, H., Bagheri-Marandi, G.H. and Pourbabaee A.A. 2015. Effects of rice husk biochar application on the properties of alkaline soil and lentil growth. Plant Soil and Environment Journal, 11, 475–482.

Aghababaei, F., Raiesi, F. and Hosseinpur, A. 2014.The Influence of Earthworm and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Microbial Biomass Carbon and Enzyme Activity in a Soil Contaminated with Cadmium in Sunflower (Helianthus annuus L.) Cultivation. Journal of Water and Soil, 27, 949-962.

Biederman, L.A. and Harpole, W.S., 2012. Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: a meta-analysis. GCB Bioenergy, 5, 202–214

Brookes, P.C. Powlson D.S. and Jenkinson, D.S. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. Soil Biology and Biochemistry, 14,319-329.

Chan, K.Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A. and Joseph, S. 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. Australian Journal of Soil Research, 46:437.

Fierer, N., Schimel, J.P. and Holden, P.A. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemestry, 35, 167–176.

Ippolito, J.A., Novak, J.M., Busscher, W.J., Ahmedna, M., Rehrah, D. and Watts, D.W. 2012. Switchgrass biochar affects two Aridisols. Journal of Environmental Quality, 41, 1123–1130.

Hammer, E.C., Balogh-Brunstad, Z., Jakobsen, I., Olsson, P.A., Stipp, S.L.S. and Rillig, M.C. 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. Soil Biology and Biochemistry, 77, 252–260.

Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. Advances in Agronomy, 64, 225-26.

Jenkinson, D.S. and Ladd, J.N .1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Powl EA, Ladd JN (eds) Soil biochemistry.Dekker, New York, 415–417.

Kaur, G. and Reddy, M.S.H. 2014. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. European Journal of Soil Biology, 158, 163-168.

Kookana, R.S., Sarmah, A.K., Van Zwieten, L., Krull, E. and Singh, B. 2011. Biochar Application to Soil:Agronomic and Environmental Benefits and Unintended Consequences. Advances in Agronomy, 112, 103-143.

Lentz, R.D. and Ippolito, J.A. 2012. Biochar and Manure Aff ect Calcareous Soil and Corn Silage Nutrient Concentrations and Uptake. Environmental Quality, 41.

Liang, Y., Nikolic, M., Peng, Y., Chen, W. and Jiang, Y. 2005. Organic manure stimulates biological activity and barley growth in soil subject to secondary salinization. Soil Biology and Biochemistry, 37, 1185–1195.

Liu, D., Fang, Sh., Tian, Y. and X, Dun. 2012. Variation inrhizosphere soil microbial index of tree species on seasonal floodingland: An in situ rhizobox approach.Appl. Soil Ecology, 59, 1– 11.

Maddox, N. 2013. The promise (and uncertainties) of biochar. CSA News magazine, 58: 4-9.

Nelson, D.W. and Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbonand organic matter. p. 539–579. InPage, 95- A.L., (Ed.) Methods of soil analysis. Part 2, 2nd ed. SSSABook Ser.5.SSSA, Madison,WI.

Nguyen, B., Lehmann, J., Hockaday, W.C, Joseph, S. and Masiello, C.A.2010 Temperature Sensitivity of black carbon decomposition and oxidation Environmental Science and Technology, 44, 3324-3331.

Rajkovich,, S. Enders, A. Hanley, K. Hyland, C. Zimmerman, A.R. and Lehmann, J. 2011. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. Biology and Fertility of Soils, 48(3), 271-284.

Steiner, C., Teixeira, W.G., Lehmann, J. and Zech, W. 2004. Microbial Response to Charcoal Amendments of Highly Weathered Soils and Amazonian Dark Earths in Central Amazonia Preliminary Results, 195- 212.

Thiessen, S, Gleixner, G, Wutzler, T. and Reichstein, M .2013. Both priming and temperature sensitivity of soil organic matter decomposition depend on microbial biomass – An incubation study. Soil Biology and Biochemistry, 57,739–748.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Study of microbial biomass in a calcareous soil under the influence of biochar application and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

R.Vahedi[*1], MH. Rasouli-sadaghiani [2]

[1] PhD Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

[2] Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

The pyrolysis of trees pruning waste into biochar along with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are approaches improving chemical and biological properties in calcareous soils. In order to investigate the biochar and PGPR effect on microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus of the calcareous soil, a factorial experiment was carried out in a completely randomized design in the rhizobox. Experimental factors were including organic sources (pruning waste biochar and control), microbial inoculation (PGPR and Control (without microbial inoculation)) and soil (rhizosphere and non-rhizosphere soil). At the end of the growth, organic carbon, microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus in the rhizosphere soil and non-rhizosphere soil were determined. The results showed that application of organic matter and microbial inoculation increased soil biological Indices compared to control treatment, significantly. Furthermore, biochar increased the organic carbon, microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus in the rhizosphere soil by 1.09, 1.03 and 1.23 times compared to non-rhizosphere, respectively. Microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus in rhizosphere soil of PGPR treatment were increased by 1.02 and 1.17 times compared to non-rhizosphere, respectively. It is concluded that application of biochar in the presence of PGPR causes to improve some soil biological properties.

Keywords: pruning waste, pyrolysis, rhizobox

[*] Corresponding author, Email: @urmia.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

کنترل کیفی کودهای زیستی فسفوزیست و فسفو نیتروکارا

محمدرضا ساریخانی[۱]، بهمن خوشرو[۲*]، مریم نوروزپور[۳]، سجاد علیار[۳] و زهرا مردانی[۳]

[۱] دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در این پژوهش دو نمونه از کودهای زیستی داخل کشور شامل فسفوزیست و فسفو نیتروکارا از نظر جمعیت میکروبی و ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه مورد ارزیابی و کنترل کیفی قرار گرفتند. فسفوزیست محصول شرکت کشت کار گستر نوژان به منظور تامین فسفر و فسفونیتروکارا محصول شرکت کارا نیز جهت تامین فسفر و نیتروژن تولید و عرضه می‌شوند. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که تعداد سلول زنده در هر گرم کود زیستی فسفوزیست و فسفو نیتروکارا به ترتیب $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ و $۳/۱ \times ۱۰^{۷}$ (CFU/g) می‌باشد. ۷ جدایه از فسفوزیست (FZ1، FZ2، FZ3، FZ4، FZ5، FZ6 و FZ7) و ۳ جدایه از فسفونیتروکارا (FN1، FN3 و FN4) بدست آمد. از نظر انحلال فسفر، فسفوزیست دارای وضعیت بهتری نسبت به فسفونیتروکارا بود. صرف نظر از اینکه جدایه‌های موجود در کود فسفونیتروکارا مورد شناسایی قرار نگرفتند اما بخاطر رشد برخی از جدایه‌های این کود در محیط LG، حضور باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن در این کود مورد تایید است. علاوه بر ویژگی‌های مذکور، رهاسازی پتاسیم از میکا، تولید ایندول-۳-استیک اسید و سیدروفور نیز در برخی جدایه‌های دو کود مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، آزادکنندگی پتاسیم و تولید اکسین.

مقدمه

کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین اجزاء کشاورزی آلی و پایدار محسوب می‌شوند که استفاده صحیح از آنها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی و کاهش مصرف بعضی از انواع کودهای شیمیایی، حفظ محیط زیست را نیز به‌دنبال داشته باشد. کودهای زیستی در حقیقت حاوی انواع مختلف باکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR[۲]) بوده که توانایی تبدیل عناصر غذایی را از فرم غیرقابل دسترس به فرم قابل دسترس طی فرآیندهای زیستی دارند (وسی ۲۰۰۳، خوشرو و ساریخانی ۱۳۹۷). امروزه در نقاط مختلف دنیا شاهد شناسایی و بکارگیری این گروه از باکتری‌ها در قالب کودهای زیستی مختلف هستیم. اطمینان از اثر بخشی هر محصول اولین حق هر مصرف کننده‌ای است که می‌بایستی از طریق سازمانها و یا وزارتخانه‌های ذیربط تضمین گردد. کودهای زیستی نیز از این امر مستثنی نبوده و اطمینان از کیفیت اینگونه کودها، اولین موردی است که می‌بایستی از سوی مراجع ذیربط تضمین گردد. با وجود زیاد بود تولیدات کودهای زیستی، ارزیابی آن‌ها به لحاظ کیفی کمتر انجام‌شده است. کنترل کیفیت کودهای زیستی فرایندی چند مرحله‌ای بوده و مجموعه‌ای از آزمایشات نظیر آزمون‌های آزمایشگاهی تا گلدانی و مزرعه‌ای را شامل می‌شود. برای تائید حضور گونه‌های کارا و همچنین حضور جمعیت فعال میکروبی در مدت زمان اعتبار کود زیستی، انجام کنترل کیفیت لازم می‌باشد. کنترل کیفیت کود زیستی عبارت است از سنجش کیفیت و توان کودهای زیستی به لحاظ برخی ویژگی‌ها از قبیل تعداد جمعیت میکروبی، توانایی تثبیت نیتروژن، توان انحلال فسفات نامحلول، توان تولید اکسین، قدرت رهاسازی پتاسیم و همچنین تشخیص عدم وجود آلودگی و تایید گونه‌های میکروبی بکار رفته در کود زیستی با استفاده از تکنیک‌های خاص (دیکر و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ روی کودهای زیستی رایج در کشور اندونزی انجام گرفت، ۴۱ کود زیستی توسط حسین و همکاران (۲۰۰۷) مورد مطالعه قرار گرفت. در اغلب این کودها از دو یا تعداد بیشتری ریزجاندار استفاده شده بود. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین توسط این نوع از کودها حاکی از این بود که تنها یک نوع کود زیستی قادر به سنتز اکسین توسط باکتری Azospirillum lipoferum در محیط نمک‌های معدنی حداقل (حاوی ال- تریپتوفان) بود. در این مطالعه کیفیت کودهای زیستی در آزمایشگاه بر اساس تعداد جمعیت و فنوتیپ میکروبی و صفات کاربردی (PGP) مورد آزمایش قرار گرفت. به طور

*ایمیل نویسنده مسئول: bahmankhoshru@yahoo.com

[2] *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*

کلی هر کود شامل دو یا چند سویه میکروبی و با عملکرد چندگانه ادعا شده بود. با این حال، بسیاری از آنها (بیش از ۹۰٪) فاقد برچسب اطلاعات تاریخ انقضا بودند. با توجه به گفته‌های فوق یکی از جنبه‌های مهم کنترل کیفیت کودهای زیستی، جمعیت میکروبی فعال گونه‌های بکارگیری شده و ویژگی افزایندگی رشد آنها می‌باشد. لذا در پژوهش حاضر، به بررسی برخی از جنبه‌های کنترل کیفیت کودهای زیستی از قبیل شمارش جمعیت میکروبی، ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه توسط سویه‌های جدا شده، از کودهای زیستی فسفوزیست و فسفو نیتروکارا پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کودهای زیستی مورد مطالعه

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز انجام گرفت. در این پژوهش دو کود زیستی شامل فسفوزیست (محصول شرکت کشت کار گستر نوژان) و فسفو نیتروکارا (محصول شرکت کارا) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- اطلاعات قید شده از طرف تولیدکنندگان کودهای زیستی مورد آزمایش در این تحقیق

کود زیستی	شرکت تولیدکننده	جنس و گونه باکتری	برخی ویژگی‌ها	تاریخ اعتبار
فسفوزیست	کشت کار گستر نوژان	اطلاعاتی قید نشده	$۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/g -PSB	۹۷/۲/۱۶
فسفونیتروکارا	کارا	Bacillus coagulans Azospirillum lipoferum Azotobacter chroococcum	۲×۱۰^{۹} CFU/g	۹۷/۱۰/۵

شمارش جمعیت میکروبی و جداسازی جدایه‌های موجود در کود زیستی

برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از چهار رقت پایانی (رقت $۱۰^{-۹}$، $۱۰^{-۸}$، $۱۰^{-۷}$ و $۱۰^{-۶}$) در ۲ تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد عمومی و اختصاصی انتقال داده شد، برای این منظور از محیط کشت عمومی NA و دو محیط کشت نیمه-اختصاصی Sperber و LG استفاده شد که به ترتیب برای رشد عموم باکتری‌ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از نوع Azotobacter وAzospirillum قابل استفاده می‌باشد (موتسارا و روی ۲۰۰۸). بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های مورد نظر در محیط کشت‌های فوق، شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها بعد از سه روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس صورت پذیرفت، و براساس فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد (دیکر و همکاران ۲۰۱۱).

اندازه‌گیری ویژگی‌های PGP جدایه‌های موجود در کودهای زیستی

ارزیابی نیمه‌کمی و کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط اسپربر جامد (اسپربر ۱۹۵۸) و مایع (نوتیال ۱۹۹۹)، آزمون کمی میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا در محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) و سیاه (بیوتیت) (هو و همکاران ۲۰۰۶)، تولید اکسین جدایه‌ها در حضور و عدم حضور ال-تریپتوفان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط LB (بریک و همکاران ۱۹۹۱) و تولید سیدروفور (نیلندز ۱۹۹۵) برای تمام جدایه‌ها انجام گرفت.

جدول ۲- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌ها

محیط کشت Medium	اجزای محیط کشت (g/l) Components of the medium
LB	Peptone 10; NaCl 10; Yeast Extract 5
NB	Peptone 5; NaCl 5; Yeast Extract 1.5; Meat extract 1.5
Sperber	Glucose 10; Yeast extract 0.5; $CaCl_2$ 0.1; $MgSO4.7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO_4)_2$ 2.5; Agar 15.
Aleksandrov	Glucose 5; $Ca_3(PO_4)_2$ 2; $MgSO4.7H_2O$ 0.5; $FeCl_3$ 0.005; $CaCO_3$ 0.1; Mica 2
LG	Sucrose 20; K_2HPO_4 0.05; KH_2PO_4 0.15; $MgSO_4.7H_2O$ 0.2; $CaCO_3$ 1; $CaCl_2$ 0.01; $FeCl_2$ 0.01; $Na_2MoO_4.4H_2O$ 0.002; Agar 15.

نتایج و بحث

شمارش جمعیت میکروبی

باتوجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که جمعیت میکروبی کودهای زیستی از زمان تولید توسط شرکت سازنده تا مرحله مصرف، دارای تغییرات جمعیتی می‌باشد و این تغییرات عمدتاً با افت جمعیت میکروبی همراه هستند. فسفو نیتروکارا از تولیدات شرکت کارا بوده و نتایج نشان داد که نسبت به جمعیت مورد ادعای شرکت سازنده دچار کاهش جمعیت میکروبی (بیش از ۲۰ درصد) شده است، طبق ادعای شرکت سازنده، فسفونیتروکارا دارای جمعیت اولیه 10^9 CFU/g بوده ولی در زمان آزمایش به جمعیت 10^7 کاهش یافته است. اما تعداد جمعیت میکروبی که کل باکتریهای رشد یافته از کود فسفوزیست بود، مورد ادعای شرکت را تامین نمود، هرچند حضور ۷ جدایه میکروبی متفاوت در یک نمونه کود، احتمال رخداد و وجود آلودگی در آن را قوت می‌بخشد.

جدول ۳- جمعیت میکروبی فعال در کودهای زیستی.

کود زیستی	جمعیت اولیه (CFU/g)	شمارش جمعیت (CFU/g)		
		Sperber	LG	NA
فسفونیتروکارا	2×10^9	$4/2 \times 10^6$	$3/5 \times 10^5$	$3/1 \times 10^7$
فسفوزیست	$1/5\times10^8$	$1/3 \times 10^8$	انجام نشده	$2/1 \times 10^8$

حفظ جمعیت میکروبی در کودهای زیستی عامل مهمی بوده و به عواملی همچون نوع میکروب، نوع حامل، فرمولاسیون، رطوبت اولیه، مقدار عناصر غذایی، عدم وجود آلودگی و غیره بستگی دارد (سانتوش ۲۰۱۵) و اثرات مثبت کودهای زیستی ارتباط مستقیمی با جمعیت میکروبی فعال در کودهای زیستی دارد (خوشرو و ساریخانی ۱۳۹۷).

آزمون کیفی و کمی توان حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات

اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) مشخص کرد که از ۱۰ جدایه مورد بررسی تنها ۵ جدایه قادر به تشکیل هاله بودند (شکل ۱). جدایه FZ2 (جدا شده از کود زیستی فسفوزیست) بزرگترین هاله انحلال را ایجاد کرد (HD/CD= ۱/۵۶). جدایه FZ3 در رتبه‌ی بعدی قرار داشت که دارای نسبت ۱/۳ بود. بقیه جدایه‌ها دارای توان جزئی در تشکیل هاله بودند (شکل ۱). در بخش ارزیابی کمی انحلال فسفات نیز بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0.01$). جدایه FN1 ، FZ2 و FZ6 به ترتیب دارای بیشترین مقدار انحلال فسفات (۲۹۹، ۲۹۳ و ۲۸۸ میلی‌گرم بر لیتر) در بین سایر باکتری‌ها بودند. محدوده انحلال باکتری‌ها بین ۲۵۷-۲۹۹ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۲).

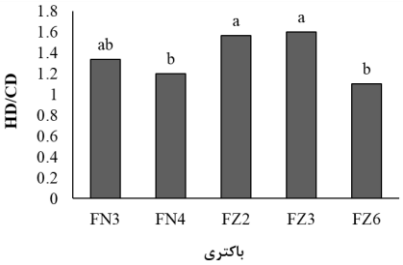
آزمون میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های موسکویت و بیوتیت نشان داد که جدایه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بر میزان رهاسازی پتاسیم هستند ($P<0.01$). مقدار آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت به مراتب بیشتر از کانی موسکویت بود. جدایه FZ3 و FN4 در بیوتیت (به ترتیب ۱۸/۰۹ و ۱۷/۰۹ میلی‌گرم بر لیتر) و جدایه FZ5 در موسکویت (۱۲/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین پتاسیم را آزاد کردند. باکتری FZ5 تنها جدایه‌ای بود که میزان آزادسازی پتاسیم آن از موسکویت بیشتر از بیوتیت بود. محدوده آزادکنندگی پتاسیم جدایه‌ها برای بیوتیت ۸/۲ – ۱۸/۰۹ و برای موسکویت ۳/۳۹-۱۲/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۳). بخش عمده اختلاف بین بیوتیت و موسکویت مربوط به تفاوت در رهاسازی پتاسیم غیرتبادلی و ساختمانی آنهاست. این اختلاف مربوط به تفاوت در رهاسازی پتاسیم غیرتبادلی و ساختمانی آنهاست. خالی بودن یک موقعیت از سه موقعیت ورقه اکتاهدرال در موسکویت، سبب می‌شود یون هیدروژن از موقعیت عمودی فاصله گرفته و به طرف موضع خالی متمایل شود. درنتیجه پتاسیم در این نوع از میکا نسبت به میکاهای تری‌اکتاهدرال (بیوتیت) بیشتر تحت تأثیر میدان الکتریکی مربوط به یون هیدروکسیل قرار گرفته و آزادسازی پتاسیم بین لایه‌ای مشکل‌تر شود (خیامیم و همکاران ۲۰۱۰).

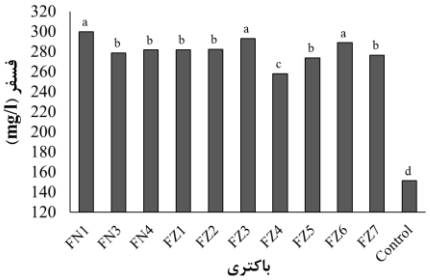
مقایسه جدایه‌ها از نظر تولید اکسین و سایدروفور

نتایج تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر تولید اکسین نیز نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر مقدار تولید هورمون اکسین (IAA) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<0.01$). بیشترین تولید اکسین مربوط به جدایه FZ6 با مقدار ۱۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر در حضور تریپتوفان و ۱۵/۹ میلی‌گرم بر لیتر در عدم حضور تریپتوفان بود. جدایه‌های FN1 و FZ2 در رتبه‌های بعد قرار داشتند (شکل ۴).

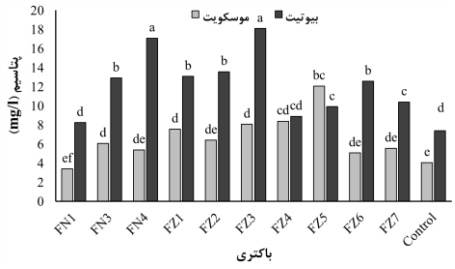
بریک و همکاران (۱۹۹۱) با مطالعه تولید اکسین توسط ۵۳ جدایه که مربوط به جنس‌های مختلف بودند به این نتیجه رسیدند که این جدایه‌ها می‌توانند به میزان ۱/۳ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر اکسین تولید نمایند. تولید بیشتر IAA در یک جدایه نسبت به جدایه دیگر احتمالاً به دلیل استفاده بهتر از ترکیبات محیط توسط آن جدایه می‌باشد (رجایی و همکاران ۲۰۰۷). گزارش شده که افزایش غلظت تریپتوفان، تولید اکسین را افزایش می‌دهد (مصطفی و همکاران ۲۰۱۸). در بخش توان تولید سایدروفور، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بین جدایه‌ها از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.01$). بالاترین میزان تولید سایدروفور مربوط به جدایه‌های FZ3 و FN3 به ترتیب ۷۸/۴ و ۷۷/۵ میکرومول بر لیتر بودند (شکل ۵). تولید سایدروفور توسط باکتری‌ها از نظر تغذیه آهن گیاهان و نیز کنترل پاتوژن‌های گیاهی حائز اهمیت هستند (سینا و همکاران ۲۰۱۹).



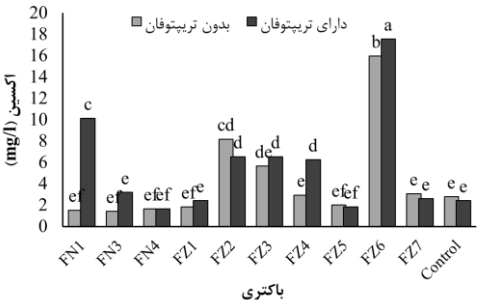
شکل ۱- ارزیابی کیفی انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها.



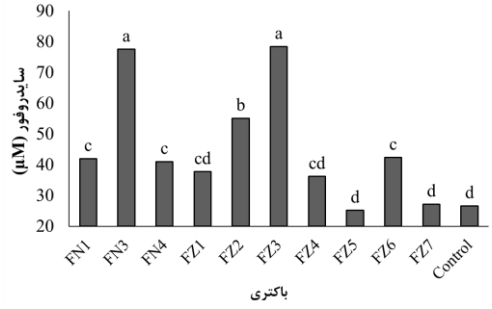
شکل ۲- میزان انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها در روش ارزیابی کمی.



شکل ۳- مقادیر آزادسازی پتاسیم از کانی میکا توسط جدایه‌ها.



شکل ۴- تولید اکسین (IAA) توسط جدایه‌ها.



شکل ۵- تولید سایدروفور توسط جدایه‌ها

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش ارزیابی کیفی دو نمونه از کودهای زیستی داخل کشور شامل فسفو زیست و فسفو نیتروکارا بود که از دو جنبه تعیین جمعیت میکروبی فعال و ارزیابی ویژگی‌های افزاینده رشد گیاه انجام گردید. دو جدایه (FZ2 و FZ3) به دست آمده از کود فسفوزیست (محصول شرکت کشت کار گستر نوژان) دارای ویژگی حل کنندگی فسفات کم محلول بود، و حضور جدایه‌های دیگر با فقدان این ویژگی این تردید را ایجاد می‌نماید که تعداد جمعیت شمارش شده میکروبی ($1/5\times10^{8}$ CFU/g) به نظر دارای آلودگی نیز باشد، هر چند جنس و گونه جدایه‌ها مورد شناسایی قرار نگرفت. همچنین در این آزمایش مشخص گردید که در جدایه‌های به دست آمده از این کود علاوه بر ویژگی حل‌کنندگی فسفات کم محلول، سایر ویژگی‌های

افزایندگی رشد گیاه مانند توان آزادکنندگی پتاسیم از کانی‌های میکا (FZ3)، توان تولید اکسین (FZ6) و توان تولید سایدروفور (FZ3) نیز دیده می‌شود. بایستی متذکر شد که شناسایی جدایه‌های مورد استفاده صورت نپذیرفته است و چه بسا برخی از این جدایه‌ها آلودگی‌های جنبی در این کود باشد زیرا که این تنوع جدایه در یک کود زیستی دور از ذهن می‌نماید. وضعیت حل‌کنندگی فسفات در فسفوزیست بهتر از فسفونیتروکارا بود. جمعیت مورد ادعای شرکت سازنده برای کود فسفونیتروکارا برابر ۲×۱۰^{۹} CFU/g بود که نتیجه شمارش جمعیت میکروبی این کود حاکی از کاهش جمعیت آن بود. کنترل کیفی کود زیستی فسفونیتروکارا افت جمعیت میکروبی آن را مشخص نمود، همچنین این آزمایش نشان داد که جدایه‌های به دست آمده از این کود علاوه بر ویژگی حل‌کنندگی فسفات، دارای ویژگی‌های دیگری از قبیل توان آزادکنندگی پتاسیم (FN4)، تولید اکسین (FN1) و تولید سایدروفور (FN3) نیز می‌باشند. هر چند برخی از جدایه‌های فسفونیتروکارا توان رشد در محیط LG را داشتند اما شناسایی جدایه‌های مذکور در این کود انجام نگرفت، رشد بر روی چنین محیطی از ویژگیهای باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن محسوب می‌شود. نتایج این آزمایش ضرورت پایش و کنترل کیفی کودهای زیستی را بیش از پیش نمایان می سازد.

منابع

خوشرو، ب.، ساریخانی، م. ر. ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاته. مجله آب و خاک. جلد ۳۲، شماره ۱، ۱۶۷- ۱۵۵.

ساریخانی، م. ر.، انصاری، س. ۱۳۹۳. بررسی برخی از ویژگیهای کیفی کودهای زیستی رایج در کشور. دانش کشاورزی و تولید پایدار. ویژه‌نامه نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. صفحات ۱-۱۴.

Bric, J., Bostock, M., and Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbial, 57, 755 -760.

Deaker, R., Kecskés, M.L., Rose, M.T., Amprayn, K., Ganisan, K., Tran, T.K.C., Vu, T.N., Phan, T.C., Nguyen, T.H. and Kennedy, I.R. 2011. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).

Hu, X., Chen, J. and Guo, J. 2006. Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World journal of Microbiology and Biotechnology, 22(9), 983-990.

Husen, E., Simanungkalit, R.D., Saraswati, R., and Irawan, J. 2007. Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. Indonesian Journal of Agricultural Science, 98, 31-38

Khayamim, F., Khademi, H. and Salehi, M.H., 2010. Mineralogical changes in clay-sized phlogopite and muscovite as affected by endophyte fungi-tall fescue symbiosis.

Kizilkaya, R. 2009. Nitrogen fixation capacity of Azotobacter spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of Environmental Biology 31(1): 73- 82.

Motsara, M.R., and Roy, R.N. 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The University of Michigan, USA.

Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M., and Mahmood, K. 2018. Perspectives of using l-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. Pedosphere, 28(1), 16-34.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS microbiology Letters, 170(1), 265-270.

Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry, 270(45), pp.26723-26726.

Santhosh, G.P. 2015. Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. IJRBAT, II, 7, 243-247.

Sarikhani, M.R., Khoshru, B., and Oustan, S. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in-vitro conditions. Geomicrobiology Journal, 33(9), 832-838.

Sarikhani, M.R., Oustan, S., Ebrahimi, M. and Aliasgharzad, N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European journal of soil science, 69(6), 1078-1086.

Singh, P.P., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, S.K. and Prakash, B. 2019. Mechanisms of Plant-Microbe Interactions and its Significance for Sustainable Agriculture. In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture (pp. 17-39). Wood head Publishing.

Sinha, A.K., Parli Venkateswaran, B., Tripathy, S.C., Sarkar, A. and Prabhakaran, S. 2019. Effects of growth conditions on siderophore producing bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. Journal of basic microbiology.

Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian journal of agricultural research, 9(6), 782-787.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255, 571–586.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Qualitative Control of Phosphozist and Phosphonitrokara Biofertilizers

MR Sarikhani[1], B Khoshru[2]*, M Norouzpour[3], S Aliyar[3] and Z Mardani[3]

[1] Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

[2] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

[3] M. Sc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

Abstract

In this research, two samples of domestic biofertilizers including phosphozist and phosphonitrokara were evaluated and quality control in terms of microbial population and characteristics of promoting plant growth. The results of microbial counting showed that the number of live cells per gram (CFU / g) of phosphozist and phosphonitrokara biofertilizers was obtained 1.5×10^8 and 3.1×10^7 CFU / g, respectively. According to the claims made by the manufacturer companies about the microbial population of biofertilizers, phosphozist biofertilizers to be true claimed that is a product of the Kesht Kargostar Nojan Company, but phosphonitrokara biofertilizer produced in the Kara Company has a lower microbial population than the manufacturer claims. 7 isolates of phosphozist (FZ2, FZ1, FZ3, FZ4, FZ5, FZ6 and FZ7) and 3 isolates of phosphonitrokara (FN1, FN3 and FN4) were obtained. In phosphate dissolution, phosphozist was better than phosphonitrokara. The isolates were not identified in phosphonitrokara, but due to the growth of some of the isolates in the LG medium, the presence of nitrogen fixing bacteria in this biofertilizer is confirmed. In addition to these properties, the release of K from mica, production of auxin and siderophore were observed in some of the two biofertilizer isolates.

Keywords: phosphate solubilizing bacteria, potassium release and auxin production.

*Corresponding Author: bahmankhoshru@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

کنترل کیفی کودهای زیستی فسفازت و نیتروزیست

محمدرضا ساریخانی[۱]، بهمن خوشرو[۲]*، مریم نوروزپور[۳]، سجاد علیار[۳] و زهرا مردانی[۳]

[۱] دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در این آزمایش دو نمونه از کودهای زیستی کشور شامل فسفازت و نیتروزیست از نظر جمعیت میکروبی و ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند. براساس ادعای شرکت‌های تولیدکننده، کود فسفازت محصول شرکت آلکان برای تامین نیتروژن و فسفر و کود نیتروزیست محصول شرکت نوژان برای تامین نیتروژن گیاه عرضه می‌شوند. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که تعداد جمعیت میکروبی کود زیستی فسفازت و نیتروزیست به ترتیب ۲×۱۰^{۸} و ۴×۱۰^{۶} CFU/g می‌باشد. هفت جدایه از فسفازت (AF2، AF3، AF4، AF6، AF7، AF8 و AF10) و شش جدایه از نیتروزیست (NZ1، NZ2، NZ3، NZ4، NZ5 و NZ7) بدست آمد. حضور این تعداد جدایه مختلف در یک کود زیستی می‌تواند سوال برانگیز باشد و احتمال حضور آلودگی در کود را تشدید نماید. اگرچه شناسایی مولکولی جدایه‌ها در این مطالعه صورت نپذیرفت اما ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه در این کودها نشان داد که برخی جدایه‌های کود فسفازت دارای ویژگی‌های دیگری مانند آزادکنندگی پتاسیم، تولید اکسین و سیدروفور است همچنانکه ویژگی انحلال فسفات کم محلول، تولید اکسین و سیدروفور برای کود نیتروزیست نیز مشاهده شد.

کلمات کلیدی: فسفات، آزادکنندگی پتاسیم و تولید سیدروفور.

مقدمه

هدف از کشاورزی پایدار به حداقل رساندن اثرات زیان‌آور نهاده‌های سنتزی مانند کودهای شیمیایی بر محیط زیست و انسان و در کنار آن استفاده از نهاده‌های آلی برای تأمین عناصر غذایی می‌باشد (آدسموبه و کلوپر، ۲۰۰۹؛ رز و همکاران، ۲۰۱۹). از این رو کشاورزی پایدار از طریق جایگزینی مواد شیمیایی با کودهای آلی و زیستی، درصدد افزایش حاصل‌خیزی و سلامت خاک، حفظ محیط زیست و افزایش کیفیت محصولات می‌باشد (رز و همکاران، ۲۰۱۹)، علاوه بر کودهای آلی، مصرف کودهای زیستی جایگاه قابل توجهی در کشاورزی پایدار به منظور جایگزین نمودن نهاده‌های شیمیایی دارا می‌باشند. کودهای زیستی در حقیقت حاوی انواع مختلف باکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR[2]) بوده که توانایی تبدیل عناصر غذایی را از فرم غیرقابل دسترس به فرم قابل دسترس طی فرآیندهای بیولوژیکی دارند (وسی، ۲۰۰۳). شناسایی پتانسیل میکروبی در خاک و به‌کارگیری آن در قالب کودهای زیستی در کشورهای مختلف به چشم می‌خورد. امروزه در نقاط مختلف دنیا شاهد شناسایی و بکارگیری این گروه از باکتری‌ها در قالب کودهای زیستی مختلف هستیم (ساریخانی و همکاران، ۲۰۱۸). به دلیل هدفی که کشاورزی پایدار دنبال می‌کند به میکروارگانیسم-های کارآمد و مفید خاک توجه ویژه‌ای می‌شود و مهم‌ترین مسأله در استفاده حداکثر از مزایای این فناوری، انتخاب سویه موثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)می‌باشد (سینگ و همکاران، ۲۰۱۹). نظر به نتایج امیدوارکننده کودهای زیستی، درحال حاضر واحدهای متعددی از بخش‌های دولتی و خصوصی به تولید کودهای زیستی روی آورده‌اند. خوشبختانه دانش‌کشاورزان در خصوص مزایای استفاده از این‌گونه کودها نیز رو به گسترش است. با این وجود باید به خاطر داشت که تداوم استقبال کشاورزان از کودهای زیستی بستگی به‌کیفیت آن‌ها دارد (ساریخانی و انصاری، ۱۳۹۳). اطمینان از کیفیت و اثربخشی هر محصول جزو حقوق اولیه مصرف کنندگان می‌باشد که می‌بایستی از طریق سازمان‌ها و یا وزارتخانه‌های ذیربط تضمین گردد. کودهای زیستی نیز از این امر مستثنی نبوده و اطمینان از کیفیت اینگونه کودها، اولین موردی است که می‌بایستی از سوی مراجع ذیربط تضمین گردد. به عنوان نمونه در کشور هندوستان شروع این کار به سال ۱۹۷۲ برمی‌گردد (حسین و همکاران، ۲۰۰۷).

*ایمیل نویسنده مسئول: bahmankhoshru@yahoo.com

[2] Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

در ایران نیز به منظور ساماندهی مواد کودی و ارتقاء کیفیت آنها، با استفاده از ظرفیت‌های قانونی موجود "آیین نامه ثبت و کنترل کیفی انواع مواد کودی" تنظیم و موسسه تحقیقات خاک و آب متولی انجام این امر قرار داده شد. کنترل کیفیت کود زیستی عبارت است از سنجش کیفیت و توان کودهای زیستی به لحاظ برخی ویژگی‌ها از قبیل تعداد جمعیت میکروبی، توانایی تثبیت نیتروژن، توان انحلال فسفات نامحلول، توان تولید اکسین، قدرت رهاسازی پتاسیم و همچنین تشخیص عدم وجود آلودگی و تایید گونه‌های میکروبی بکار رفته در کود زیستی با استفاده از تکنیک‌های خاص (ساریخانی و انصاری ۱۳۹۳). در پژوهشی ساریخانی و انصاری (۱۳۹۳) اقدام به بررسی کیفیت چهار نوع کود زیستی رایج در ایران (بارور۲، نیتروکسین، بیوسوپرفسفات و سوپرنیتروپلاس) نمودند. بررسی ویژگی‌های محرک رشدی گیاه این کودها نشان داد که از نظر ویژگی حل‌کنندگی فسفات، بارور۲ و بیوسوپرفسفات و در تولید اکسین نیز نیتروکسین و بارور۲ عملکرد خوبی داشتند و هیچ کدام از این کودها ویژگی آزادکنندگی پتاسیم نداشتند.

یکی از جنبه‌های مهم کنترل کیفیت کودهای زیستی، جمعیت میکروبی فعال گونه‌های بکارگیری شده و ویژگی افزایندگی رشد آنها می‌باشد. لذا در پژوهش حاضر، به بررسی برخی از جنبه‌های کنترل کیفیت کودهای زیستی از قبیل شمارش جمعیت میکروبی، ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه توسط سویه‌های جدا شده، از کودهای زیستی فسفازت و نیتروزیست پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کودهای زیستی مورد مطالعه

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز انجام گرفت. در این پژوهش دو کود زیستی شامل فسفازت (محصول شرکت آلکان) و نیتروزیست (محصول شرکت کشت کار گستر نوژان) مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- اطلاعات قید شده از طرف تولیدکنندگان کودهای زیستی مورد آزمایش در این تحقیق

کود زیستی	شرکت تولیدکننده	جنس و گونه باکتری	برخی ویژگی‌ها	تاریخ اعتبار
نیتروزیست	کشت کار گستر نوژان	اطلاعاتی قید نشده است	۱/۵×۱۰^{۸} CFU/g -NFB	۹۷/۲/۱۶
فسفازت	آلکان	*Bacillus, A. lipoferum* *Citobacter amalonaticus*	۲×۱۰^{۹} CFU/g	۹۷/۱۰/۵

شمارش جمعیت میکروبی و جداسازی جدایه‌های موجود در کود زیستی

کنترل جمعیت میکروبی فعال و زنده در کود زیستی یکی از مراحل مهم در کنترل کیفیت این نوع کودها می‌باشد که در این مرحله علاوه از تعیین جمعیت میکروبی فعال، تایید سویه میکروبی و وجود یا عدم وجود آلودگی در کود زیستی نیز مشخص می‌گردد (ساریخانی و انصاری، ۱۳۹۳). برای مشخص نمودن جمعیت میکروبی، ابتدا سری‌های رقت تهیه شد و از چهار رقت پایانی (رقت 10^{-9}، 10^{-8}، 10^{-7} و 10^{-6}) در دو تکرار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد عمومی و اختصاصی انتقال داده شد، برای این منظور از محیط کشت عمومی NA و دو محیط کشت نیمه-اختصاصی Sperber و LG استفاده شد که به ترتیب برای رشد عموم باکتری‌ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از نوع *Azotobacter* و *Azospirillum* قابل استفاده می‌باشد (لیلاسی و ساریخانی، ۱۳۹۷؛ موتسارا و روی، ۲۰۰۸). بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی از رقت‌های مورد نظر در محیط کشت‌های فوق، شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها صورت پذیرفت، و براساس فنوتیپ و ریخت کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد (خوشرو و ساریخانی، ۱۳۹۷).

اندازه‌گیری ویژگی‌های PGP جدایه‌های موجود در کودهای زیستی

ارزیابی نیمه‌کمی و کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط اسپربر جامد (خوشرو و ساریخانی ۱۳۹۷) و مایع (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶)، آزمون کمی میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا در محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) و سیاه (بیوتیت) (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸)، تولید اکسین جدایه‌ها در حضور و عدم حضور ال-تریپتوفان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط LB (بریک و همکاران ۱۹۹۱) و تولید سایدروفور (علی اصغرزاد و همکاران ۲۰۰۹) برای تمام جدایه‌ها انجام گرفت.

جدول ۲- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌ها

محیط کشت Medium	اجزای محیط کشت (g/l) Components of the medium
LB	Peptone 10; NaCl 10; Yeast Extract 5
NB	Peptone 5; NaCl 5; Yeast Extract 1.5; Meat extract 1.5
Sperber	Glucose 10; Yeast extract 0.5; $CaCl_2$ 0.1; $MgSO4.7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO_4)2$ 2.5; Agar 15.
Aleksandrov	Glucose 5; $Ca_3(PO_4)_2$ 2; $MgSO_4.7H_2O$ 0.5; $FeCl_3$ 0.005; CaCO3 0.1; Mica 2
LG	Sucrose 20; K_2HPO_4 0.05; KH_2PO_4 0.15; $MgSO_4.7H_2O$ 0.2; $CaCO_3$ 1; $CaCl_2$ 0.01; $FeCl_2$ 0.01; $Na_2MoO_4.4H_2O$ 0.002; Agar 15.

تجزیه آماری داده‌ها

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

شمارش جمعیت میکروبی

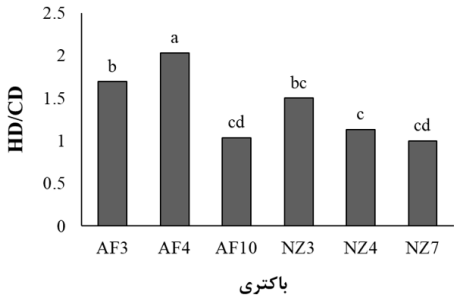
نتایج حاصل از شمارش جمعیت میکروبی در جدول ۳ آورده شده است. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که کود زیستی فسفازت محصول شرکت آلکان با جمعیت اولیه ۲×۱۰^{۹} CFU/g بوده (ادعای شرکت سازنده) که در این تحقیق صحت جمعیت میکروبی این کود زیستی تایید گردید. شمارش این کود در سه محیط اسپربر، LG و NA نشان داد که انتخاب محیط کشت مناسب جهت بررسی جمعیت میکروبی بسیار دارای اهمیت می‌باشد چرا که تنها محیط LG صحت جمعیت کود فسفازت را تایید می‌کند و از آنجایی که این محیط به دلیل فقدان نیتروژن برای تثبیت کنندگان نیتروژن مناسب می‌باشد لذا ادعای شرکت سازنده مبنی بر وجود باکتری تثبیت‌کننده در این کود نیز تایید می‌گردد. کود نیتروزیست که متعلق به شرکت کشت کار گستر نوژان می‌باشد دچار کاهش جمعیت میکروبی شده بود. حفظ جمعیت میکروبی در کودهای زیستی عامل مهمی بوده و به عواملی همچون نوع میکروب، نوع حامل، فرمولاسیون، رطوبت اولیه، مقدار عناصر غذایی، عدم وجود آلودگی و غیره بستگی دارد (سانتوش، ۲۰۱۵).

جدول ۳- جمعیت میکروبی فعال در کودهای زیستی.

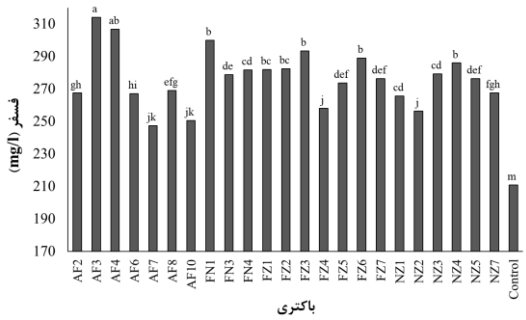
کود زیستی	جمعیت اولیه (CFU/g)	شمارش جمعیت میکروبی (CFU/g)		
		Sperber	LG	NA
فسفازت	۲×۱۰^{۹}	$۱/۷ \times ۱۰^{۵}$	۲×۱۰^{۸}	$۴/۶ \times ۱۰^{۷}$
نیتروزیست	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	انجام نشده	۴×۱۰^{۶}	$۱/۲ \times ۱۰^{۶}$

آزمون کیفی و کمی توان حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات

توانایی انحلال فسفات نامحلول معدنی را می‌توان به عنوان یکی از پتانسیل‌های مهم تحریک رشد گیاه توسط باکترهای PGPR در نظر گرفت. این توانایی در شرایط درون شیشه در تعداد زیادی از ریزجانداران مشاهده شده است (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶). اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) مشخص کرد که از ۱۳ جدایه مورد بررسی تنها ۷ جدایه قادر به رشد در محیط اسپربر جامد و تشکیل هاله بودند (شکل ۱). جدایه AF4 بزرگترین هاله انحلال را ایجاد کرد (۲/۱ =HD/CD). جدایه‌های AF3 و NZ3 در رتبه‌های بعدی قرار داشتند که دارای نسبت HD/CD بالای ۱/۵ بودند (شکل ۱). در بخش ارزیابی انحلال کمی فسفات نامحلول نیز بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0.01$). جدایه AF3 دارای بیشترین مقدار انحلال فسفات (۳۱۴ میلی‌گرم بر لیتر) در بین سایر باکتری‌ها بود. جدایه‌های AF4 و NZ4 در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. محدوده انحلال باکتری‌ها بین ۲۴۷-۳۱۴ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۲). ضریب همبستگی بین دو روش کمی و نیمه کمی (کیفی)، مثبت و برابر ۰/۶۶ بدست آمد ($P<0.01$).



شکل ۱- ارزیابی کیفی انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها.

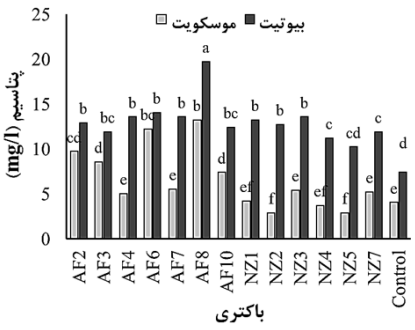


شکل ۲- میزان انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها در روش ارزیابی کمی.

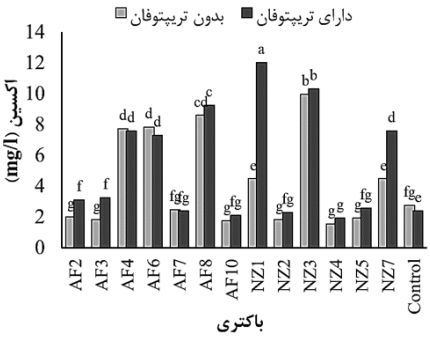
مقایسه جدایه‌ها از نظر میزان آزادکنندگی پتاسیم از کانی‌های میکا، تولید اکسین و تولید سیدروفور

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های موسکویت و بیوتیت نشان داد که جدایه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بر میزان رهاسازی پتاسیم هستند ($P<0.01$). مقدار آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت به مراتب بیشتر از کانی موسکویت بود. جدایه AF8 (از کود فسفازت) بیشترین مقدار پتاسیم را از بیوتیت (۱۹/۷ میلی‌گرم بر لیتر) و موسکویت (۱۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) آزاد کرد. جدایه AF6 (۱۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر) بعد از AF8 بیشترین میزان آزادسازی پتاسیم بین لایه‌ای از موسکویت را از خود نشان دادند. محدوده آزادکنندگی پتاسیم جدایه‌ها برای بیوتیت ۱۰/۲ – ۱۹/۷ و برای موسکویت ۲/۸-۱۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر تولید اکسین نیز نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر مقدار تولید هورمون اکسین (IAA) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<0.01$). بیشترین تولید اکسین مربوط به جدایه NZ1 با مقدار ۱۲/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر در حضور تریپتوفان و ۴/۴۷ میلی‌گرم بر لیتر در عدم حضور تریپتوفان بود. جدایه‌های NZ3، AF8 و NZ7 در رتبه‌های بعد قرار داشتند (شکل ۴). همچنین نتایج نشان داد که افزودن تریپتوفان بر تولید اکسین برای برخی جدایه‌ها تاثیر کاملاً معنی‌داری دارد ($P<0.01$). بیشترین تاثیر تریپتوفان بر توان تولید اکسین در جدایه‌های NZ1 و NZ7 مشاهده شد. اضافه کردن تریپتوفان باعث افزایش تولید اکسین در جدایه NZ1 از ۴/۴۷ به ۱۲/۱ میلی‌گرم بر لیتر (۶۲/۷ درصد) شد (شکل ۴). در گزارش‌های بسیاری آمده است که افزایش غلظت تریپتوفان، تولید اکسین را افزایش می‌دهد (حسن و بانو، ۲۰۱۵). نتایج آنالیز واریانس بخش تولید سایدروفور نیز نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر تولید سایدروفور اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<0.01$). اکثر جدایه‌های مورد ارزیابی توان تولید سایدروفور را از خود نشان دادند ولی بالاترین میزان تولید سیدروفور مربوط به جدایه‌های AF8، AF3 و NZ3 به ترتیب ۹۲/۴، ۸۳/۵ و ۷۸/۵ میکرومول بر لیتر بودند (شکل ۵). همچنین نتایج نشان داد که بین تولید سایدروفور جدایه‌ها و میزان آزاد سازی پتاسیم از کانی بیوتیت همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (r=۰/۶۲). جدایه AF8 هم در تولید سایدروفور و هم رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت بیشترین عملکرد را نشان داد. به نظر می‌رسد که سایدروفور تولیدی این باکتری در امر رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت نقش غیر مستقیم داشته به این صورت که سایدروفور منجر به خروج آهن از ساختار بیوتیت[3]شده (شکل ۵) و با سست شدن ساختار، کانی مستعد تخریب شده و پتاسیم بین لایه‌ای آن آزاد گشته که در ادامه توسط باکتری و یا گیاه جذب خواهد شد (ایوانووا و همکاران، ۲۰۰۹).

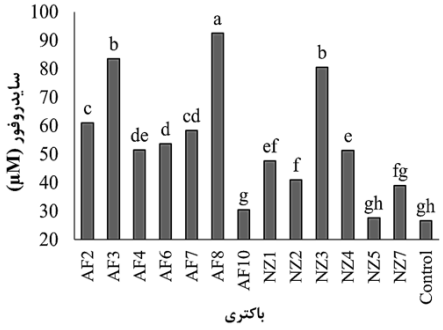
[3] K (Mg, Fe) $_3$(AlSi $_3$O $_{10}$) (F, OH) $_2$



شکل ۳- مقادیر آزادسازی پتاسیم از کانی میکا توسط جدایه‌ها.



شکل ۴- تولید اکسین (IAA) توسط جدایه‌ها.



شکل ۵- تولید سایدروفور توسط جدایه‌ها

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش ارزیابی کیفی دو نمونه از کودهای زیستی داخل کشور شامل فسفازت و نیتروزیست بود که از دو جنبه تعیین جمعیت میکروبی فعال و ارزیابی ویژگی‌های افزاینده رشد گیاه انجام گردید. کود زیستی فسفازت محصول شرکت آلکان از نظر تامین نیتروژن و فسفر مورد توجه است. با وجود اینکه شناسایی سویه‌های باکتریایی موجود در این کودها انجام نشده است ولی به دلیل رشد برخی از سویه‌های این کود در محیط LG، به نظر حضور تثبیت کننده‌های نیتروژن در این کود را شاهد هستیم. همچنین نتایج نشان داد که کود فسفازت هم از نظر جمعیت میکروبی فعال و هم از نظر ویژگی‌های افزایندگی رشد گیاه دارای وضعیت مطلوبی نسبت به کود نیتروزیست می‌باشد. کود زیستی نیتروزیست نیز از نظر تامین نیتروژن گیاه مورد توجه است و حضور باکتری تثبیت کننده نیتروژن بخاطر رشد باکتری روی محیط LG مورد تایید است. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که کود زیستی نیتروزیست دارای جمعیت کمتری نسبت به جمعیت مورد ادعای شرکت سازنده بود. هرچند در این تحقیق آزمایش گلدانی یا مزرعه‌ای انجام نگرفت ولی توانایی‌های جدایه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای تعیین گردید که مبنای اثربخشی آنها روی گیاه است. انجام پایش و کنترل کیفیت کودهای زیستی امری ضروری است و به منظور تامین اعتماد مصرف‌کنندگان بایستی مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

منابع

خوشرو، ب.، ساریخانی، م. ر. ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاته. مجله آب و خاک. جلد ۳۲، شماره ۱، ۱۶۷- ۱۵۵.

ساریخانی، م. ر.، انصاری، س. ۱۳۹۳. بررسی برخی از ویژگیهای کیفی کودهای زیستی رایج در کشور. دانش کشاورزی و تولید پایدار. ویژه‌نامه نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. صفحات ۱-۱۴.

لیلاسی، م.، ساریخانی، م. ر. ۱۳۹۷. ارزیابی تثبیت بیولوژیک نیتروژن برخی جدایه‌های ازتوباکتر در محیط کشت جامد و مایع LG به روش کجلدال. دانش آب و خاک. جلد ۲۸، شماره ۲، صفحات ۲۰۵-۲۱۵.

Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. 2009. Plant microbe's interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1–12.

Aliasgharzad, N., Shirmohamadi, E. and Oustan, S., 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil Environ*, *28*(2), 119-123.

Bric, J., Bostock, M., and Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbial, 57, 755 -760.

Husen, E., Simanungkalit, R.D., Saraswati, R., and Irawan, J. 2007. Characterization and quality assessment of Indonesian commercial biofertilizers. Indonesian Journal of Agricultural Science, 98, 31-38

Ivanova, E.A., Chizhikova, N.P., Zenova, G.M., Omarova, E.O. and Manucharov, A.S. 2009. Biodegradation of clay minerals under the influence of cyanobacterial-actinomycetal associations. Moscow University Soil Science Bulletin, 64(3), 108-112.

Motsara, M.R., and Roy, R.N. 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The University of Michigan, USA.

Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M., and Mahmood, K. 2018. Perspectives of using l-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. *Pedosphere*, *28*(1), 16-34.

Rose, D.C., Sutherland, W.J., Barnes, A.P., Borthwick, F., Ffoulkes, C., Hall, C., Moorby, J.M., Nicholas-Davies, P., Twining, S. and Dicks, L.V. 2019. Integrated farm management for sustainable agriculture: Lessons for knowledge exchange and policy. Land Use Policy, 81, 834-842.

Santhosh, G.P. 2015. Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. IJRBAT, II, 7, 243-247.

Sarikhani, M.R., Khoshru, B., and Oustan, S. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in-vitro conditions. Geomicrobiology Journal, 33(9), 832-838.

Sarikhani, M.R., Oustan, S., Ebrahimi, M. and Aliasgharzad, N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European journal of soil science, 69(6), 1078-1086.

Singh, P.P., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, S.K. and Prakash, B. 2019. Mechanisms of Plant-Microbe Interactions and its Significance for Sustainable Agriculture. In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture (pp. 17-39). Wood head Publishing.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255, 571–586.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Qualitative Control of Phosphoazot and Nitrozist Biofertilizers

MR Sarikhani[1], B Khoshru[2*], M Norouzpour[3], S Aliyar[4] and Z Mardani[5]

[1] Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

[2] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

[3] M. Sc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

Abstract

In this experiment, two samples of domestic biofertilizers including phosphoazot and nitrozist in terms of microbial population and growth enhancing properties of the plant were subjected to qualitative control. According to the manufacturer's claims, phosphoazot biofertilizer, Alcan Co product, for supply nitrogen and phosphorus, and nitrozist biofertilizer, Nojan Co. product, to supply nitrogen for the plant are offered. The results of microbial population count showed that the number of microbial populations of phosphoazot and nitrozist biofertilizers are 2×10^8 and 4×10^6 CFU g^{-1}, respectively. Seven isolates of phosphoazot (AF2, AF3, AF4, AF6, AF7, AF8 and AF10) and six isolates of nitrozist (NZ1, NZ2, NZ3, NZ4, NZ5 and NZ7) were obtained. The presence of so many different strains in a biofertilizer can be questionable and likely exacerbate the presence of contaminants in fertilizers. Although the molecular identification of isolates was not made in this study, however, the characteristics of plant growth prompting in these biofertilizers showed that some isolates of phosphoazot have other properties such as potassium release, production of auxin and siderophore as the solubility of low soluble phosphate, the production of auxin and siderophore was observed for nitrozist biofertilizer.

Keywords: Phosphate, Potassium releasing and Siderophores production.

*Corresponding Author: bahmankhoshru@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک وکودهای زیستی

اثر همزیستی میکوریزایی بر محتوای پرولین وکلروفیل برگ گندم درشرایط شور

جمعه الجمعه[۱*]، امیرلکزیان[۲]، اکرم حلاج نیا[۳]،

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

شوری به‌عنوان تنش غیر زیستی، مشکلات فراوانی را برای بذور در دوره جوانه‌زنی ایجاد کرده و بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارد. این پژوهش به‌منظور ارزیابی تحمل به تنش شوری گیاه گندم در مرحله جوانه‌زنی و رشد گیاه به‌صورت آزمایش گلدانی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در پاییز ۱۳۹۷ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح شوری (۲، ۴، ۶ دسی زیمنس بر متر) و دو سطح میکوریزا آربوسکولار (فانلی فورمس موسه و عدم میکوریزا) بود. نتایج آزمایش نشان داد که شوری و قارچ میکوریزا اثر معنی‌داری بر محتوای پرولین و کلروفیل a ($p<۰/۰۱$) و کلروفیل b($p<۰/۰۵$) برگ گیاه گندم داشت. با افزایش شوری محتوای پرولین در هر دو تیمار میکوریزی و غیرمیکوریزی افزایش یافت. گیاهان تلقیح شده میکوریزی در کلیه سطوح شوری محتوای پرولین کمتری نسبت به شاهد بدون تلقیح نشان دادند. افزایش سطح شوری همچنین محتوی کلروفیل a و b را کاهش داد، اما این کاهش در کلروفیل b بیشتر بود و با افزایش سطح شوری نسبت کلروفیل a به b افزایش پیدا کرد.

کلمات کلیدی: تنش محیطی، تنش شوری، فانلی فورمس موسه

مقدمه

سمیت یونی ناشی از غلظت بالای نمک‌ها در خاک و آب آبیاری، از مهم‌ترین تنش‌های اسمزی در زمین‌های کشاورزی دنیا ازجمله ایران با اقلیمی گرم و خشک محسوب می‌شود (اشرف، ۱۹۹۴). تنش شوری خاک، رشد، عملکرد و فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاهان به‌ویژه محصولات زراعی را تحت تأثیر قرار داده و ازاین‌رو از مهم‌ترین مشکلات بخش کشاورزی در نظر گرفته می‌شود (اکوستا موتو وهمکاران، ۲۰۱۷). گیاهان به هنگام مواجه به شوری به‌منظور حفظ تعادل اسمزی با تجمع ترکیبات آلی خاصی مثل ساکاروز و سنتز آمینواسیدهای ویژه‌ای مثل پرولین، پتانسیل آب دورنی خود را کاهش می‌دهند. قارچ‌های میکوریزا آربسکولار نقش مهمی در تولید این ترکیبات آلی به عهده‌دارند (خلیل، ۲۰۱۰). تنش شوری علاوه بر تأثیر بر گیاه میزبان بر قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار تأثیرگذار است (اورتاس وهمکاران، ۲۰۱۱). پرولین نقش مهمی در تنظیم اسمزی و حفاظت ساختارهای درون‌سلولی در گیاهان تحت تنش دارد (اشرف و فولاد، ۲۰۰۷). تجمع قندهای محلول توسط همزیستی میکوریزایی یک پاسخ مثبت به تنش شوری است، زیرا قندها باعث جلوگیری از تغییر ساختار پروتئین‌های محلول، حفظ تعادل اسمزی در سلول‌های گیاه و حفظ تمامیت غشاء می‌شوند (عبد الباقی وهمکاران، ۲۰۰۰). این آزمایش باهدف بررسی تأثیر قارچ‌های میکوریزا بر محتوی پرولین وکلروفیل گیاه گندم در شرایط تنش شوری به‌عنوان شاخصی از تحمل به تنش شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در پاییز ۱۳۹۷ به‌صورت گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی - دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۳ سطح شوری (۲، ۴، ۶ دسی زیمنس بر متر) و ۲ سطح میکوریزا آربوسکولار (فانلی فورمیس موسه و بدون میکوریزا) بودند. برای انجام این آزمایش خاک سطحی از عمق (۰-۳۰ سانتی‌متر) از دانشگاه فردوسی مشهد نمونه‌برداری شد و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری تا زمان شروع آزمایش در محلی مناسب نگهداری شد. به‌منظور حذف قارچ‌های بومی خاک و

* ایمیل نویسنده مسئول: gmaagmaa91@gmail.com

به‌طورکلی ایجاد یک محیط عاری از قارچ و حذف عوامل بیماریزا، نمونه خاک در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شد و در محیط مناسب تا زمان شروع آزمایش نگهداری شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک با روش‌های معمول آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. ۸ عدد بذر گندم واریته سیروان در گلدان‌های ۳ کیلویی ضدعفونی شده (الکل ۷۰٪) کاشته شد و پس از سبز شدن به ۵ عدد تنک شد، گلدان‌ها در گلخانه در دمای مناسب و رطوبت زراعی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۶۰ روز گیاه برداشت شد. سپس نمونه گیاهی جمع شد و برای انجام آزمایشات به آزمایشگاه انتقال یافت. ۱۰۰ گرم خاک حاوی مایه تلقیحی قارچی در منطقه رشد ریشه به گلدان‌ها اضافه گردید. به گلدان‌هایی که تیمار میکوریزای (فانلی فورمس موسه) را نداشتند ۱۰۰ گرم مایه تلقیح اتوکلاو شده (فانلی فورمس موسه) اضافه شد تا از ایجاد تفاوت احتمالی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک اجتناب شود. برای شور کردن خاک نیز از مخلوط چهارترکیب $MgSO_4.7H_2O$، Na_2SO_4، NaCl و $CaCl_2.2H_2O$ استفاده شد. مقدار ۴۱۸۲، ۲۰۳۶، ۹۱ و ۳۶۹۱ میلی‌گرم از هریک از نمک‌های فوق به ترتیب برای تهیه ۱۰ گرم نمک مخلوط استفاده شد (برین و همکاران، ۱۳۸۵ الف و ب؛ علی‌اصغر زاده، ۱۳۷۹). سپس برای ایجاد هدایت الکتریکی‌های موردنظر در نمونه خاک مورد آزمایش به ترتیب مقدار ۰/۵، ۱/۲، ۱/۶ گرم از ترکیب نمک ساخته‌شده به ازای هر کیلوگرم خاک اضافه تا اینکه هدایت الکتریکی‌های ۲، ۴ و ۶ دسی زیمنس بر متر در نمونه خاک حاصل شد. مقدار پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری مقدار کلروفیل از روش Arnon (۱۹۶۷) استفاده شد. در پایان آزمایش اطلاعات حاصل با نرم‌افزار آماری JAMP 8 آنالیز و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داده‌شده است. با توجه به جدول آنالیز واریانس مشاهده می‌شود که شوری و قارچ میکوریزا هر دو بر محتوی پرولین برگ گیاه گندم و میزان کلروفیل a در سطح آماری ۱ درصد تأثیر معنی‌داری داشته‌اند. تأثیر این دو فاکتور بر محتوای کلروفیل b معنی‌دار بود اما این معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد رخ داد. البته دو فاکتور مورد آزمایش بر نسبت کلروفیل a/b تأثیر معنی‌داری نداشتند. تأثیر متقابل شوری و قارچ میکوریزا بر میزان پرولین در گیاه گندم ازنظر آماری تأثیر معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد که شوری و قارچ میکوریزا تأثیر متفاوتی بر گیاه در مقابله با شوری دارند. شوری تأثیر منفی و قارچ میکوریزا تأثیر مثبت بر روی گیاه در شرایط آزمایش داشته است. به همین دلیل تأثیر متقابل این دو فاکتور که در دو جهت متقابل عمل کرده است که این امر سبب شده است تا تأثیر متقابل این دو فاکتور ازنظر آماری معنی‌دار نشود.

جدول (۱) نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) بین داده‌های پرولین و محتوی کلروفیل a و b و نسبت کلروفیل a/b

منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	محتوی کلروفیل a	محتوی کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b
شوری	۲	۱۵۱/۹۸**	۰/۵۲۹۵**	۰/۱۵۵۲*	۱/۴۳۵۰ns
میکوریزا	۱	۲۴/۱**	۱/۱۰۳۱**	۰/۲۸۱۷*	۰/۰۱۵۹۰ns
شوری *میکوریزا	۲	۱/۷۰ns	۰/۵۲۴۶**	۰/۵۳۲۰**	۴/۹۰۲۴**
خطا	۱۲	۰/۶۱۵	۰/۰۲۲۶	۰/۰۳۴۵	۰/۴۷۰۹۶

**و* به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ در صد؛ ns: غیر معنی‌دار

به مراجعه به جدول ۲ مربوط به مقایسه میانگین‌ها می‌توان دریافت که تلقیح گیاه گندم با قارچ میکوریزا سبب کاهش میزان پرولین در برگ گیاه گندم شده است. به نظر می‌رسد که قارچ میکوریزا با افزایش فراهمی آب برای گیاه نیاز تولید پرولین توسط گیاه را شدیداً کاهش داده است و به همین دلیل میزان پرولین در تیمارهای حاوی قارچ میکوریزا در گیاه گندم کاهش‌یافته است. گیاهان میکوریزی با استفاده از روابط آبی و تغذیه‌ای بهتر نسبت به گیاهان غیر میکوریزی، قادرند از شرایط تنش خشکی به‌طور موقت فرار کنند؛ بنابراین میزان پرولین و قندهای محلول در گیاهان همزیست باقارچ نسبت به گیاهان غیر میکوریزی افزایش کمتری نشان می‌دهند (اسماعیل‌پور و همکاران، ۱۳۹۲)؛ اما این میزان پرولین در رابطه با شوری روندی متفاوت با فاکتور میکوریزا داشت. بدین معنی که با افزایش شوری یا هدایت الکتریکی، میزان پرولین برگ افزایش یافت. کمترین محتوی پرولین در تیمار شوری ۲ دسی زیمنس بر متر و بیشترین مقدار آن در تیمار شوری ۶ دسی زیمنس بر متر به ترتیب به میزان ۴/۸۰ و ۱۴/۸۵ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر برگ مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲: اثرات اصلی قارچ و سطوح شوری بر پرولین و محتوی کلروفیل و نسبت کلروفیل در گندم

تیمارها	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b
بدون تلقیح میکوریزا	۱۱/۱۵^{a}	۱/۱۹^{b}	۰/۶۸۸^{b}	۲/۱۵۱^{a}
میکوریزا	۸/۸۳^{b}	۱/۶۸^{a}	۰/۹۳۸^{a}	۲/۰۹۱^{a}
شوری ۲	۴/۸۰^{c}	۱/۶۶^{a}	۰/۶۲۸^{b}	۲/۶۷۵^{a}
شوری ۴	۱۰/۳۱^{b}	۱/۵۴^{a}	۰/۹۱۴^{a}	۱/۹۴۲^{ab}
شوری ۶	۱۴/۸۵^{a}	۱/۱۰^{b}	۰/۸۹۸^{a}	۱/۷۴۷^{b}

میانگینهای داری حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح ۱ و ۵ در صد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند

همان‌طور که در جدول یک نشان داده شد برهمکنش شوری و قارچ میکوریزا بر محتوی پرولین برگ گندم تأثیر معنی‌داری نداشت؛ اما با مراجعه به جدول ۳ و مقایسه میانگین برهمکنش شوری و میکوریزا بر میزان پرولین می‌توان گفت که میکوریزا در تمام سطوح شوری سبب کاهش پرولین برگ گندم شده است. در تیمارهای ۲، ۴ و ۶ دسی زیمنس بر متر به ترتیب سبب کاهش ۲۵، ۳۰ و ۲۵ درصدی میزان پرولین نسبت به برگ گیاه غیر میکوریزایی شد. نکته قابل‌توجه این است که در تیمارهای میکوریزی نسبت به غیر میکوریزی محتوی پرولین کمتر بوده که نشان دهنده تنش کمتر در این گیاهان است. ؛ به‌عبارت‌دیگر با افزایش میزان شوری گیاه تلقیح شده با میکوریزا در کاهش پرولین بهره‌مندی بیشتری را به دست آورده است. Rabie (۲۰۰۵) گزارش کرد که پرولین به‌عنوان یک اسمولیت حفاظت کننده و غیر سمی در شرایط شور عمل می‌کند و تجمع آن در باقلای غیر میکوریزایی در سطوح مختلف شوری (۶ -۰) دسی زیمنس بر متر همواره بالاتر از باقلای میکوریزایی بود. به عبارتی نتایج این تحقیق علی‌رغم تفاوت گیاه مورد آزمایش با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

جدول ۳: اثرات متقابل شوری و قارچ میکوریزا بر محتوای پرولین و کلروفیل a و b و نسبت کلروفیل a/b

شوری (ds/m)	میکوریزا	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b
۲	میکوریزا	۴/۲۶^{e}	۲/۰۹^{a}	۰/۷۷^{bc}	۲/۷۳^{a}
۲	بدون میکوریزا	۵/۳۵^{e}	۱/۲۴^{b}	۰/۴۷^{c}	۲/۶۱^{a}
۴	میکوریزا	۸/۸۹^{d}	۱/۹۵^{a}	۰/۷۲^{c}	۲/۷۷^{a}
۴	بدون میکوریزا	۱۱/۷۲^{c}	۱/۱۲^{b}	۱/۰۹^{ab}	۱/۱۱^{b}
۶	میکوریزا	۱۳/۳۴^{b}	۱/۰۰^{b}	۱/۳۰^{a}	۰/۷۷^{b}
۶	بدون میکوریزا	۱۶/۷۳^{a}	۱/۱۹^{b}	۰/۴۸^{c}	۲/۷۲^{a}

میانگین‌های داری حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح ۱ و ۵ در صد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که شوری تأثیر معنی‌داری بر محتوی کلروفیل a (در سطح آماری ۱ درصد) و b (در سطح آماری ۵ در صد) داشت ولی بر نسبت کلروفیل a به b اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). با افزایش میزان شوری محتوی کلروفیل a و b هردو کاهش یافت اما این کاهش در کلروفیل b بیشتر بود درنتیجه نسبت کلروفیل a/b افزایش یافت. محتوی کلروفیل a توسط تیمارهای قارچی به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار عدم تلقیح با قارچ میکوریزا افزایش یافت. رامانو جالیو و همکاران (۱۹۹۳) بیان نمودند در گیاه شاه‌توت تحت تلقیح شده با قارچ میکوریزا اگرچه محتوی کلروفیل کاهش یافت ولی کاهش در کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در شرایط شور همزیستی با قارچ‌های میکوریزا این امکان را برای گیاه فراهم می‌سازد تا با افزایش جذب آب ضرورت تجمع اسمولیت‌های آلی ازجمله پرولین کاهش یابد. قارچ میکوریزا سبب افزایش محتوی کلروفیل a و b در گیاه گندم شد ولی نسبت این دو را

کاهش داد. به نظر می‌رسد که تلقیح گیاه با قارچ میکوریزا می‌تواند آثار نامطلوب شوری را به مقدار هرچند ناچیز کاهش دهد و کشت گیاهان را در تنش شوری بهبود بخشد.

منابع

برین، م. علی‌اصغر زاده، ن. صمدی، ع. ۱۳۸۵ الف. اثر قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر عملکرد و جذب عناصر غذائی در گوجه‌فرنگی تحت شوری حاصل از NaCl و مخلوط نمک‌ها. مجله علوم خاک و آب. ۲۰ (۱): ۱۰۵-۹۴.

برین، م. علی اصغر زاده، ن. صمدی، ع. ۱۳۸۵ ب. اثر شوری حاصل از کلرید سدیم و مخلوط املاح بر غلظت پرولین و برخی شاخص‌های رشد گوجه‌فرنگی در همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۷ (۱): ۱۴۷-۱۳۹.

علی اصغرزاده، ن. ۱۳۷۹. بررسی پراکنش و تراکم جمعیت قارچ‌های میکوریز آربسکولار در خاک‌های شور دشت تبریز و تعیین اثرات تلقیح آن‌ها در بهبود تحمل پیاز و جو به تنش شوری. پایان‌نامه دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

اسماعیل‌پور، ب. جلیل وند، پ. و هادیان، ج. ۱۳۹۲. تأثیر تنش خشکی وقارچ میکوریزا بر برخی از صفات مورفوفیزیولوژیک و عملکرد مرزه (Satureja horensis L.)، نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، جلد ۵، شماره ۲، ص ۱۷۷- ۱۶۹.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Impact of Mycorrhizal Symbiosis on Proline and Chlorophyll Contents of Wheat leaves under Saline Stress

Aljomah*[1], J., A. Lakzian[2], A., Halajnia[3],

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[2] Professor, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Salinity as non-biological stress has caused many problems in seed germination and it also affect plant growth and development. This study was conducted to evaluate the impact of mycorrhizal symbiosis on proline and chlorophyll contents of wheat under saline stress. Experiment was carried in the form of completely randomized with factorial arrangement in three replications in greenhouses condition at Ferdowsi University of Mashhad in the fall of 1397. The experimental factors consisted of three levels of salinity (2, 4, 6 ds/m) and two levels of arbuscular mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*, and non-mycorrhiza). The results showed that salinity and mycorrhizal inoculation had a significant effect on proline and chlorophyll a ($p<0.01$) and chlorophyll b ($p<0.05$) content in wheat leaf... With increasing salt content, proline content increased in both mycorrhizal and non-mycorrhiza treatment. Inoculated plants of mycorrhiza showed lower proline content at all salinity levels than control without inoculation Salinity stress also reduced the content of chlorophyll a and b, but reduction was greater in chlorophyll b content. With increasing salinity, the chlorophyll a/b ratio increased.

Keywords: Environmental stress, salinity stress, *Funneliformis mosseae*

* Corresponding author, Email: gmaagmaa91@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم از ریزوسفر توتون‌های گرمخانه‌ای شمال ایران

عبدالغفور قلی‌زاده[1]، سحر سلیمانی[1] رضا علی‌نژاد[1]، عظیمه حسینی[1] و زهره السادات سید خادمی[1]

[1]محقق مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش

چکیده

یکی از روش‌های آزاد شدن پتاسیم از ساختمان کانی‌هایی مانند میکا استفاده از باکتری‌های حل کننده کانی‌های سیلیکاته می‌باشد. به این منظور تعداد ۲۶ نمونه خاک از ریزوسفر توتون مناطق توتون‌کاری استان‌های مازندران، گلستان و گیلان تهیه و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌ها تعیین شدند. سپس هر نمونه خاک در محیط کشت حاوی منبع پتاسیم نامحلول همراه با کانی مورد نظر کشت شدند تا سویه‌های باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم، جدا شده و به کمک کشت سویه‌های جدا شده در محیط جامد دارای کانی‌های سیلیکاته، باکتری‌های برتر انتخاب شوند. براساس آزمایشات انجام شده از ریزوسفر توتون ۳ استان، ۹ جدایه آزاد کننده پتاسیم جداسازی شد. بیشترین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌ها توسط جدایه پیچک‌محله از کانی فلوگوپیت به مقدار ۳۳۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کانی و بیش‌ترین تنوع باکتری‌ها در جداسازی پتاسیم آزاد شده از کانی فلدسپار (یزد و زنجان) بود. توانایی سویه‌های برتر جدا شده در انحلال پتاسیم و تاثیر آن بر جذب پتاسیم توسط گیاه توتون در گلدان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده توانایی آزادسازی حداقل ۵۶ درصد و حداکثر ۷۴/۵ درصد نیاز پتاسیم را دارا می باشند. لذا جهت تکمیل نیاز پتاسیمی گیاه توتون نیاز به کوددهی شیمیایی پتاسیم می‌باشد.

کلمات کلیدی: پتاسیم، توتون، باکتری‌های حل کننده پتاسیم، جداسازی.

مقدمه

واریته‌های مختلف توتون همانند سایر گیاهان زراعی در دوران زندگی و مراحل رشد به مقادیر معینی از مواد مختلف نیاز دارند تا برگ‌های حاصل دارای کیفیت مناسبی از لحاظ عطر، طعم و خاصیت خوش‌سوزی بوده و نیز وزن و اندازه برگ کامل و مناسب باشد (Farrokh و همکاران ۱۳۸۹). تغذیه صحیح توتون پیش نیاز به دست آوردن محصول با کیفیت و کمیت بالا و بازار پسندی مناسب می‌باشد. تامین عناصر تغذیه‌ای مناسب از جمله پتاسیم یکی از مهم‌ترین فاکتورها در مدیریت محصول می‌باشد (Gholizadeh و همکاران ۱۳۹۲). جذب کلی پتاسیم در توتون بیش از سایر عناصر معدنی است و توتون پتاسیم را تا حد لوکس جذب می‌کند (Farrokh و همکاران ۱۳۸۹). این عنصر به طور عمده در چهار شکل مختلف در خاک وجود دارد که شامل پتاسیم محلول، تبادلی، غیر تبادلی و ساختمانی است. در بین سه شکل مختلف پتاسیم در خاک، غلظت پتاسیم موجود در محلول خاک معمولا بسیار کم است (۱ تا ۲٪ از کل) و بخش عمده پتاسیم (۹۸٪) به صورت نامحلول در خاک، سنگ و مواد معدنی است (Lin و همکاران ۲۰۰۲). گیاهان پتاسیم را در فرم محلول آن جذب می‌کنند. این در حالی است که بخش عمده این عنصر به شکل ذخایر معدنی و کانی‌های خاک بوده و به راحتی در دسترس گیاه نمی‌باشد (Darjdar و همکاران ۱۳۹۳). هرچند کمبود پتاسیم همانند کمبود نیتروژن و فسفر گسترده نیست، اما بسیاری از خاک‌ها که در ابتدا از نظر این عنصر غنی بودند به علت برداشت متوالی محصول، رواناب، آبشویی و فرسایش خاک با کمبود این عنصر مواجه شده‌اند. لذا به منظور تامین پتاسیم مورد نیاز گیاه، پتاسیم محلول و تبادلی باید از طریق اضافه کردن کودهای شیمیایی و یا از طریق آزاد شدن پتاسیم تثبیت شده و هوادیدگی کانی‌های حاوی پتاسیم تامین شود (Rahimzadeh و همکاران ۱۳۹۲). میکروارگانیسم‌های مختلف شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و نیز گلسنگ‌ها نقش بسیار مهمی را در تغییر و تبدیل مواد از فرم غیر قابل دسترس به فرم قابل دسترس برای گیاهان ایفا می‌کنند. به طوری‌که به واسطه فعالیت آن‌ها مقدار مواد در دسترس و مغذی در خاک افزایش یافته و سبب افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی می‌شود. برخی از میکروارگانیسم‌های خاک قادرند کانی‌های سیلیکاتی حاوی پتاسیم همچون موسکوویت، ارتوکلاز، میکروکلاین، بیوتیت، فلدسپار و غیره را حل نموده و پتاسیم موجود در آن‌ها را به فرم محلول درآورده و در دسترس گیاه قرار دهند (Darjdar و همکاران ۱۳۹۳). در میان میکروارگانیسم‌های مختلف حل کننده پتاسیم، باکتری‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند (Rahimzadeh و همکاران ۱۳۹۲). Sheng and Huange (۲۰۰۱) شرایط رهاسازی پتاسیم توسط سویه باکتریایی NBT (به عنوان باکتری حل کننده سیلیکات) را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که سویه مورد بررسی طی ۷ روز سبب رهاسازی ۳۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر پتاسیم در محیط کشت شده است که این مقدار ۳۱ تا ۱۲۰٪ بیشتر از سایر گونه‌های مورد بررسی بوده است. علاوه بر آن این محققان عنوان کردند که میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های معدنی به طور قابل توجهی به pH، شرایط محیطی، خصوصیات خاک و ویژگی‌های کانی معدنی بستگی دارد. این بررسی نشان داد که سویه مورد نظر در pH ۶/۵ تا ۸، شرایط هوازی و در حضور کانی ایلایت بهترین نتیجه را نشان می‌دهد. این مطالعه در محیط خاک نیز تکرار شد و مشخص

* ایمیل نویسنده مسئول: a_ghafour@yahoo.com

شد که تلقیح سویه یاد شده به خاک سبب افزایش جمعیت آن از ۳×۱۰۶-۲/۶ به ۷/۴×۱۰۷-۶/۸ سی اف یو (تعداد کلنی باکتری) بر گرم خاک و رهاسازی ۳۳/۶-۳۱/۲ میلی‌گرم پتاسیم بر کیلوگرم خاک در خاک‌های زرد-قهوه‌ای و ۲۱/۷ میلی‌گرم پتاسیم بر کیلوگرم خاک در خاک‌های شالیزاری شده است. بازاک و بیسواس (۲۰۱۰) اثر کاربرد همزمان باکتری حل کننده پتاسیم (Bacillus muciilaginosus) و تثبیت‌کنندگان نیتروژن (Azotobacter chrococcum) را بر روی انحلال کانی میکا و تاثیر آن روی رشد و عملکرد گیاه سودان گراس مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی مشخص کرد که کاربرد هم‌زمان کانی میکا به همراه سویه‌های یاد شده سبب افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه و در نتیجه بهبود عملکرد آن شده است. Zhang and kong در سال ۲۰۱۴ باکتری‌های حل کننده پتاسیم را از ریزوسفر گیاه توتون جداسازی نموده و ضمن شناسایی آن، اثر آن‌ها را بر عملکرد گیاه بررسی کردند. در این بررسی ۲۷ سویه از ریزوسفر توتون جدا شد که از میان آن‌ها ۱۷ سویه به جنس Klebsiella variicola، ۲ سویه به جنس Enterobacter cloacae، ۲ سویه به جنس Enterobacter asburiae، و ۶ سویه باقی‌مانده به جنس‌های Enterobacter aerogenes، Pantoea agglomerans، Agrobacterium tumefaciens، Microbacterium foliorum، Myroides odoratimimus و Burkholderia cepacia تعلق داشتند. تمامی سویه‌های یاد شده دارای توانایی انحلال پتاسیم از محیط کشت‌های جامد و مایع بودند. مطالعات گلخانه‌ای در نهایت نشان دادند که سویه‌های GL7، JM3، XF4 و XF11 سبب افزایش عملکرد محصول و همچنین جذب عناصر نیتروژن و پتاسیم توسط گیاه شدند. مطالعه و تحقیق بر روی تاثیر باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم بر عملکرد کمی و کیفی گیاهان زراعی مختلف همچنان ادامه دارد. با توجه به اهمیت عنصر پتاسیم بر کیفیت برگ‌های گیاه توتون، به نظر می‌رسد فقدان بررسی‌های مشابه در کشور کاملا محسوس می‌باشد. در بررسی حاضر سعی خواهد شد باکتری‌های بومی آزاد کننده پتاسیم از ریزوسفر گیاه توتون جدا شده و اثر تلقیح آن به همراه کانی میکا (به عنوان منبع نامحلول پتاسیم) بر عملکرد کیفی و کمی گیاه توتون بررسی شود.

مواد و روش‌ها

۱) نمونه‌برداری از خاک: تعداد ۲۶ نمونه خاک از ریزوسفر گیاه توتون کشت شده در مزارع توتون استان‌های مازندران، گلستان و گیلان از عمق ۱۰ سانتیمتری نمونه‌برداری و پس از انتقال به آزمایشگاه و هواخشک شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری برخی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی آن‌ها اندازه‌گیری شد.

۲) تهیه کانی: کانی‌های بیوتیت، موسکوویت، کائولینیت، ورمی‌کولیت، فلوگوپیت، فلدسپار پتاسیم یزد و فلدسپار پتاسیم زنجان تهیه شده و پس از پودر شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری به مدت ۳ روز در آب استریل نگه‌داری شدند تا پتاسیم نامحلول آن حذف شود (Zhang and kong ۲۰۱۴).

۳) تهیه محیط کشت: از محیط کشت‌های الکساندروف و نوترینت آگار استفاده شد.

۴) جداسازی باکتری‌های حل کننده پتاسیم از ریزوسفر توتون با تهیه رقت 10^{-6} از نمونه‌های خاک.

۵) ارزیابی توانایی انحلال پتاسیم توسط باکتری‌های حل کننده: کانی‌های مربوطه به محیط کشت الکساندروف مایع اضافه و سپس از باکتری‌های جداشده به ارلن تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با دور ۱۶۰ بر روی شیکر گرماگذاری شدند. پس از طی زمان یاد شده، و انجام دو مرحله سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت، محلول رویی از بقایای ته‌نشین شده جدا شده و مقدار پتاسیم محلول در محلول رویی با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر مدل EEL اندازه‌گیری شد.

۶) بررسی گلدانی: جهت ارزیابی توانایی انحلال پتاسیم توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در گیاه توتون، طرحی گلدانی در قالب کاملا تصادفی در ۱۳ تیمار و ۳ تکرار اجرا شد. پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ارقام با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد.تیمارهای آزمایشی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱- تیمارهای آزمایش گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی

شماره تیمار	تیمارهای کودی	
	باکتری	کانی
۱	پیچک محله	کائولینیت
۲	پیچک محله	ورمی‌کولیت
۳	پیچک محله	بدون کانی
۴	پیله کوه	کائولینیت
۵	پیله کوه	ورمی‌کولیت
۶	پیله کوه	بدون کانی
۷	ایستگاه توتون رشت	کائولینیت
۸	ایستگاه توتون رشت	ورمی‌کولیت

۹	ایستگاه توتون رشت	بدون کانی
۱۰	بدون باکتری	کائولینیت
۱۱	بدون باکتری	ورمی‌کولیت
۱۲	بدون باکتری	بدون کانی
۱۳	شاهد (کوددهی بر اساس آنالیز خاک)	

نشاکاری در تاریخ ۹۶/۶/۲۲ در گلدان انجام و برگ‌های توتون در ۳ چین برداشت شدند. برگ‌های توتون در آون خشک شد و میزان پتاسیم نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک مناطق توتون‌کاری شمال ایران نشان داد که نمونه‌های تهیه شده از تنوع خوبی از نظر فاکتورهای pH، بافت خاک، کربن آلی و .. برخوردار بودند (جدول ۲).

جدول ۲- برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌ها

	پ.هاش	EC (dS/m)	بافت خاک	ازت کل (درصد)	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	کربن آلی (درصد)
پیچک محله	۷/۸۳	۰/۷۲	Sandy clay loam	۰,۱۶	۴,۵	۲۳۲,۱	۱,۲
تقرتپه	۷/۶۲	۰/۷۸	Sandy clay	۰,۱۳	۲۴,۳	۳۰۸,۵	۰,۸
چلمردی	۷/۸۱	۰/۶۴	Clay loam	۰,۳۰	۹,۹	۲۹۷,۶	۲,۹
خیرآباد	۷/۴۵	۰/۷۲	Clay loam	۰,۱۵	۱۱,۵	۴۶۱,۲	۱,۱
پیله کوه	۷/۸۱	۰/۷۴	Clay loam	۰,۱۳	۹,۳	۲۳۲,۱	۰,۸
ایستگاه توتون رشت	۵/۱۰	۰/۷۸	Sandy loam	۰,۱۲	۷۶,۱	۳۴۱,۲	۱,۰
قنبرمحله	۵/۸۱	۰/۶۸	Sandy loam	۰,۱۹	۴۸,۴	۳۱۹,۴	۱,۷

باکتری‌های جدا شده از خاک‌های مورد بررسی در محیط کشت الکساندروف در جدول شماره ۳ آورده شده است. به عنوان مثال در نمونه خاک پیچک محله دو نوع جدایه به شماره‌های ۲۴ و ۲۵ در ۳ نوع کانی فلوگوپیت، فلدسپار یزد و موسکوویت جدا شدند که جدایه موجود در کانی‌های فلدسپار یزد و موسکوویت مشابه هم می‌باشند. از بین نمونه‌های خاک مورد بررسی، نمونه خاک پیچک محله دارای باکتری‌هایی بودند که توانایی رشد در ۳ نوع کانی فلوگوپیت، فلدسپار یزد و موسکوویت را دارند. همچنین نمونه خاک تقرتپه تعداد بیشترین باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم را دارا می‌باشد. که این مقدار در خاک تقرتپه ۴ جدایه و در خاک‌های پیچک محله و قنبرمحله ۲ جدایه می‌باشد. همچنین در جدول شماره ۳ میزان پتاسیم استخراجی از کانی‌های مورد مطالعه توسط باکتری‌ها نیز آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده بیش‌ترین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌ها توسط جدایه پیچک محله از کانی فلوگوپیت به مقدار ۳۳۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم کانی می‌باشد.

شماره	کانی	شماره جدایه	میزان پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم کانی)	نمونه خاک
۱	فلوگوپیت	۲۵	۳۳۳۰	پیچک محله
۲	فلدسپار یزد	۲۴	۱۱۰۷	
۳	موسکوویت	۲۴	۰	
۴	فلدسپار یزد	۱-۴	۰	تقرتپه
۵	فلدسپار یزد	۲-۴	۰	
۶	فلدسپار یزد	۱۸	۱۱۰۷	
۷	فلدسپار زنجان	۱۸	۶۰۰	
۸	ورمی‌کولیت	۱۹	۳۰۱۲	پیله کوه
۹	فلدسپار یزد	۱۴	۱۳۶۰	خیرآباد
۱۰	موسکوویت	۲	۱۲۳۴	چلمردی
۱۱	فلدسپار یزد	۱۵	۱۱۰۷	ایستگاه توتون رشت
۱۲	فلدسپار زنجان	۲-۱۱	۴۷۲	قنبر محله
۱۳	فلدسپار زنجان	۱-۱۱	۰	

بیشترین تنوع در جداسازی پتاسیم آزاد شده نیز از کانی فلدسپار (یزد و زنجان) می باشد که جدایه های تقرتپه، پیچک محله، خیرآباد، قنبر محله و ایستگاه تحقیقات توتون رشت توانستند پتاسیم را آزاد کنند.

تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف روی صفات زراعی توتون‌های گرمخانه‌ای در شرایط گلدان در جدول ۴ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داده است که فاکتور وزن سبز برگ و پتاسیم برگ در سطح احتمال یک درصد و فاکتور وزن خشک برگ در سطح احتمال پنج درصد تحت تاثیر تیمارها قرار گرفتند ولی تیمارهای مورد بررسی تاثیری روی وزن سبز ساقه نداشتند.

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف روی صفات زراعی توتون‌های گرمخانه‌ای در شرایط گلدان

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن سبز برگ	وزن خشک برگ	وزن سبز ساقه	پتاسیم برگ
تکرار	۲	۴۷/۰۸ ^{ns}	۱۲/۹۶ ^{ns}	۱۴۰/۳۹ ^{ns}	۰/۳۵۱ ^{ns}
تیمار	۱۲	۱۴۸۳/۲۷ **	۲۰/۵۵ *	۹۹/۷۴ ^{ns}	۰/۹۲۷ **
خطا	۲۴	۳۵۵/۸۴	۱۰/۲۴	۱۲۰/۸۲	۰/۲۰۵
ضریب تغییرات (درصد)		۱۲/۴۱	۲۱/۶۹	۲۲/۴۲	۱۴/۱۱

**، * و ^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و بدون معنی‌داری.

جدول ۵ مقایسه میانگین صفات وزن سبز، وزن خشک و پتاسیم برگ در شرایط گلدانی را نشان می‌دهد طبق نتایج جدول ۵ بیشترین وزن سبز برگ، وزن خشک برگ و پتاسیم برگ در تیمار شاهد (کوددهی شیمیایی بر اساس آزمون خاک) بدست آمد که این حالت طبیعی می‌باشد زیرا مواد غذایی مورد نیاز از طریق کودهای شیمیایی در اختیار گیاه قرار می‌گیرد.

کمترین مقدار وزن سبز برگ و وزن خشک برگ در تیمار پیچک محله در حضور کانی ورمی‌کولیت بدست آمد که این نشان دهنده آن است که باکتری‌های موجود در خاک پیچک محله توانایی آزاد کردن پتاسیم از ورمی‌کولیت را ندارند. کمترین پتاسیم برگ در تیمار پیله کوه در حضور کانی کائولینیت بدست آمد. تیمارهای دیگر از نظر آماری در یک گروه قرار داشتند.

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات وزن سبز، وزن خشک درصد پتاسیم برگ در شرایط گلدانی

شماره تیمار	تیمارهای کودی		وزن سبز برگ (گرم در گلدان)	وزن خشک برگ (گرم در گلدان)	پتاسیم برگ (درصد)
	باکتری	کانی			
۱	پیچک محله	کائولینیت	۱۴۰/۱۷ ^{bc}	۱۲/۶۵ ^{bc}	۳/۱۷ ^{bc}
۲	پیچک محله	ورمی‌کولیت	۱۲۲/۳۹ ^{c}	۹/۲۳ ^{c}	۳/۶۳ ^{b}
۳	پیچک محله	بدون کانی	۱۴۶/۹۶ ^{bc}	۱۳/۲۵ ^{abc}	۳/۲۷ ^{bc}
۴	پیله کوه	کائولینیت	۱۵۳/۳۶ ^{bc}	۱۸/۲۴ ^{ab}	۲/۷۳ ^{c}
۵	پیله کوه	ورمی‌کولیت	۱۳۸/۱۱ ^{bc}	۱۳/۷۱ ^{abc}	۳/۰۳ ^{bc}
۶	پیله کوه	بدون کانی	۱۳۹/۳۴ ^{bc}	۱۵/۵۰ ^{ab}	۲/۹۷ ^{bc}
۷	ایستگاه توتون رشت	کائولینیت	۱۵۳/۵۲ ^{bc}	۱۵/۶۵ ^{ab}	۳/۰۷ ^{bc}
۸	ایستگاه توتون رشت	ورمی‌کولیت	۱۵۱/۰۷ ^{bc}	۱۶/۴۸ ^{ab}	۲/۹۳ ^{bc}
۹	ایستگاه توتون رشت	بدون کانی	۱۶۰/۶۲ ^{b}	۱۲/۹۷ ^{bc}	۳/۱۰ ^{bc}
۱۰	بدون باکتری	کائولینیت	۱۵۱/۹۳ ^{bc}	۱۳/۷۶ ^{abc}	۲/۷۳ ^{c}
۱۱	بدون باکتری	ورمی‌کولیت	۱۴۸/۸۷ ^{bc}	۱۶/۴۴ ^{ab}	۲/۸۸ ^{bc}
۱۲	بدون باکتری	بدون کانی	۱۵۰/۳۵ ^{bc}	۱۴/۶۵ ^{abc}	۲/۸۰ ^{bc}
۱۳	شاهد (کوددهی بر اساس آنالیز خاک)		۲۱۸/۶۸ ^{a}	۱۹/۲۸ ^{a}	۴/۸۷ ^{a}

نتیجه‌گیری

باکتری‌های جداسازی شده توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های موجود در خاک مناطق توتون‌کاری شمال ایران را دارند ولی مقدار پتاسیم آزاد شده آنقدر نیست که بتواند تمام نیاز گیاه توتون به پتاسیم را تامین نماید لذا جهت تکمیل نیاز پتاسیمی گیاه توتون نیاز به کوددهی شیمیایی پتاسیم می‌باشد.

منابع

درج در. ج.، یزدان ستاد. س.، ارزانش. م. ح. و آجودانب فر. ه. ۱۳۹۳. غربالگری سویه های بومی باکتری های حل کننده پتاسیم و بررسی توانایی جدایه ها در آزادسازی پتاسیم قابل جذب. مجله دنیای میکروب ها. ۷(۳)، ۲۶۴-۲۵۲.

رحیم‌زاده. ن.، علمایی. م.، خرمالی. ف.، دردی پور. ا. و امینی. آ. ۱۳۹۲. اثر باکتری های حل کننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی میکایی گلوکونیت در ریزوسفر گیاه کلزا (*Brassica napus*). نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار. ۳(۲)، ۱۸۵-۱۶۹.

فرخ، ع. ر.، عزیزاف، ا.، اصفهانی. م.، رنجبر چوبه. م.، رضایی. م.، رضوی پورکومله. ت.، امیری. ا. و کاوسی. م. ۱۳۸۹. تاثیر کودهای ماکرو بر عملکرد توتون گرمخانه ای. پژوهش نامه کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۳، ۸۸-۷۵.

قلی زاده. ع.، دردی پور. ا. و مهدوی. ع. ۱۳۹۲. تعیین حد بحرانی پتاسیم در خاک های مزارع توتون کاری استان های مازندران و گلستان. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار. ۱(۳)، ۲۲۹-۲۱۵.

Basak, B. B. and Biswas, D. R. 2009. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two alfisols. Plant and Soil. 317, 235–255.

Lin, Q., Rao, Z., Sun, Y., Yao, J. and Xing, L. 2002. Identification and practical application of silicate dissolving bacteria. Agric. Sci. China1, 81–85.

Sheng, X. and Huang, W. 2001. The conditions of releasing potassium by a silicate dissolving bacterial strain NBT. Agric. Sci. China, 1 (6), 662–666.

Zhang, C. and Kong, F. 2014. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. App. Soil. Eco. 82, 18-25.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation of potassium-solubilizing bacteria from flue-cured tobacco rhizosphere soil of North of Iran

Gholizadeh, A. Gh.[1], Soleymani, S.[1], Alinezhad, R.[1], Hosseini, A.[1] and Seyyed Khademi, Z.[1]
[1]Agronomy and plant breeding department of Tirtash Tobacco Research and Education Center

Abstract

One of the methods for the release of potassium from minerals such as mica is the use of soluble bacteria in silicate minerals. For this purpose, 26 soil samples were prepared from tobacco rhizosphere in Mazandaran, Golestan and Guilan provinces, and physico-chemical properties of samples were determined, Then, each soil sample was cultured in an insoluble potassium source medium with the desired minerals to isolate the strains of potassium-releasing bacteria and to select superior bacteria by using cultured strains isolated from the solid medium with silicate minerals Based on the experiments conducted on the tobacco rhizosphere in 3 provinces, 9 isolates of potassium release were isolated. The highest amount of potassium released from minerals by pichak-mahalleh strain from flogopite mineral was 3330 mg. Kg^{-1} mineral. The most variations in isolating of released potassium was from feldspar mineral (Yazd and Zanjan). The ability of isolated strains to dissolve potassium and its effect on potassium uptake by tobacco was studied in pot**.** The results showed that the isolated bacteria can release at least 56% and up to 74.5% of potassium **.**Therefore, in order to complete the potassium requirement of the tobacco plant, potash chemical fertilization is required**.**

Key words: Potassium; Tobacco; Potassium solubilizing bacteria; Isolation.

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

پیامد کاربرد زغال گرمایی و گرمابی فرآوری شده از مانده‌های گیاهی سیب‌زمینی و خاک اره بر همه و بخش‌های واکنش‌دهنده کربن آلی خاک در تنش خشکی

مهران بیگی خاروانی[۱*]، علی‌اکبر صفری سنجانی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

چکیده

برای بررسی پیامد کاربرد زغال گرمایی و زغال گرمابی فراوری شده از خاک اره و مانده‌های گیاهی سیب‌زمینی بر ریخت‌های کربن آلی خاک در کشت لوبیا در تنش خشکی، آزمایشی گلدانی در سال ۱۳۹۶ در گلخانه پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شد. این پژوهش به گونه دو آزمایش جداگانه با طرح اسپلیت پلات در ۳ تکرار انجام شد. در این طرح تنش خشکی کرت اصلی (بدون تنش یا گنجایش کشاورزی، با تنش یا ۴۰ درسد گنجایش کشاورزی) بود که در آزمایش یکم ۴ کرت فرعی با کاربرد بهسازهای سیب‌زمینی به گونه بیوچار (زغال گرمایی)، هیدروچار (زغال گرمابی)، ماده خام و گواه (بدون آن) آزمون شد و در آزمایش دوم ۴ کرت فرعی کاربرد بهسازهای خاک اره (زغال گرمایی، زغال گرمابی، ماده خام و یک گواه آزمایش) بود. این پژوهش نشان داد که تنش خشکی مایه کاهش همه کربن آلی خاک و ریخت‌های کربن محلول در آب سرد (CWEC) و کربن محلول در آب گرم (HWEC) خاک شد. به هر گونه اندازه کربن واکنش دهنده در خاک های با تنش خشکی بیش از آن در خاک های بدون تنش بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که از میان ریخت‌های گوناگون بهسازها (سیب‌زمینی و خاک اره) بهترین انباشت کربن و کربن اندوزی در خاک در کاربرد زغال گرمایی مانده های گیاهی سیب‌زمینی در خاک بدون تنش و سپس در کاربرد زغال گرمابی خاک اره در خاک دارای تنش بدست آمد. این تیمارها می تواند از رها شدن دی اکسید کربن از خاک بکاهد و مایه کاهش رهاسازی گازهای گلخانه ای شود.

کلمات کلیدی: بیوچار، تنش خشکی، کربن اندوزی، هیدروچار.

مقدمه

آب پایه زندگی جانداران است که مانند انرژی بدون آن هیچ جانداری نمی‌تواند، زنده بماند. درمیان شناسه های زیستی که بر رشد گیاهان پیامد دارد، کمبود آب بیشترین آسیب را به گیاهان به ویژه در سرزمین‌های خشک و نیمه خشک جهان می‌زند(Lehmann و همکاران، ۲۰۰۹). زغال گرمایی (بیوچار) و زغال گرمابی (هیدروچار) هردو موادی آلی کربونیزه و پایداری هستند که می‌توانند برای زمانی دراز پیامد سودمند خود را بر ویژگی-های گوناگون خاک داشته باشند (Safari Sinegani ، ۱۳۹۴). زغال گرمایی کارایی ویژه ای در بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک دارد. افزودن زغال گرمایی به خاک بویژه مایه افزایش اندوخته کربنی خاک، بهنجاری کارکرد بومسازه‌های خاکی، افزایش pH و CEC، گنجایش بافری خاک (Lehmann و همکاران، ۲۰۰۳)، افزایش زیست توده میکروبی، فراهمی عناصر خوراکی و بهبود حاصلخیزی خاک(Steinbeiss و همکاران، ۲۰۰۹) می‌شود. افزودن زغال گرمابی به خاک نیز مایه کاهش رواناب و فرسایش خاک، مایه جلوگیری از هدررفت عناصر خوراکی گیاهان از خاک مانند نیتروژن و فسفر شده، و با افزایش گنجایش نگهداری خاک مایه کاهش آبشویی نیترات از خاک کاهش و با افزایش گنجایش نگهداری آب در خاک، مایه کاهش نیاز آبی شده و در پی آن بخت آبشویی و فرسایش خاک و هدر رفت عناصر خوراکی گیاهی کاهش می‌یابد (Vico و همکاران، ۲۰۱۸). این کارکردهای زغال گرمایی مایه کاهش آلودگی آب و هوا می شود.

در پژوهش‌های گوناگونی به بررسی نشانه‌های کاربرد زغال گرمایی و زغال گرمابی بر بخش‌های گوناگون کربن آلی خاک پرداخته شده است. ماده آلی خاک (SOM) گروه نایکنواختی از مواد گوناگون مانند مانده های گیاهی، جانوری و ریزجانداری تازه، با تجزیه میانه و هوموسی شده به همراه مواد ساخته شده ریزجانداران در خاک است (صفری سنجانی، ۱۳۹۴). مواد آلی خاک یک دامنه گسترده از مواد با تجزیه‌پذیری بالا تا مواد آلی بسیار پایدار است (Gregorich وهمکاران، ۱۹۹۴). (Baronti و همکاران، ۲۰۱۴) در پژوهش خود گزارش کردند که در خاک‌های تیمار شده با زغال گرمایی اندازه های کربن آلی به گونه چشم گیری افزایش یافته است. کربن کارا یک شناسه از واکنش دهندگی و فراهمی مواد آلی خاک برای ریزجانداران و

* ایمیل نویسنده مسئول: mehranbeygi026@gmail.com

واکنش‌های آنزیمی است (Weil و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهشی که (Graham و همکاران، ۲۰۰۲) انجام دادند، دیدند که کاربرد کودهای آلی مایه افزایش کربن واکنش دهنده خاک می‌شود که این می‌تواند وابسته به کربن آلی بالا و فراهم در آن کودها باشد. کربن محلول نیز کربنی است که با یون-های کانی ترکیب شده است (Ali Asghar Zadeh، ۱۹۹۸) و (Gregorich و همکاران، ۲۰۰۳) گزارش کردند که کاربرد کودهای آلی در خاک مایه افزایش کربن آلی محلول در خاک می‌شود. با نگاه به پژوهش های یاد شده، پیامد کاربرد ریخت‌های گوناگونی از کودهای آلی (زغال گرمایی و گرمابی خاک اره و مانده‌های گیاهی سیب‌زمینی) بر اندازه و بخش‌های گوناگون کربن آلی خاک مانند کربن واکنش دهنده، کربن محلول در آب سرد و کربن محلول در آب گرم، در کشت لوبیا در دو تیمار با تنش و بدون تنش خشکی بررسی و آزمون شد تا بهترین شیوه بهسازی خاک و کربن اندوزی در آن آشکار شود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از لایه ۰تا۳۰ سانتی‌متری یک خاک در زمین‌های پشت دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا با جایگاه جغرافیایی (″۵۹ ۴۷ ۳۴ عرض شمالی و ۵۳ ۲۸ ۴۸ طول شرقی) نمونه‌برداری شد. برای آماده کردن بیوچار از مانده‌های گیاه سیب‌زمینی و خاک‌اره بهره‌گیری شد که پس از هواخشک کردن آن‌ها از الک ۲میلی‌متری گذر داده شدند و برای دگرگونی شدن به زغال گرمایی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد و بدون اکسیژن در کوره ای ویژه گذاشته شدند. برای آماده کردن هیدروچار نیز مانده‌های آلی به گونه هوا خشک شده در اتوکلاو در دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ اتمسفر گذاشته شدند.

این پژوهش به گونه دو آزمایش جداگانه با هر یک از مانده های سیب زمینی و خاک اره، برای کاهش پیچیدگی و شناختی روشن تر، انجام شد. هر آزمایش جداگانه به گونه اسپلیت پلات یا کرت‌های خردشده انجام شد که در آن کرت اصلی تنش خشکی با دو تیمار بدون تنش (FC) و با تنش خشکی (۰/۴ FC) و کرت فرعی کاربرد بهساز در چهار تیمار بدون بهساز (گواه) و ۲ درسد از هریک به گونه خام، زغال گرمایی (بیوچار) و زغال گرمآبی (هیدروچار) بود که در کشت لوبیا سبز در سه تکرار و در ۲۴ گلدان انجام شد. هرگلدان نیز دارای سه بوته لوبیا بود.

برای کشت گیاه لوبیا سبز، از گلدان‌هایی با بلندی ۲۵ و پهنای دهانه ۲۰ سانتی‌متر به کار گرفته شد، که درون هرکدام از گلدان‌ها جدا از شن و سنگریزه ریخته شده در ته آن، ۳ کیلوگرم خاک تیمار شده ریخته شد. سپس برای اینکه بذر ها جوانه‌زنی خوبی داشته باشند، آنها برای ۴۸ ساعت در پارچه نمناک نگهداری شدند، سپس دانه‌ها (۱۰ دانه) به آرامی در درون هر گلدان از پیش آماده شده، کاشته شد. بوته ها پس از جوانه زنی و رشد آغازین تنک شدند و در هر گلدان ۳ بوته نگه‌داری شد و تا زمان رشد شایسته به گونه ای روزانه آبیاری شدند که در نم گنجایش کشاورزی (بدون تنش) و در نم ۰/۴ گنجایش کشاورزی (با تنش خشکی) بمانند. پس از رسیدن گیاه به گام زایشی و گلدهی، خاک درون گلدان‌ها پس از ۶۰ روز برداشت و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه برده شد.

اندازه گیری ماده آلی خاک‌ها به روش اکسایش تر(Rowell، ۲۰۰۰) انجام شد. برای اندازه‌گیری کربن واکنش دهنده از محلول ۰/۰۲ مولار پرمنگنات پتاسیم بهره‌گیری شد (Weil و همکاران، ۲۰۰۳). برای جداسازی ماده آلی محلول در آب سرد، ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر به ۱۵ گرم خاک افزوده شد (نسبت ۱:۱۰ خاک به آب). سپس نمونه‌ها برای نیم ساعت تکان داده و برای ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد، محلول رویی برای اندازه گیری ماده آلی محلول در آب سرد جداسازی شد، سپس به روی نمونه خاک مانده ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و برای ۱۶ ساعت در بن‌ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و عصاره گیری شد و کربن آلی عصاره ها را به روش والکی بلک اندازه‌گیری شد (Gregorich و همکاران، ۲۰۰۳).



شکل ۱. نمایی از گلدان‌های کشت شده برای این پژوهش

نتایج و بحث

برخی از ویژگی‌های خاک آزمایش شده در جدول (۱) آورده شده است. خاک بررسی شده دارای آهک و ماده آلی کم (کمتر از ۱ درصد) و پی اچ نزدیک خنثی می‌باشد، از آنجایی که کمبود ماده آلی و سستی ساختمانی خاک بر توان نگهداری آب در خاک پیامد بدی دارد، بهره‌گیری از بهسازهای آلی برای بهبود ویژگی‌های این خاک امید بخش بوده است.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بررسی شده

بافت خاک	شن (٪)	سیلت (٪)	رس (٪)	شوری	پ.هاش	کربنات کلسیم معادل (٪)	ماده آلی (٪)
لوم شنی رسی	۴۲/۱	۴۵/۳	۱۲/۶	۰/۱۴	۷/۷۴	۱/۴۷	۰/۷۷

بر پایه تجزیه واریانس داده‌ها، پیامد کاربرد تنش خشکی، هر یک از بهسازهای سیب‌زمینی و خاک اره و برهم‌کنش آنها بر همه کربن آلی آلی خاک، کربن واکنش دهنده و همچنین کربن محلول در آب گرم خاک در پایه آماری ۰/۰۱ نشانه‌های چشم‌گیری داشت. ولی پیامد بسیاری از این تیمارها بر کربن محلول در آب سرد از دیدگاه آماری چشم‌گیر نبود. تنها کاربرد بهساز سیب‌زمینی در پایه آماری ۰/۰۵ و برهم‌کنش خاک اره با تنش خشکی در پایه آماری ۰/۰۱ پیامد چشم‌گیری بر این ویژگی داشتند. بنابراین پاسخدهی کربن آلی محلول در آب سرد خاک به تیمارهای انجام شده به اندازه دیگر ویژگی های بررسی شده نمایان نیست.

آزمون میانگین اندازه همه کربن آلی خاک نشان داد که کاربرد تنش خشکی مایه کاهش همه کربن آلی خاک در خاک بدون بهساز (تیمار گواه آزمایش) از ۱/۵۴ (درسد) به ۰/۹۴ (درسد) شد. ولی کاربرد هر یک از بهسازها مایه افزایش اندازه همه کربن آلی خاک در هر دو خاک دارای تنش و بدون تنش شد (جدول ۲ و ۳). در میان ریخت‌های گوناگون بهساز سیب‌زمینی، بیشترین اندازه همه کربن آلی در خاک بدون تنش خشکی تیمارشده با زغال گرمایی (۱/۷۲ درسد) و پس از آن در خاک با تنش باز در تیمار زغال گرمایی (۱/۵۸ درسد) بدست آمد که به گونه چشم‌گیری بیش از تیمارهای دیگر بودند. پس از آنها همه کربن آلی در خاک بدون تنش به ترتیب در تیمارهای زغال گرمآبی (۱/۳۳ درسد) و ماده خام (۱/۰۸ درسد) و در خاک دارای تنش نیز در تیمارهای زغال گرمآبی (۱/۴۰ درسد) و ماده خام (۱/۳۳ درسد) بیشترین اندازه بود (جدول ۲).

در باره همه کربن آلی خاک در کاربرد بهسازهای خاک اره نیز یافته‌ها به این گونه بود که در تیمار بدون تنش و دارای تنش به ترتیب زغال گرمآبی، ماده خام و زغال گرمایی بیشترین اندازه را نشان دادند (جدول ۳). در بسیاری از پژوهش‌ها به پیامد سودمند زغال گرمایی در افزایش اندوخته کربن آلی خاک یاد شده است. (Nigussie و همکاران، ۲۰۱۲) گزارش کردند که کاربرد زغال گرمایی مایه افزایش کربن آلی می‌شود که با این یافته‌ها همخوانی دارند. به هر گونه این پیامد در افزودن بهسازهای خاک اره دیده نشد. هر چند اندوخته کربن آلی در تیمار زغال گرمایی خاک اره بیش از گواه آن بود ولی کمتر از آن در تیمار زغال گرمآبی و بهساز خام آن بود. این شاید به پایداری کربن آلی این مانده آلی وابسته باشد که ریخت خام و بویژه ریخت زغال گرمآبی آن به اندازه‌ی بسنده‌ای پایدار است که تا پایان آزمایش پیامد سودمندشان دیده شود. از سوی دیگر کربن آلی زغال گرمایی هنگام فرآوری آن به گونه ای در می آید که شاید در روش اکسیداسیون اندازه‌گیری نشود. در کاربرد بهسازهای سیب زمینی این نیز می تواند رخ دهد، ولی از یک سو فروزینگی ریخت خام و سپس زغال گرمآبی این مانده گیاهی، و از سوی دیگر پیامد سودمند زغال گرمایی مانده‌ها بر رشد گیاه و ساخت ماده آلی می

تواند گویای ناهمانندی یافته های این دو آزمایش (سیب زمینی و خاک اره) باشد. (Carter و همکاران، ۲۰۱۳) دریافتند که کاربرد بیوچار با افزایش فراهمی عناصر، کربن اندوزی، افزایش گنجایش نگه‌داری آب مایه افزایش زیست‌توده گیاهی، زیست‌توده ریشه، بلندی گیاه و شمار برگ‌ها می‌شود.

جدول ۲- آزمون میانگین‌های کربن آلی (درسد)، کربن واکنش دهنده (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و کربن محلول در آب گرم (درسد) در برهم‌کنش تنش خشکی و بهسازهای سیب‌زمینی

بهساز		کربن آلی (٪)	کربن واکنش دهنده	کربن محلول در آب گرم
بی تنش	گواه	۱/۰±۵۴/۱۰۷^{b}	۵۶±۱۹۳۸/۵^{e}	۰/۰±۶۳۶/۰۱۱^{a}
	ماده خام	۱/۰±۰۸/۰۲۹^{d}	۸±۳۰۱۱/۹۸^{a}	۰/۰±۳۰۴/۰۲۲^{b}
	هیدروچار	۱/۰±۳۳/۱۰۷^{c}	۱۳±۳۰۳۴/۵^{a}	۰/۰±۲۷۲/۰۵۶^{b}
	بیوچار	۱/۰±۷۲/۰۴۰^{a}	۱۰±۲۸۱۰/۰۹^{c}	۰/۰±۱۰۹/۰۲۹^{c}
با تنش	گواه	۰/۰±۹۴/۰۲۹^{e}	۴±۲۲۹۳/۹۸^{d}	۰/۰±۰۵۱/۰۱۱^{d}
	ماده خام	۱/۰±۳۳/۰۵۹^{c}	۲۱±۳۰۲۸/۱^{a}	۰/۰±۰۵۱/۰۱۱^{d}
	هیدروچار	۱/۰±۴۰/۰۳۳^{c}	۳۶±۲۸۹۸/۶^{b}	۰/۰±۰۶۴/۰۰۰^{d}
	بیوچار	۱/۰±۵۸/۰۱۱^{b}	۲۸±۲۸۲۱/۰۰^{c}	۰/۰±۰۵۱/۰۱۱^{d}

در هر ستون میانگین دارای واژهای یکسان از دیدگاه آماری در پایه ۵ درسد ناهمانندی چشم گیری ندارند

جدول ۳- آزمون میانگین‌های کربن آلی (درسد)، کربن واکنش دهنده (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و کربن محلول در آب گرم (درسد) در برهم‌کنش تنش خشکی و بهسازهای خاک اره

بهساز		کربن آلی (٪)	کربن واکنش دهنده	کربن محلول در آب گرم
بی تنش	گواه	۱/۰±۵۴/۱۰^{c}	۵۶±۱۹۳۸/۵^{e}	۰/۰±۶۳۶/۰۱۱^{a}
	ماده خام	۲/۰±۱۲/۰۷^{a}	۲۱±۲۹۶۹/۵^{a}	۰/۰±۲۰۷/۰۱۱^{b}
	هیدروچار	۲/۰±۱۱/۰۷^{a}	۲۶±۲۹۵۳/۴^{a}	۰/۰±۰۸۳/۰۳۹^{c}
	بیوچار	۱/۰±۶۵/۸^{bc}	۵۰±۲۴۵۸/۸^{c}	۰/۰±۰۷۰/۰۱۱^{cd}
با تنش	گواه	۰/۰±۹۴/۰۳^{e}	۴±۲۲۹۳/۹۸^{d}	۰/۰±۰۵۱/۰۱۱^{d}
	ماده خام	۱/۰±۷۴/۰۵^{b}	۳۶±۲۹۴۹/۳^{a}	۰/۰±۰۷۰/۰۱۱^{cd}
	هیدروچار	۲/۰±۱۳/۰۴^{a}	۳۶±۲۷۱۸/۲^{b}	۰/۰±۰۵۷/۰۱۱^{cd}
	بیوچار	۱/۰±۳۵/۰۲^{d}	۶۹±۲۳۸۷/۲^{c}	۰/۰±۰۴۴/۰۰۰^{d}

در هر ستون میانگین دارای واژهای یکسان از دیدگاه آماری در پایه ۵ درسد ناهمانندی چشم گیری ندارند

آزمون میانگین داده‌های بدست‌آمده از اندازه‌گیری کربن واکنش دهنده نشان داد که تنش خشکی مایه افزایش اندازه کربن واکنش دهنده از ۱۹۳۸ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در خاک بدون بهساز و بدون تنش به ۲۲۹۳ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در خاک بدون بهساز با تنش شد. از آنجایی همه کربن آلی خاک‌ها در تنش خشکی کمتر از بدون تنش بود، تنش خشکی مایه افزایش کربن کارا در برابر همه کربن آلی خاک شده است. کاربرد بهسازهای آلی نیز مایه افزایش اندازه کربن واکنش دهنده خاک در برابر گواه آزمایش (بدون بهساز) شد. در آزمایش افزودن بهسازهای سیب زمینی، در تیمار بدون تنش، بیشترین پیامد را بهساز زغال گرمآبی آن با اندازه ۳۰۳۴ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و پس از آن در تیمار ماده خام (۳۰۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سپس زغال گرمایی (۲۸۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) داشت. کربن فراهم و کارا در خاک دارای تنش نیز بیشترین اندازه را در تیمار ماده خام (۳۰۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و پس از آن در تیمار زغال گرمآبی و سپس زغال گرمایی داشت. در باره بهسازهای خاک‌اره نیز یافته‌ها به این گونه بود که در تیمار بدون تنش کاربرد ماده خام بیشترین اندازه کربن واکنش دهنده را داشت و پس از آن این ریخت از کربن خاک به‌ترتیب در تیمارهای زغال گرمآبی و سپس زغال گرمایی بالا بود. در خاک دارای تنش نیز به همین گونه بود که به ترتیب ماده خام، زغال گرمآبی و زغال گرمایی بیشترین پیامد را بر اندازه کربن

واکنش دهنده خاک نشان دادند (جدول‌های ۲ و ۳). کربن آلی اندازه گیری شده با پرمنگنات پتاسیم نشان از کربن ناپایدار و فراهم برای ریزجانداران خاک دارد که در تیمارهای بهساز خام و بهسازی که به گونه زغال گرمآبی فراوری شده بیشتر از تیمارهای دیگر است. (Pulido و همکاران، ۲۰۱۳) گزارش کردند که در زمین‌هایی که اندوخته کربن آلی خاک بیشتر باشد، کربن واکنش دهنده خاک نیز بیشتر است، زیرا در چنین زیستگاهی ریزجانداران کارایی بیشتری دارند که با یافته های این پژوهش هم‌خوانی داشت.

آزمون میانگین داده‌های بدست‌آمده در جدول‌های (۲ و۳) نشان داد که کربن محلول در آب گرم با تنش خشکی کاهش یافته و کمتر از آن در گواه آزمایش است و از ۰/۶۳۶ (درسد) در تیمار بدون بهساز و بدون تنش به ۰/۵۱ (درسد) در تیمار بدون بهساز و دارای تنش بود. کاربرد بهسازها مایه افزایش اندازه کربن محلول در آب گرم در برابر گواه آزمایش ۰/۶۳۶ (درسد) نشدند. در باره بهسازهای سیب‌زمینی در تیمار بدون تنش بیشترین اندازه این ریخت از کربن آلی را ماده خام با اندازه ۰/۳۰۴ (درسد) و پس از آن به ترتیب زغال گرمآبی ۰/۲۷۲ (درسد) و زغال گرمایی ۰/۱۰۹ (درسد) داشتند. در خاک دارای تنش نیز بیشترین اندازه کربن محلول در آب گرم را زغال گرمآبی (۰/۰۶۴ درسد) و پس از آن زغال گرمایی و ماده خام داشتند. در باره بهسازهای خاک اره نیز بیشترین اندازه در تیمار بدون تنش را ماده خام (۰/۲۰۷ درسد) و پس از آن زغال گرمآبی و سپس زغال گرمایی داشت و در خاک دارای تنش نیز بیشترین اندازه را ماده خام (۰/۰۷۰ درسد)، سپس زغال گرمآبی (۰/۰۵۷) و زغال گرمایی (۰/۰۴۴ درسد) داشتند. روی‌هم رفته کاربرد تنش خشکی مایه کاهش کربن محلول در آب گرم در هریک از تیمارهای ماده بهساز هر دو ماده آلی شده است. از آنجایی که گیاه و ریزجانداران در خاک بدون تنش کارکرد بهتری دارند، این یافته می تواند وابسته به فراوانی ریزجانداران بویژه باکتری ها و ریشه گیاهان در ساخت ترکیب‌های موسیلاژی و پلی ساکاریدهای محلول در آب گرم وابسته باشد. (صفری سنجانی و افضل‌پور، ۱۳۹۳) در خاک‌های تیمار شده با مانده‌های خام دیدند که میان توده زیستی ریزجانداران (کربن زیتوده) و کربن محلول در آب گرم خاک همبستگی چشم‌گیری است. از سوی دیگر کاربرد بهسازها به گونه خام در هر یک از تیمارهای تنشی بهتر از ریخت های زغال شده آنها در افزایش کربن محلول در آب گرم در خاک کارایی دارد ولی اندازه آن هیچگاه به اندازه کربن آلی محلول در خاک بدون تنش و بدون بهساز نمی رسد (جدول‌های ۲ و ۳) که این شاید به کارکرد بهتر و فراوانی ریزجانداران بویژه باکتری‌ها در این خاک وابسته باشد. (Yoshida و همکاران، ۲۰۱۸) گزارش کردند که کاربرد ماده آلی مایه افزایش اندازه کربن محلول در آب می‌شود که با یافته های این پژوهش در خاک بدون تنش خشکی که در آن گیاه لوبیا کشت شده است هم‌خوانی ندارد.

کربن آلی محلول در آب سرد به تنش خشکی از دیدگاه آماری پاسخ چشم‌گیری نداد. آزمون میانگین کربن محلول در آب سرد (جدول ۴) نشان داد که اندازه آن در تیمار بهسازها ناهمانندی چشم‌گیری با آن در گواه آزمایش (۰/۰۶۷ درسد) ندارد. ولی میان اندازه کربن محلول در آب سرد در تیمارهای بهساز ناهمانندی چشم‌گیری دیده می‌شود. بیشترین اندازه کربن آلی محلول در آب سرد در تیمار زغال گرمآبی سیب‌زمینی (۰/۰۷۰ درسد) بدست آمد ولی آن در تیمارهای زغال گرمایی و خام مانده سیب زمینی (۰/۰۴۸ و ۰/۰۵۴ درسد) کمتر از گواه آزمایش بود. در باره بهسازهای خاک اره بیشترین اندازه کربن محلول در آب سرد در تیمارهای زغال گرمآبی و گواه (۰/۰۷۷ و ۰/۰۶۷ درسد) بدست آمد و کمترین آن به گونه ای همانند با مانده سیب زمینی در تیمار زغال گرمایی (۰/۰۵۴ درسد) بدست آمد.

جدول ۴- آزمون میانگین‌های کربن محلول در آب سرد خاک (درسد) در بهساز سیب‌زمینی و خاک‌اره

کربن محلول در آب سرد			
بهساز		سیب‌زمینی	خاک‌اره
تیمار	گواه	۰/۰±۰۶۷/۰۱۴^{ab}	۰/۰±۰۶۷/۰۱۴^{ab}
	ماده خام	۰/۰±۰۵۴/۰۱^{bc}	۰/۰±۰۷۷/۰۱۰^{a}
	هیدروچار	۰/۰±۰۷۰/۰۱^{a}	۰/۰±۰۶۴/۰۱۲^{bc}
	بیوچار	۰/۰±۰۴۸/۰۰۷^{c}	۰/۰±۰۵۴/۰۱۰^{c}

در هر ستون میانگین دارای واژهای یکسان از دیدگاه آماری در پایه ۵ درسد ناهمانندی چشم گیری ندارند

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد کاربرد تنش خشکی مایه کاهش همه کربن آلی و کربن محلول در آب گرم خاک می‌شود ولی اندازه کربن واکنش دهنده خاک در تنش افزایش پیدا می‌کند. از سوی دیگر کاربرد بهسازها می تواند جلوی پیامدهای زیان‌بار تنش را گرفته و برخی از ویژگی‌های اندازه-

گیری شده را به گواه آزمایش در تنش نزدیک کند. روهمرفته بیشترین کربن اندوزی در آزمایش مانده های سیب زمینی در تیمار بدون تنش و زغال گرمایی بدست آمد و در آزمایش خاک اره در تیمار دارای تنش و زغال گرمآبی بدست آمد که این نشان می دهد در کاربرد مانده‌های آسان فروزینه شونده (مانده‌های سیب زمینی) ساخت و رهاسازی کربن از گیاه به خاک و در کاربرد مانده‌های سخت فروزینه شونده (خاک اره) هم ساخت و رهاسازی و هم پایداری کربن افزوده شده بر کربن اندوزی خاک نشانه گذار هستند.. در باره کربن واکنش دهنده خاک دیده شد که کاربرد مانده های خام و زغال گرمآبی نشان بهتری در افزایش آن دارند. کربن محلول در آب گرم وابسته به کارکرد ریزجانداران و بویژه باکتری ها است زیرا در خاک دارای تنش به گونه چشم گیری کمتر است. در کشت لوبیا سبز در خاک بدون تنش و بدون بهساز بیشترین اندازه را داشت که نشان می دهد این ریخت کربن بیشتر وابسته به کارکردهای زیستی در ساخت آن در خاک است. کربن محلول در آب سرد پاسخ چشم‌گیری به تنش نداشت و در تیمار زغال گرمآبی سیب زمینی و خاک اره خام بیشتر بود.

منابع

صفری سنجانی، ع.ا.، ۱۳۹۴. مواد آلی خاک. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا ۳۶۴ صفحه.

صفری سنجانی ع.ا. و افضل پور م. ۱۳۹۳. پیامد کاربرد کودهای آلی گیاهی بر بخش‌های شیمیایی و زیستی کربن آلی خاک. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار. ۴(۳): ۳۳-۶۰.

Aliasgharzadeh, N. 1998. Soil Microbiology and Biochemistry. 1st Edition. Tabriz University Press, 405p. (In Persian)

Baronti, S., Vaccari, F. P., Miglietta, F., Calzolari, C., Lugato, E., Orlandini, S., Genesio, L. (2014). Impact of biochar pplication on plant water relations in Vitis vinifera (L.). European Journal of Agronomy, 53, 38-44.

Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T. B., Haefele, S. (2013). The impact of biochar application on soil properties and plant growth of pot grown lettuce (Lactuca sativa) and cabbage (Brassica chinensis). Agronomy, 3 (2), 404-418.

Graham, M. H., Haynes, R. J., Meyer, J. H. (2002). Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. Soil biology and biochemistry, 34 (1), 93-102.

Gregorich E.G., Carter M.R., Angers D.A., Monreal C.M., and Ellert B.H. 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. Canadian Journal Soil Science, 74: 367–385.

Gregorich, E. G., Beare, M. H., Stoklas, U., St-Georges, P. (2003). Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. Geoderma, 113 (3-4), 237-252.

Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota–a review. Soil biology and biochemistry, 43 (9), 1812-1836.

Lehmann, J., da Silva, J. P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W., Glaser, B. (2003). Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. Plant and soil, 249 (2), 343-357.

Nigussie, A., Kissi, E., Misganaw, M., Ambaw, G. (2012). Effect of biochar application on soil properties and nutrient uptake of lettuces (Lactuca sativa) grown in chromium polluted soils. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 12 (3), 369-376

Pulido-Fernández, M., Schnabel, S., Lavado-Contador, J. F., Mellado, I. M., Pérez, R. O. (2013). Soil organic matter of Iberian open woodland rangelands as influenced by vegetation cover and land management. Catena, 109, 13-24.

Rowell, M. J. (2000). Measurement of soil organic matter: A compromise between efficacy and environmental friendliness. Agricola, 11, 66-69.

Steinbeiss, S., Gleixner, G., Antonietti, M. (2009). Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry, 41 (6), 1301-1310.

Vico, A., Pérez-Murcia, M. D., Bustamante, M. A., Agulló, E., Marhuenda-Egea, F. C., Sáez, J. A., Moral, R. (2018). Valorization of date palm (Phoenix dactylifera L.) pruning biomass by co-composting with urban and agri-food sludge. Journal of environmental management, 226, 408-415.

Weil, R. R., Islam, K. R., Stine, M. A., Gruver, J. B., Samson-Liebig, S. E. (2003). Estimating active carbon for soil quality assessment: a simplified method for laboratory and field use. American Journal of Alternative Agriculture, 18 (1), 3-17.

Yoshida, H., Sazawa, K., Wada, N., Hata, N., Marumo, K., Fukushima, M., Kuramitz, H. (2018). Changes in the chemical composition of soil organic matter including water-soluble component during incubation: A case study of coniferous and broadleaf forest soils. Catena, 171, 22-28.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of Biochar and Hydrochar of saw dust and potato plant residues on total and active pools of soil organic carbon in drought stress.

Beygi Kharvani*[1], M., Safari Sinegani[2], A.A.

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

[2] Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

Abstract

In order to investigate the effect of application of biochar and hydrochar from sawdust and potato plant residues on soil organic carbon in bean culture in drought stress, a pot culture study was conducted in a greenhouse in the Bu-Ali Sina University of Hamedan in 2017. The study has been done in two separate experiments with split plot design in 3 replications. In this design, drought stress was the main plot (without stress or field capacity, with tension or 0.4FC). The first experiment was the application of potato amendments that included: biochar, hydrochar, raw material and control (without it), which they were subplots of this expriment. The second experiment, was the application of sawdust amendments that included: biochar, hydrochar, raw material and control as subplots in this experiment. The results showed that the drought stress reduced soil organic carbon and cold water extractable organic carbon (CWEOC) and hot water extractable organic carbon (HWEOC). The active carbon content determined with $KMnO_4$ oxidation was higher in soils with drought stress than that in non-stress soils. The best of carbon accumulation and carbon sequestration in soils was observed in the application of biochar of the potato plant residue in soil without stress and then in the application of hydrochar of sawdust in the stressed soil in first and second experiments respectively. These treatments were able to reduce the release of carbon dioxide from the soil which reduces the release of greenhouse gases.

Keywords: Biochar, Carbon sequestration, Drought stress, Hydrochar.

* Corresponding author, Email: mehranbeygi026@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر آزادسازی پتاسیم از بیوتیت

اعظم محمدزاده[۱*]، امیر لکزیان[۲]، علیرضا کریمی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

پتاسیم از عناصر اصلی مورد نیاز گیاهان است که در فرآیندهای مهمی چون ساخت پروتئین و فتوسنتز نقش دارد. حدود ۹۸ درصد پتاسیم موجود در خاک به شکل کانی‌های معدنی است که برای گیاهان قابل استفاده نمی‌باشد. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم به عنوان کودهای زیستی سبب تجزیه سیلیکات‌های معدنی حاوی پتاسیم می‌شود. در این تحقیق تعدادی از باکتری‌های ریزوسفری پنج گیاه مختلف جداسازی شدند و سپس توانایی حل‌کنندگی پتاسیم آن‌ها بر روی محیط کشت الکساندروف مایع تعیین شد. با توجه به نتایج این مرحله، ۵ جدایه انتخاب شدند و آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار (شاهد، KSB20، KSB26، KSB32، KSB33 و KSB41) و سه تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم روی حلالیت پتاسیم و pH در محیط مایع معنی‌دار بود ($P<0.05$). بیشترین میزان آزادسازی پتاسیم (۱۰/۵۹ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین pH (۳/۸۸) مربوط به جدایه KSB41 بوده و کمترین مقدار پتاسیم (۱/۲۴ میلی‌گرم در لیتر) و بیشترین pH (۷/۲۱) نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد که کاربرد باکتری‌های آزادکننده پتاسیم می‌تواند نقش کلیدی در افزایش پتاسیم قابل دسترس خاک داشته باشد.

کلمات کلیدی: کودهای زیستی، کانی سیلیکاته، باکتری‌های ریزوسفری

مقدمه

پتاسیم از عناصر غذایی ضروری پرمصرف و فراوان‌ترین کاتیون جذب شده در بیشتر گیاهان است. بیشتر خاک‌ها دارای مقادیر نسبتاً زیادی پتاسیم کل هستند؛ ولی مقدار پتاسیم قابل دسترس آن‌ها نسبتاً کم است (رحیمزاده و همکاران، ۱۳۹۲). اشکال مختلف پتاسیم در خاک شامل محلول، تبادلی، غیرتبادلی و ساختمانی بوده اما بیش از ۹۰ درصد پتاسیم خاک به شکل ساختمانی است که برای گیاهان قابل استفاده نمی‌باشد. مهم‌ترین منابع پتاسیم در خاک‌های معدنی آلومینوسیلیکات‌های اولیه شامل فلدسپارها و میکاها می‌باشند (دردی‌پور و همکاران، ۱۳۸۹). ازجمله راه‌کارهای استفاده از این منابع پتاسیم، کاربرد ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم است. تحقیقات بسیاری در مورد نقش این ریزجاندران در آزادسازی منابع غیرتبادلی پتاسیم خاک انجام گرفته است و مشخص شده که پتاسیم غیرتبادلی می‌تواند به‌عنوان ذخایر پراهمیت، به افزایش فراهمی پتاسیم برای گیاه کمک کند (Badr، ۲۰۰۶). از جمله ریزجاندارانی که قادر به تجزیه سیلیکات‌ها هستند می‌توان به باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گلسنگ‌ها اشاره کرد که علاوه بر پتاسیم در آزادسازی آهن، روی و سیلیسیم از این کانی‌ها نیز نقش دارند. از بین ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم، باکتری‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Bahadur و Meena، ۲۰۱۴). تاکنون تحقیقات زیادی در مورد تأثیر باکتری‌ها بر حلالیت پتاسیم از کانی‌های مختلف انجام شده است. Sugumaran و Janarthanam (۲۰۰۷) در آزمایشی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم را از خاک جداسازی کردند و تأثیر آن‌ها را در آزادسازی پتاسیم از ارتوکلاز، میکروکلین و مسکویت مطالعه کردند و دریافتند که بیشترین میزان پتاسیم حل‌شده توسط باکتری باسیلوس از کانی مسکویت صورت گرفت. Setiawati و Mutmainnah (۲۰۱۶) نیز تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم جداشده از خاک را بر روی کانی‌های فلدسپار، لوسیت و تراکیت بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که بیشترین مقدار پتاسیم حل‌شده در این کانی‌ها به ترتیب ۱۵/۵۷، ۱۲/۲۵ و ۶/۳۴ میلی‌گرم در لیتر بود. Bagyalakshmi و همکاران (۲۰۱۷) باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم را از ریزوسفرهای مختلف جدا کردند و دریافتند که بیشترین مقدار پتاسیم حل‌شده ۴۱/۹۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان آن ۲۰/۳۱ بود. و میزان pH در این دو تیمار به ترتیب ۴/۵ و ۴/۹ بود.

* ایمیل نویسنده مسئول: Mohammadzadeh.ah@yahoo.com

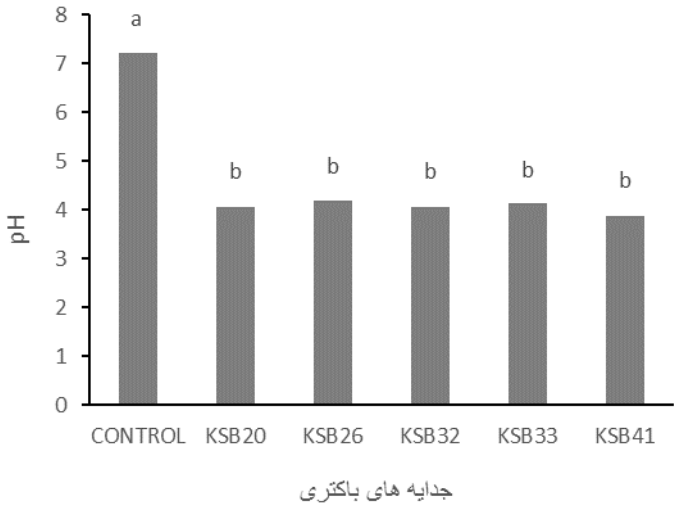
رسولی صدقیانی و همکاران (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از کانی‌های میکایی (بیوتیت و مسکویت) را بررسی و گزارش کردند که بیشترین مقدار پتاسیم آزاد شده برابر با ۳/۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کانی بیوتیت و پس از ۱۰ روز گرماگذاری بود. فرشادی راد و همکاران (۱۳۸۸) با مقایسه تأثیر قارچ و باکتری بر آزادسازی پتاسیم دریافتند که باکتری ازوتوباکتر توانست بیشترین مقدار پتاسیم (۶ درصد) را از خاک آزاد کند. با توجه به مطالعات انجام شده مشخص شد که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم یک روش امیدبخش برای افزایش پتاسیم قابل استفاده در خاک خواهد بود. لذا تحقیق حاضر با هدف تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر آزادسازی این عنصر از کانی بیوتیت انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم، تعداد ۵ نمونه خاک ریزوسفری (زیر کشت گیاهان رایج منطقه گوجه فرنگی، ذرت، یونجه، ریحان و گندم) به صورت تصادفی از مناطق مختلف شهرستان نیشابور انتخاب شده و از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری نمونه برداری شد و سپس سری-های رقت از نمونه‌های خاک تهیه شد. از هر نمونه خاک تعداد ۱۰ جدایه بر مبنای مورفولوژی پرگنه حاصله (برآمده بودن، بیضی شکل و موکوئیدی پرگنه) که بر روی محیط کشت جامد الکساندروف (بیوتیت ۱گرم، Na2HPO4 ۲ گرم، MgSO4,7H2O ۰/۵ گرم، CaCO3 ۰/۱ گرم، FeCl3 ۰/۰۰۵ گرم، ساکاروز ۵ گرم و آگار ۲۰ گرم در لیتر (Saber و همکاران، ۱۹۸۱)) بوجود آمده بودند انتخاب شدند (بیوتیت مورد استفاده از معادن همدان تهیه شده و اندازه ذرات آن ۵۳ میکرون بود). از بین ۵۰ جدایه انتخابی، ۵ جدایه برتر که دارای توانایی حل‌کنندگی پتاسیم از محیط کشت الکساندروف مایع (شامل بیوتیت ۲ گرم، CaCO3 ۰/۲ گرم، NaCl ۰/۲ گرم، FeCl3 ۰/۰۹ گرم، (NH4)2SO4 ۱ گرم، Na2HPO4 ۱ گرم، $MgSO_4$ ۰/۵ گرم، ساکاروز ۵ گرم در یک لیتر (Savostin و همکاران، ۱۹۷۱)) بودند انتخاب شدند. سپس آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار (شاهد، KSB20، KSB26، KSB32، KSB33 و KSB41) و سه تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. جهت بررسی کمی انحلال پتاسیم توسط جدایه‌های منتخب و تأثیر بر pH، محیط کشت مایع (۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با ۰/۱ گرم پودر بیوتیت خالص) استریل شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر یک از جدایه‌های منتخب به آن اضافه شد (تیمار شاهد فقط حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ۰/۱ گرم پودر بیوتیت بود). نمونه‌ها به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و گردش ۷۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. در نهایت pH نمونه‌ها توسط دستگاه pH متر مدل METROHM 632 قرائت شد و پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری (دور ۳۰۰۰ برای مدت ۲ دقیقه)، میزان پتاسیم آزادشده در محلول شفاف رویی توسط دستگاه فلیم فوتومتر مدل Jenway- PFP7 قرائت گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP 8 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

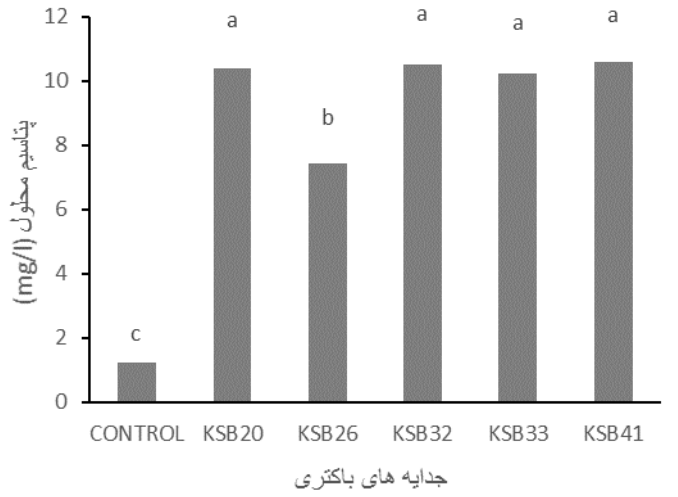
نتایج و بحث

با توجه به نتایج مقایسه میانگین (شکل۱)، بالاترین مقدار pH (۷/۲۱)، پس از ۷ روز، در تیمار شاهد مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) داشت. تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد ۰/۴۶، ۰/۴۳، ۰/۴۳، ۰/۴۲ و ۰/۴۱ برابر کاهش pH را نشان دادند که به ترتیب مربوط به جدایه‌های KSB41، KSB32، KSB20، KSB33 و KSB26 بود. بیشترین میزان کاهش pH در جدایه KSB41 مشاهده شد که نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد. اما این جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری را در مقدار pH با هم نشان ندادند. همچنین در مقدار در مقدار همچنین بیشترین آزادسازی پتاسیم نیز در این جدایه مشاهده شد. به طور کلی می‌توان گفت یکی از مکانیسم‌ها برای تجزیه بیوتیت و انحلال پتاسیم توسط این جدایه‌ها، اسیدی کردن محیط و تولید H^+ است. در میان عوامل مختلف مؤثر در رهاسازی پتاسیم، به نظر می‌رسد که تولید پلی‌ساکاریدها و یا ترکیبات آلی کمپلکس‌کننده (سیدروفور ها) توسط جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده در این آزمایش منجر به تجزیه کانی بیوتیت شده است (Keshavarz Zarjani و همکاران، ۲۰۱۳).



شکل ۱: مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتریایی بر pH در محیط مایع الکساندروف

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل۲)، نشان داد که کمترین مقدار آزادسازی پتاسیم (۱/۲۴ میلی‌گرم در لیتر) در تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) داشت. جدایه KSB41 به طور مؤثری باعث آزادسازی پتاسیم شد که مقدار آن پس از ۷ روز برابر با ۱۰/۵۹ میلی‌گرم در لیتر بود که نسبت به شاهد ۷/۵ برابرافزایش داشت. جدایه‌های KSB32، KSB20، KSB33 و KSB26 به ترتیب ۱۰/۵، ۱۰/۴، ۱۰/۲۱ و ۷/۴۴ میلی-گرم در لیتر پتاسیم آزاد کردند. در بین جدایه‌ها تنها KSB26 با سایر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. همانطور که قبلاً اشاره شد پایین‌ترین مقدار pH (۳/۸۸) مربوط به KSB41 بود. نتایج این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط Dong (۲۰۱۰) مطابقت داشت. این محقق عامل افزایش مقدار پتاسیم آزاد شده را به تولید اسیدهای آلی، عوامل کلات کننده (Chelating agents)، تولید پلی‌ساکاریدها و غیره مرتبط دانست.



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتریایی بر آزادسازی پتاسیم در محیط مایع الکساندروف

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش مشخص شد که باکتری‌های مورد استفاده تأثیر زیادی بر کاهش مقدار pH و افزایش آزادسازی پتاسیم از کانی سیلیکاته داشتند. مقایسه تیمارها با شاهد نشان داد که تلقیح باکتری آزادسازی پتاسیم را افزایش داد. در این بین به نظر می‌رسد که جدایه KSB41 دارای پتانسیل حل‌کنندگی کانی‌های سیلیکاته و مؤثر در آزادسازی پتاسیم از بیوتیت باشد و می‌تواند به عنوان مایه تلقیح در کودهای زیستی پتاسیمی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

دردی‌پور، ا.، فرشادی‌راد، ا. و ارزانش، م.ح. ۱۳۸۹. تأثیر *Azospirillum lipoferum* و *Azotobacter chrococoum* بر آزادسازی پتاسیم خاک در کشت گلدانی سویا (*Glycine max var. Williams*). نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، ۲ (۴)، ۵۹۹-۵۹۳.

رحیم‌زاده، ن.، علمائی، م.، خرمالی، ف.، دردی‌پور، ا. و امینی، آ. ۱۳۹۲. اثر باکتری‌های آزاد کننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی میکایی گلوکونیت در ریزوسفر گیاه کلزا (*Brassica napus*). نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۳ (۲)، ۱۸۵-۱۶۹.

رسولی صدقیانی، م.ح.، صادقی آزاد، س.، برین، م.، سپهر، ا. و دولتی، ب. ۱۳۹۵. تأثیر باکتری‌های حل کننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکایی و جذب آن توسط گیاه ذرت. نشریه علوم آب و خاک، ۲۰ (۷۸)، ۱۰۲-۸۹.

فرشادی‌راد، ا.، دردی‌پور، ا. و ارزانش، م.ح. ۱۳۸۸. اثر جمعیت‌های مختلف باکتریایی و قارچی بر روی آزادسازی پتاسیم خاک. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، ۱ (۲)، ۷۰-۶۵.

Badr, M.A. 2006. Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. Journal of Applied Sciences Research, 2, 1191-1198.

Bagyalakshmi, B., Ponmurugan, P. and Balamurugan, A. 2017. Potassium solubilization, plant growth promoting substances by potassium solubilizing bacteria (KSB) from southern Indian Tea plantation soil. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 12, 116-124.

Bahadur, I., Meena, V.S. and Kumar, S. 2014. Importance and application of potassic biofertilizer in Indian Agriculture. International Research Journal of Biological Sciences, 12(3), 80-85.

Dong, H. 2010. Mineral-microbe interactions: a review. Frontiers of Earth Science in China, 4(2), 127-147.

Keshavarz Zarjani, J., Aliasgharzad, N., Oustan, S., Emadi, M. and Ahmadi, A. 2013. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. Archives of Agronomy and Soil Science, 59(12), 1713-1723.

Saber, M.S.M., and Zanati, M.R. 1981. Effectiveness of inoculation with silicate bacteria in relation to the potassium content of plants using the intensive cropping technique. Agricultural Research Review, 59(4), 279-292.

Savostin, P. 1971. Microbial Transformation of Silicates. Pflanzenernahr-bodenk., 132, 37-45.

Setiawati, T.C. and Mutmainnah, L. 2016. Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 9, 108-117.

Sugumaran, P. and Janarthanam, B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Science, 3, 350-355.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of potassium solubilizing bacteria on potassium release from biotite

Mohammadzadeh*[1], A., Lakzian[2], A, Karimi, A.R.[3]

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Mashhad, Iran
[2] Professor, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Mashhad, Iran
[3] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Mashhad, Iran

Abstract

Potassium is one of the essential elements of plants that is involved in important processes such as protein production and photosynthesis. About 98% of potassium in soil is form of various minerals that cannot be available for plants. Using of potassium-soluble bacteria as bio-fertilizers can decompose potassium-containing mineral silicates. In this research, a number of rhizospheric bacteria were isolated from five different plants and then their potassium solubility ability was determined on Aleksandrov liquid medium. According to the results of this step, 5 isolates were selected and a completely randomized design with six treatments (control, KSB20, KSB26, KSB32, KSB33 and KSB41) and three replications in vitro were performed. The results showed that the effect of potassium solubilizing bacteria on potassium and pH was significant ($p<0.05$) in liquid medium. The highest amount of released potassium (10.59 mg / l) and the lowest pH (3.88) were related to KSB41 isolate and the lowest released potassium (24.1 mg / l) and the highest pH (7.12) were observed in control. It seems that the use of potassium-releasing bacteria can play a key role in increasing of soil available potassium.

Keywords: Biological fertilizers, Silicate minerals, rhizospheric bacteria

* Corresponding author, Email: Mohammadzadeh.ah@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تولید بیوفیلم سودوموناس جدا شده از خاک آلوده به هیدروکربن بر روی حامل‌های آلی و معدنی

مریم ترکاشوند*[۱]، امیر لکزیان[۲]، امیر فتوت[۲]، مهدی محمدی[۳]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲]استاد علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳]دانشیار گروه بیوتکنولوژی دریا، دانشگاه خلیج فارس

چکیده

فرم بیوفیلمی باکتری‌ها کارآمدی قابل توجهی در تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای دارند. سودوموناس ها از جمله باکتری‌های غالب خاک هستند که همچنین در تولید بیوفیلم و تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای شناخته شده‌اند. این در حالی است که در زمینه تولید بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس بومی خاک‌های ایران که در تجزیه هیدروکربن‌ها توانمند باشند، اطلاعات کمی در دسترس است. هدف این پژوهش، بررسی توان تولید بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس از خاک‌های آلوده به نفت و گازوئیل بود. ۶۳ جدایه سودوموناس از خاک‌های آلوده جدا و خالص‌سازی شدند و سپس جدایه‌ها از نظر تولید بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس آزمایشات انتخابی، ۴ جدایه برتر انتخاب و کارایی تجزیه نفت توسط آن‌ها در دو محیط کشت پایه نمکی (با و بدون نفت) با آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل بررسی گردید. توانمندترین جدایه، برای شناسایی دقیق، با روش تعیین ردیف بازهای آلی ژن 16SrRNA آنالیز و این جدایه سودوموناس آئروژینوزا JCM 5962 تشخیص داده شد. در آخر توان تولید بیوفیلم جدایه برتر روی حامل‌های پومیس و باگاس نیشکر بررسی شد. نتایج نشان داد تمامی جدایه‌های سودوموناس مورد بررسی توانمند به تولید بیوفیلم در تست میکروتیتر پلیت بودند. جدایه برتر در تست تجزیه نفت، همچنین توانمندی در تولید بیوفیلم فعال بر سطح حامل‌های پومیس و باگاس نیشکر را نیز نشان داد. به نظر می‌رسد که فرم بیوفیلمی سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند برای افزایش کارایی روش‌های زیست‌پالایی خاک مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، پومیس، نفت خام

مقدمه

بیوفیلم‌ها (زیست‌لایه‌های میکروبی) به عنوان جوامع میکروبی ساختارمندی تعریف می‌شوند که به سطوح طبیعی متصل شده و در ماتریکسی از مواد پلیمری برون سلولی جای می‌گیرند. سلول‌های باکتریایی، جلبکی، قارچی یا پروتوزوئرها قادر به تولید بیوفیلم هستند و در این حالت به سطوح مختلف در محیط‌های خاکی و آبی، بافت‌های زنده، ابزارهای پزشکی و سیستم‌های لوله‌کشی آب متصل می‌شوند (Lynch و همکاران ۲۰۰۸). پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که بیوفیلم‌ها در مقایسه با اشکال پلانکتونی یا شناور فرم غالب و رایج‌تری از حیات ریزجانداران به حساب می‌آید (Al-Azizi و همکاران ۲۰۰۴). بیوفیلم دارای مزایای چندگانه‌ای است که از آن جمله می‌توان به افزایش تحمل باکتریایی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی و امکان تولید بیشتر آنزیم‌ها و سازمان‌دهی سلول‌ها به زیرمجموعه‌های کارکردی اشاره کرد. گزارش‌های پرشماری در رابطه با بیوفیلم‌های میکروبی در دسترس است اما اطلاعات اندکی در مورد تشکیل آن توسط ریزجانداران مهم خاک از دید کشاورزی و برهم‌کنش‌های آن‌ها در اکوسیستم منتشر شده است. درک و شناخت جوامع باکتریایی به ویژه از نظر زیست-محیطی و کشاورزی و اثرات متقابل آن‌ها می‌تواند مزایای بسیاری در زمینه تغییر اقلیم، کیفیت خاک، تغذیه گیاه، حفاظت گیاه، کشاورزی و پاک‌سازی خاک از آلاینده‌های آلی و غیر آلی داشته باشد (Velmourougane و همکاران ۲۰۱۷). نتایج پژوهش‌ها به روشنی نشان می‌دهد که بیوفیلم‌های باکتریایی نقش چشم‌گیری در تجزیه هیدروکربن‌های تک حلقه‌ای و چند حلقه‌ای دارند. از این گونه پژوهش‌ها می‌توان به پژوهش شیمادا و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد که نشان دادند بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس نقش چشم‌گیری در تجزیه نفتالین داشته‌اند (Shimada و همکاران ۲۰۱۲). از آنجا که موضوع بیوفیلم میکربی بیشتر در حوزه پزشکی و صنایع غذایی مورد بررسی قرار گرفته است و به کاربرد آن‌ها در زمینه کشاورزی و حفاظت محیط زیست کمتر پرداخته شده است و همچنین با توجه به اینکه بررسی تولید بیوفیلم روی حامل‌های دوست‌دار محیط زیست و ارزان قیمت گام نخست در این مسیر می‌باشد، در این پژوهش توانایی تولید بیوفیلم و تجزیه نفت خام در

*ایمیل نویسنده مسئول: Maryam.Tarkashvand@wsu.edu

باکتری‌های سودوموناس بومی خاک‌های آلوده به نفت بررسی شد. توانمندترین جدایه از این نظر مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفت. در ادامه از این جدایه در تهیه بیوفیلم‌های باکتریایی بر حامل‌های آلی و معدنی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و انتخاب باکتری

دو نمونه خاک کشاورزی آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی برای جداسازی باکتری‌های سودوموناس انتخاب شدند. جداسازی به روش تهیه سری‌های رقت انجام شد و جدایه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت کینگ بی و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. تک کلنی‌های خالص‌شده در زیر نور فرابنفش بررسی و کلنی‌های باکتریایی با ویژگی فلورسنتی برای ادامه آزمایش انتخاب شدند. توان تولید بیوفیلم ۶۳ جدایه باکتریایی با استفاده از روش O'Toole (۲۰۱۱) بررسی و غربال شدند. در این روش بیوفیلم‌ها با کریستال ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی و جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد.

جدایه‌های انتخاب شده از تست قبل در آزمایشی از نظر توان رشد در محیط آلوده و همچنین توانمندی در تجزیه نفت خام مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار جدایه انتخاب شده، دو نوع محیط کشت پایه نمکی (Xia و همکاران، ۲۰۱۷و Bushnell Hass و همکاران، ۱۹۴۰) و دو سطح نفت خام بودند. زادمایه جدایه-های باکتریایی با OD600 یکسان به دو نوع محیط کشت حاوی صفر و ۲ درصد نفت خام اضافه شدند. ارلن‌مایرها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند. پس از ۱۰ روز مقدار رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری و شمارش واحد تشکیل کلنی ارزیابی شدند. مقدار هیدروکربن باقیمانده با استفاده از روش رحمان و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از حلال تولوئن عصاره‌گیری و از طریق جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد. در نهایت جدایه باکتریایی برتر مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفت.

به منظور تهیه بیوفیلم باکتریایی دو حامل پومیس (معدنی) و باگاس نیشکر (آلی) ابتدا در دامنه اندازه ۸ میلی‌متر - ۱ سانتیمتر انتخاب، دو مرتبه با آب مقطر جوشیده شسته و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و نهایتا حامل‌ها اتوکلاو شده و در دمای اتاق نگه‌داری شدند. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه نمکی به ۵ گرم از حامل‌های سترون شده در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر شیشه‌ای اضافه و با زادمایه یکسان مایه‌زنی شد. ارلن‌مایرها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر دورانی گرماگذاری شدند (Nie و همکاران، ۲۰۱۶). با هدف بررسی تولید بیوفیلم‌های باکتریایی حامل‌ها پیش و پس از مایه‌زنی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی‌های میکروسکوپی قرار گرفتند. در نهایت به منظور بررسی زنده‌مانی باکتری بر روی هر یک از حامل‌ها، حامل در حجم مشخصی بافر فسفات به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و نمونه تهیه شده روی محیط کشت اختصاصی در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری و تا زمان ظهور کلنی‌ها نگهداری شد.

نتایج و بحث

باکتری‌های سودوموناس فلورسنت از دو نمونه خاک با شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک-ها در جدول ۱ آورده شده است. بافت هر دو خاک رسی بود. قابلیت هدایت الکتریکی خاک‌ها تقریبا یکسان و حدود ۳ دسی زیمنس بر متر بود و خاک‌ها پهاش خنثی داشتند. از دو خاک روی‌هم رفته تعداد ۶۳ جدایه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شد. ۵۸ و ۴۲ درصد جدایه ها به ترتیب از خاک شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند.

جدول۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد آزمایش

نمونه خاک	شن درصد	سیلت درصد	رس درصد	پهاش	نیتروژن کل درصد	کربن کل درصد	قابلیت هدایت الکتریکی $dS.m^{-1}$	فسفر قابل دسترس $mg.Kg^{-1}$
۱	۵/۳	۴۱/۹	۵۲/۸	۶/۷	/۱۷	۱/۹	۳/۳	۸۱/۱
۲	۴/۵	۳۹/۸	۵۵/۷	۶/۶	/۱۵	۱/۸۷	۳/۱	۷۹/۷

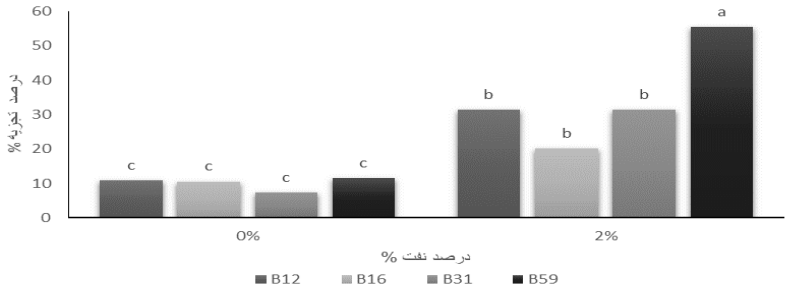
توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های باکتریایی در سه زمان ۹، ۱۵ و ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. ۴ جدایه باکتریایی با شماره‌های ۱۲،۱۶،۳۱و ۵۹ که بیشترین میزان جذب را در طول موج ۵۵۰ نانومتر نشان دادند به عنوان جدایه‌های مولد بیشترین میزان بیوفیلم برای مرحله بعدی آزمایش‌ها انتخاب شدند. چهار جدایه انتخابی باکتری‌های سودوموناس از نظر رشد در محیط حاوی صفر و ۲ درصد نفت خام بررسی شده و مقدار تجزیه نفت پس از ده روز در انتهای دوره آزمایش مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس چهار جدایه انتخابی بر تجزیه نفت در دو محیط کشت پایه نمکی و دو سطح نفت خام در جدول ۱ نشان داده شده است. اثر همه فاکتورهای آزمایشی بر تجزیه نفت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲ تجزیه واریانس تجزیه نفت و رشد باکتری‌های مختلف در طی دوره آزمایش

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value
نوع باکتری	۳	۶۰۸/۵۷۲	۰/۰۰۹۳**
درصد نفت	۱	۶۴۸۱/۵۸۴۴	<۰/۰۰۰۱**
نوع محیط کشت	۱	۵۴۸/۲۵۱۰	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × درصد نفت	۳	۷۸۰/۳۸۶۲	۰/۰۰۰۲**
نوع محیط کشت × درصد نفت	۱	۲۷۳۳/۴۳۶۲	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × نوع محیط کشت	۳	۲۵۵/۲۳۰۸	<۰/۰۰۰۱**
نوع باکتری × درصد نفت × نوع محیط کشت	۳	۳۴۳/۰۳۲۴	<۰/۰۰۰۱**
خطا	۳۲	۲۲/۰۳	-
ضریب تغییرات	۷	-	-

**: معنی‌دار در سطح یک درصد.

شکل ۱ تاثیر متقابل جدایه‌های انتخابی بر درصد تجزیه نفت خام را نشان می‌دهد. جدایه شماره ۵۹ با حذف بیش از ۵۰ درصد نفت موجود در محیط توانمندترین جدایه در تجزیه نفت خام بود. جدایه‌های ۳۱، ۱۶ و ۱۲ به ترتیب با ۳۴/۷، ۱۶/۳۷، ۱۳/۷۸ درصد تجزیه در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۱). Log CFU (رشد) در جدایه‌های ۱۲،۱۶،۳۱ و ۵۹ پس از یک دوره آزمایشی ده روزه برابر ۱۱/۱۵، ۱۱، ۱۰/۹۴، ۱۰/۹۲ بود. نتایج حاصل از توالی‌خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه باکتریایی مورد نظر با ۱۳۸۲ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه Pseudomonas aeruginosa JCM 5962(T) به شماره دسترسی BAMA01000316 قرابت فیلوژنی داشت.

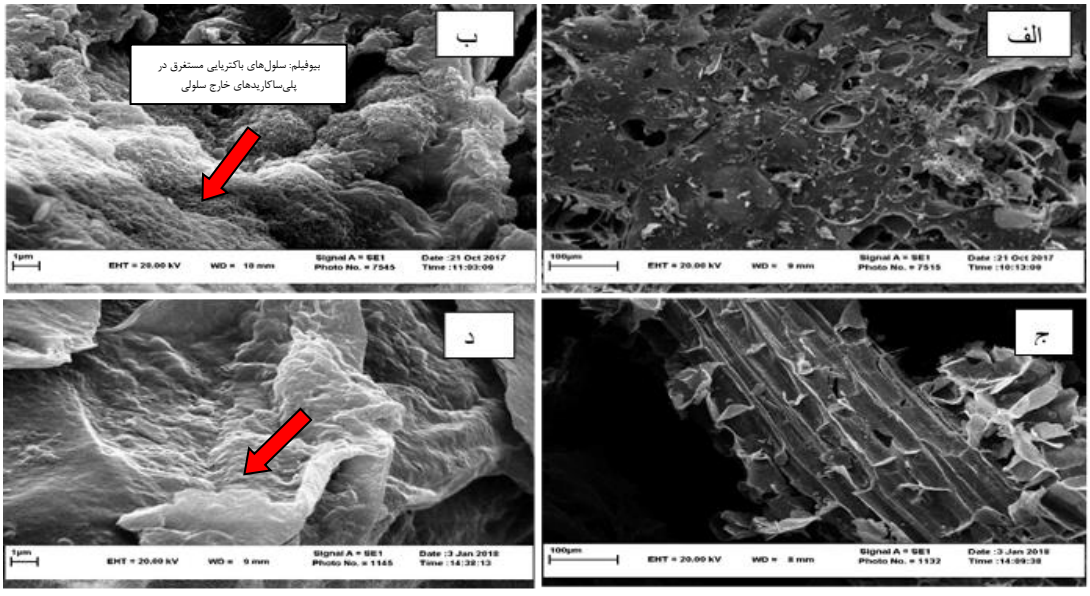


شکل ۱- مقایسه میانگین درصد تجزیه نفت ۴ جدایه انتخابی سودموناس

در ادامه تولید بیوفیلم باکتری سودموناس آئروژینوزا بر روی حامل‌های معدنی و آلی برای اولین بار در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲ تصاویر SEM حامل آلی و معدنی را پیش و پس از تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد. از آنجایی که سلول‌های باکتری تنها در فیلم نازک آب روی سطوح قادر به تحرک بوده لذا دستیابی به مناطق مختلف محیط برای باکتری‌ها سخت و گاها انجام شدنی نیست. ایجاد مکانیسمی که بتواند باکتری‌ها را به مناطق مختلف محیط برساند در حصول نتایج مورد نظر اعم از اهداف کشاورزی (حل فسفات‌های نامحلول، تثبیت

نیتروژن و ...) و همچنین اهداف زیست‌محیطی نظیر (سمیت‌زدایی ترکیبات آلاینده آلی و غیر آلی) به ویژه در محیط خاک بسیار حائز اهمیت است.

پژوهشگران مختلفی بیوفیلم سودوموناس‌ها را بر حامل پومیس بررسی کرده‌اند. از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات Pazarlioglu و همکاران (۲۰۰۵) اشاره کرد. نتایج آنها نشان داد که بیوفیلم سودوموناس پوتیدا تشکیل شده بر روی ذرات پومیس در مقایسه با فرم پلانکتونی، فنل را به مقدار معناداری بیشتر تجزیه کرد. همچنین Lorenzo و همکاران (۲۰۰۵) نیز در تحقیقی مشابه موفق به تولید بیوفیلم کنسرسیوم باکتری‌های توانا در تجزیه تولوئن روی گرانول‌های پومیس شده و از آن در تجزیه زیستی فاضلاب بهره بردند. استفاده از ریزجانداران پلانکتونی برای زیست‌پالایی غالبا به واسطه رشد سلول، تقسیم سلولی و حساسیت به فاکتورهای محیطی نظیر نوسان غلظت و کیفیت اجزاء سیستم محدود می‌گردند. اما استفاده از روش‌های غیرمتحرک سازی سلول برای اصلاح آلاینده‌ها در مقایسه با استفاده از سلول‌های پلانکتونی مزایای بسیاری در پی دارد (Mollaei و همکاران،۲۰۱۰). این تکنولوژی راهکاری موثر و اقتصادی در رفع محدودیت‌های ذکر شده است. غیر متحرک شدن علاوه بر ایجاد تراکم سلولی بالاتر، دوره فعال شدن کوتاه‌تر، پایداری و ماندگاری بیشتر را به واسطه‌ی محافظت سلول‌ها در برابر تماس مستقیم با ترکیبات سمی نسبت به سلول‌های آزاد فراهم می‌آورد (El-Naas و همکاران، ۲۰۰۹). در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری بر زیست‌پالایی آلاینده‌ها با استفاده از سلول‌های غیرمتحرک شده متمرکز شده است. ماتریس بیوفیلم نسبت به سلول‌های پلانکتونی مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌های محیطی، تنش برشی، تنش اسید، عوامل ضد میکروبی، آسیب‌های ناشی از اشعه فرابنفش، خشکی، آفت-کش‌ها، حلال‌ها، غلظت بالای مواد شیمیایی سمی و آلاینده نشان می‌دهد (Chandran و همکاران، ۲۰۱۱). در مقابل، سلول‌های پلانکتونی آزاد، آلاینده‌های زیست‌محیطی را بواسطه فعالیت متابولیک پاک‌سازی می‌کنند. اما چنین سلول‌هایی ثابت و ساکن نیستند و تحت شرایط تنش‌های مکانیکی و محیطی، پایدار و ماندگار نیستند. در مقابل، میکروب‌های تشکیل دهنده‌ی بیوفیلم، به خصوص در زیست‌پالایی تواناترند چرا که سلول‌ها در پلی ساکاریدهای برون سلولی غیر متحرک و ثابت شده‌اند. تحقیقات نشان می‌دهد که بیوفیلم‌ها برای مقاصد زیست پالایی در محیط‌های مختلف همانند آب، خاک و رسوبات مناسب هستند زیرا زیست توده میکروبی بالایی تولید کرده و توان غیرمتحرک کردن آلاینده‌ها را دارا می‌باشند (Das و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۲ تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی از حامل‌های آلی و معدنی. (الف) پومیس پیش از مایه‌زنی سودوموناس آئروژینوزا -(ب) بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر سطح حامل پومیس - (ج) باگاس نیشکر پیش از مایه‌زنی سودوموناس آئروژینوزا - (د) بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر سطح باگاس نیشکر

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سودوموناس‌های جداشده از خاک‌های آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی توانایی تولید بیوفیلم را نشان دادند. جدایه سودوموناس آئروژینوزا با توان بالای تولید بیوفیلم، رشد حداکثری در محیط حاوی ۲ درصد نفت و همچنین بیشترین میزان تجزیه نفت در طی دوره انکوباسیون به عنوان جدایه برتر شناخته شد. استقرار موفقیت‌آمیز بیوفیلم باکتریایی بر روی سطوح حامل‌های آلی (باگاس نیشکر) و معدنی (پومیس) با بررسی نتایج عکس‌برداری SEM و تست زنده‌مانی باکتری تایید شد. با توجه به مزایای بی‌شمار استفاده از میکروارگانیسم‌ها در فرم رشدی بیوفیلمی برای اهداف کشاورزی و زیست‌محیطی متعدد، استفاده از جدایه باکتریایی بومی مولد بیوفیلم و توانمند در تجزیه نفت مسیری امید بخش را در بهبود کارآمدی فعالیت‌های زیست پالایی در خاک‌های آلوده به منابع مختلف هیدروکربنی کشور فراهم خواهد ساخت.

منابع

Bushnell, L.D. and Haas, H.F.1940. “The Utilization of Certain Hydrocarbons By Microorganisms’.” J Bacteriol, no. 199, 653–73.

Chandran, P. and Das, N. 2011. Degradation of diesel oil by immobilized Candida tropicalis and biofilm formed on gravels. Biodegradation 1181-1189, 22.

Das, Nilanjana, Basak, Lakshmi V. Geetanjali, Salam, Jaseetha Abdul, Abigail, Evy Alice 2012. Application of biofilms on remediation of pollutants – an overview. Journal of Microbiology and Biotechnology Research .2; 55; 783-790.

Di Lorenzo, Alessandra, et al. 2005. “Characterization and Performance of a Toluene-Degrading Biofilm Developed on Pumice Stones.” Microbial Cell Factories, vol. 4, pp. 1–7.

El-Azizi, MA., Starks, SE., and Khardori, N. 2004. Interactions of Candida albicans with other Candida spp. and bacteria in the biofilms. J Appl Microbiol 96, 1067–1073.

El-Naas, M. H., Al-Muhtaseb, S. A., and Makhlouf, S. 2009. Biodegradation of phenol by Pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. Journal of Hazardous Materials, 164, 720- 725.

Nie, H., He, M., Lin, Y., Wang, L., Jin, P. Zhang, S.Y. 2016.“Immobilization of Biofilms of Pseudomonas Aeruginosa NY3 and Their Application in the Removal of Hydrocarbons from Highly Concentrated Oil-Containing Wastewater on the Laboratory Scale.” Journal of Environmental Management, vol. 173, pp. 34–40.

Lynch, A.S., and Robertson, G.T. 2008. Bacterial and fungal biofilm infections. Annu Rev Med 59, 415 - 428.

Mollaei, M., S. Abdollahpour, S., Atashgahi, H., Abbasi, F., Masoomi, I., Rad, A. S., Lotfi, H. S., Zahiri, H. V., and Noghabi, K. A. 2010. Enhanced phenol degradation by Pseudomonas sp. SA01: gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. Journal of hazardous materials, 175, 284-292.

O’Toole, George A. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. ” Journal of Visualized Experiments, no. 47, pp. 10–11.

Pazarlioğlu, Nurdan Kaşikara, and Azmi Telefoncu. 2005. Biodegradation of Phenol by Pseudomonas Putida Immobilized on Activated Pumice Particles. Process Biochemistry, vol. 40, no. 5, pp. 1807–14.

Rahman, K. S.M., Banat, I. M., Thahira, J., Thayumanavan, Tha. and Lakshmanaperumalsamy., P. 2002. Bioremediation of Gasoline Contaminated Soil by a Bacterial Consortium Amended with Poultry Litter, Coir Pith and Rhamnolipid Biosurfactant. Bioresource Technology, vol. 81, no. 1, pp. 25– 32.

Shimada, K., Itoh, Y., Washio, K. and Morikawa, M. 2012. Efficacy of Forming Biofilms by Naphthalene Degrading Pseudomonas Stutzeri T102 toward Bioremediation Technology and Its Molecular Mechanisms. Chemosphere, vol. 87, no. 3, Elsevier Ltd, pp. 226–33.

Velmourougane, K., Prasanna., R. Saxena., AK. Singh., SB. Chawla., G. Kaushik., R. Ramakrishnan., B. Nain., L. 2017. Modulation of growth media influences aggregation and biofilm formation between Azotobacter chroococcum and Trichoderma viride. Applied biochemistry and microbiology. Sep 1; 53(5):546-56.

Xia, Mingqian, Liu, Y., Taylor, A. A., Fu, D., Khan, A.R., Terry, N. 2017. Crude Oil Depletion by Bacterial Strains Isolated from a Petroleum Hydrocarbon Impacted Solid Waste Management Site in California. International Biodeterioration and Biodegradation, Elsevier Ltd,123 ,70–77

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizer

Investigating the biofilm establishment of Pseudomonas strain isolated from hydrocarbon contaminated soil on organic and mineral carriers

Tarkashvand*[1], M., Lakzian[2], A., Fotovat, A.[2] Mohammadi, M. [3]

[1] PhD. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[2] Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[3] Assistant Prof., Marin Biotechnology Department, Persian Gulf University, Iran

Abstract

Biofilm form of bacteria has considerable efficacy in degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). One of the well-studied bacteria which is dominant in soil and also well known to form biofilms and degrade PAHs are pseudomonas. However, there is little knowledge about biofilm establishment by native Pseudomonas bacteria of Iranian soils that are capable to degrade hydrocarbons. The goal of this study was to assess the biofilm formation potential of Pseudomonas isolates from oil-contaminated soil. Sixty-three Pseudomonas strains were isolated from the soil, purified, and were studied for their biofilm characteristics. Based on screening tests, four (superior) isolates were chosen to investigate their ability to degrade crude oil in mineral salt medium supplemented with crude oil. The experiments were performed by a randomized design with a factorial arrangement. The most effective strain was identified by 16S rRNA gene sequencing method and this strain recognized as Pseudomonas aeruginosa JCM 5962. Then, the ability of the identified isolate to grow as a biofilm on sugarcane bagasse and pumice carries was investigated. Result support that all Pseudomonas isolates had the ability to form biofilm in microtiter plate test. The superior isolate of Pseudomonas (Pseudomonas aeruginosa) in degrading test, also showed the tendency to form active biofilm on the surfaces of sugarcane bagasse and pumice carries. It seems that Pseudomonas aeruginosa in biofilm form can be used to enhance soil bioremediation efficiency.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Biofilm, Pumice, Crude oil

* Corresponding author Email: Maryam.Tarkashvand@wsu.edu

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر کودهای زیستی در مقدار عناصر غذایی کم مصرف و عملکرد لوبیا چیتی در شرایط تنش خشکی

اکبر همتی[1*]، فرهاد رجالی[2]

[1] استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

[2] دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب

چکیده

این آزمایش برای تعیین اثرات باکتری ریزوبیوم و قارچ مایکوریزا در عملکرد و مقدار عناصر غذایی کم مصرف در لوبیا در شرایط تنش خشکی، اجرا گردید. در سطوح اصلی تیمارهای آبیاری در دامنه‌های ۱۰۰-۹۵، ۸۰-۷۵ و ۶۰-۵۵ درصد آب قابل استفاده بود و در سطوح فرعی تیمارهای ۱-مایه زنی بذر با باکتری ریزوبیوم سویه‌ی ۱۷۷ به مقدار دو کیلوگرم در هکتار، ۲- مایه‌زنی بذر با باکتری ریزوبیوم سویه‌ی ۱۶۰ به مقدار دو کیلوگرم در هکتار، ۳-کاربرد خاکی قارچ مایکوریزا به مقدار ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار۴-تیمار های اول و دوم ، ۵- تیمارهای اول، دوم و سوم و ۶- تیمار شاهد بود. اثرات تنش خشکی و کودهای زیستی بر عملکرد و جذب عناصر غذایی کم مصرف آهن، روی، منگنز و مس اختلاف معنی داری در سطح پنج درصد داشتند. بیشترین عملکرد دانه (۲۳۷۱ کیلوگرم در هکتار) در تیمار آبیاری ۸۰-۷۵ درصد و تلقیح با ریزوبیوم سویه‌ی ۱۶۰ بود. بیشترین مقدار عناصر کم مصرف در دانه واندام هوایی نیز در همین تیمار آبیاری و مصرف تلفیقی کودهای زیستی بود. افزایش جذب برای آهن ۲۱/۴ منگنز ۵/۷ ، روی ۳/۵ و مس ۳/۳ درصد بود. بیشترین مقدار پروتئین دانه برابر ۲۱/۵ درصد در تیمار تلقیح شده توسط باکتری در آبیاری ۶۰-۵۵ درصد به‌دست آمد. این نتایج نشان داد در شرایط تنش خشکی متوسط، تلقیح بذر لوبیا با دو کیلوگرم زادمایه‌ی باکتری ریزوبیوم بیشترین عملکرد را خواهد داشت.

کلمات کلیدی: رطوبت خاک، ریزوبیوم، عناصر غذایی، لوبیا، مایکوریزا

مقدمه

باکاهش رطوبت خاک سرعت عرضه عناصر غذایی به ریشه از راه پخشیدگی و جریان توده‌ای و در نتیجه فراهمی عناصر غذایی کاهش یافته و تغذیه گیاه دشوار می‌شود (هاولین و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین مدیریت تغذیه گیاه در شرایط تنش یکی از راهبردهای مهم در تولید محصولات کشاورزی بوده و گیاهی که خوب تغذیه شده باشد در برابر خشکی پایداری بیشتری خواهد داشت. در همین راستا یکی از راهکارهای افزایش کارآیی جذب عناصر غذایی و عملکرد بیشتر در گیاهان بهره‌گیری از توان ریز جانداران خاک است. در یک آزمایش کارآیی چهار سویه‌ی ریزوبیوم در سه سطح آبیاری ۸۰، ۶۰ و۴۰ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد بیشترین عملکرد دانه لوبیا به مقدار ۳۰۶۶ کیلوگرم در هکتار با آبیاری در ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای و مایه زنی با سویه‌ی باکتری ریزوبیوم گونه‌ی ۱۶۰بدست آمد (همتی و همکاران، ۱۳۹۳). تولید انواع متابولیت‌ها، هورمون‌ها ، اسیدهای آمینه و تولید ترکیبات آلی که میل ترکیبی بسیار شدیدی با عناصر فلزی دارند مانند سیدروفورها، و اثرات غیر مستقیم مانند محدود نمودن رشد قارچ‌های پاتوژن و تولید آنتی بیوتیک های ضد عوامل بیماریزا، روش‌های افزایش رشد و عملکرد گیاهان توسط باکتری‌های ریزوبیومی است(فیگوئرو و همکاران، ۲۰۰۸). گزارش شده مایه‌زنی لوبیا با سویه‌های باکتری ریزوبیوم منجر به افزایش جذب ۷۰، ۲۶، ۳۸، و ۳۰ درصدی نیتروژن، آهن، منگنز و مس شده است(یحیی آبادی و اسدی رحمانی، ۲۰۰۶).

مشاهده شده قارچ‌های میکوریز از طریق افزایش رشد و جذب بیشتر عناصر غذایی در شرایط تنش کم آبی پایداری گیاه به خشکی را افزایش داده‌اند. در شرایط تنش کم آبی در اثر افزایش سطح ریشه هدایت آبی ریشه‌های گیاهان میکوریزی ۲ تا ۳ برابر بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی است. در شرایط کم آبی هیف‌های قارچ میکوریز آربوسکولار علاوه بر افزایش جذب آب ، باعث کنترل تنظیم اسمزی و تغییرات روزنه ای و خاصیت ارتجاعی دیواره سلولی گیاه می‌شوند(اسمیت و همکاران، ۲۰۱۰). تنش کم آبی تعداد تارهای کشنده ریشه را کاهش می‌دهد و بر مورفولوژی ریشه و انشعابات ریشه صدمه وارد می‌نماید که در نتیجه آن جذب عناصر غذایی به‌وسیله سیستم ریشه‌ای کاهش می‌یابد. در این زمان، هیف‌های قارچ میکوریز آربوسکولار می‌تواند جانشین سیستم‌های ریشه شده و عناصر غذایی را جذب نمایند. نقش همزیستی میکوریزی در شرایط تنش کم آبی در جذب عناصرغذایی مهمتر از

* ایمیل نویسنده مسئول: a.hemati@areeo.ac.ir

نقش همزیستی میکوریزی در شرایط بدون تنش آبی است (وو و زو، ۲۰۰۹). تغییر در الاستیسیته برگ، بهبود در پتانسیل آب و آماس برگ، باز نگه داشتن روزنه‌ها و افزایش تعرق، افزایش در طول و عمق نفوذ ریشه‌ها، افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه، افزایش جذب آب در سطوح پایین رطوبت توسط هیف‌های برون ریشه‌ای، تغییر در انعطاف پذیری دیواره سلولی، افزایش فعالیت فتوسنتزی، تجمع پرولین و کربوهیدرات‌ها و افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌ها در گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزی، باعث افزایش پایداری گیاه در برابر تنش های کم آبی می‌شود(اسمیت و همکاران، ۲۰۱۰). در سال‌های اخیر از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار برای مقابله با کم آبی و تنش‌های کم آبی در بسیاری از گیاهان استفاده شده است. به‌این ترتیب که رابطه همزیستی میکوریزی از طریق اجتناب ازخشکی، افزایش جذب عناصر فسفر و سایرعناصر ضروری برای رشد و توسعه گیاه، آنها را در مقابل تنش حفظ می‌کند. در این تحقیق اثرات کاربرد دو نوع سویه‌ی باکتری ریزوبیوم ودو گونه‌ی قارچ میکوریز آربوسکولار در عملکرد و جذب عناصر غذایی کم نیاز توسط لوبیا چیتی و افزایش پایداری آن به خشکی مورد بررسی قرار گرفته است

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده با طرح پایه‌ی بلوک‌های کامل تصادفی اجرا گردید. در سطوح اصلی تیمارهای تنش خشکی شامل آبیاری در دامنه‌های ۱۰۰-۹۵=S1 (بدون تنش)، ۸۰-۷۵=S2 (تنش متوسط)و ۶۰-۵۵ =S3 (تنش زیاد) درصد آب قابل استفاده(AW) خاک بود و در سطوح فرعی تیمارهای کود زیستی به شرح زیر قرار داشت:

T1- مایه‌زنی بذر لوبیا به مقدار دو کیلو گرم در هکتار با زاد مایه‌ی باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی سویه‌ی ۱۷۷

T2- مایه‌زنی بذر لوبیا به مقدار دو کیلو گرم در هکتار با زاد مایه‌ی باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی سویه‌ی ۱۶۰

T3- مایه‌زنی خاک به مقدار ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار با زادمایه‌ی قارچ میکوریز آربوسکولار شامل مخلوط گونه‌های *Glomus mossea* و *Glomus intraradices*

T4-تیمار اول + تیمار دوم

T5- تیماراول+ تیمار دوم+ تیمار سوم T6

T6- تیمار کنترل (بدون مایه‌زنی)

آزمایش دارای ۱۸ تیمار و چهار تکرار بود که طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ اجرا گردید. هر کرت شامل چهار ردیف کشت به طول پنج متر و فاصله بین هر ردیف ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین دو بوته در هر ردیف ۱۰ سانتی متر بود. به‌منظور حذف اثرات حاشیه‌ای، بین هرکرت یک متر و بین تیمارهای اصلی ۱/۵متر و بین تکرارها نیز سه متر فاصله نکاشت بود. بذر مصرفی لوبیا چیتی رقم صدری بود. برای شمارش کل باکتری‌ها از روش سری رقت در محیط YMA استفاده شد. جهت تعیین غلظت عناصر آهن، روی، مس و منگنز، نمونه‌ی گیاه با DTPA عصاره گیری و با دستگاه جذب اتمی Shimadzu مدل ۶۷۰ غلظت عناصراندازه‌گیری شد.

برای تعیین حجم آب مصرفی در هر دور آبیاری، با اندازه گیری رطوبت وزنی خاک و تبدیل آن به رطوبت حجمی، حجم آب مورد نیاز هر تیمار برای رسانیدن عمق توسعه ریشه به حد ظرفیت زراعی به روش زیر برآورد گردید.

رطوبت موجود خاک - رطوبت خاک در ظرفیت مزرعه‌ای = کمبود رطوبت خاک

۱۰۰۰× عمق ریشه(mm)× وزن مخصوص ظاهری × کمبود رطوبت خاک = عمق خالص آبیاری(mm)

عرض کرت× عمق خالص آبیاری=عمق آب آبیاری(m^3m^{-2}).

عمق توسعه ریشه مطابق مرحله رشد گیاه متغییر بود. جهت اندازه گیری رطوبت در حد ظرفیت زراعی (FC) از صفحات تحت فشار (آزمایشگاهی) استفاده گردید.



شکل۱، نمایی از کرت های آزمایش

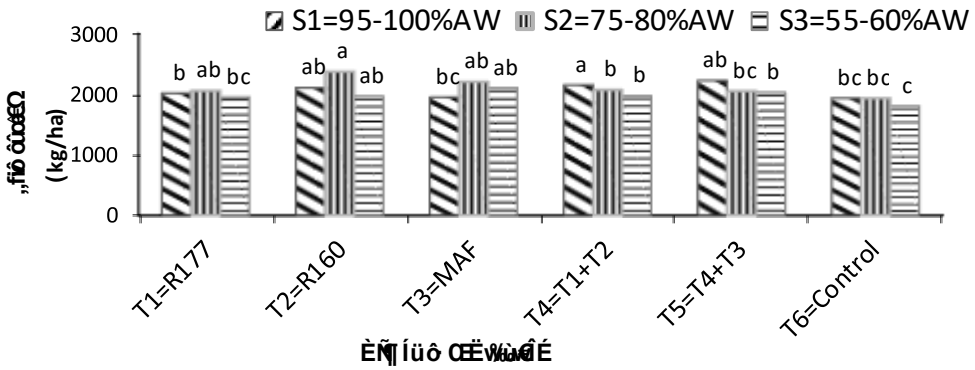
نتایج و بحث

عملکرد دانه: بر اساس نتایج تجزیه واریانس مرکب آزمایش(جدول۱) اثرات تیمارهای تنش خشکی و باکتری ریزوبیوم در عملکرد دانه در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین مقدار عملکرد دانه در مجموع دو سال در تیمار تنش خشکی متوسط(S2) و استفاده از باکتری ریزوبیوم سویه‌ی ۱۶۰(T2) به اندازه ۲۳۷۱ کیلوگرم در هکتار به‌دست آمد(شکل۱). حصول بیشترین عملکرد دانه در دامنه تنش خشکی متوسط(۸۰-۷۵ درصد آب قابل استفاده) مبین توانایی کارکرد سویه‌های باکتری ریزوبیوم استفاده شده در شرایط رطوبی کم خاک است. از آنجا که بقولات در دامنه‌های وسیع رطوبتی خاک قادر به تثبیت نیتروژن می‌باشند می‌توان سویه‌هایی با حساسیت متنوع انتخاب و استفاده نمود. چرا که حساسیت به تنش رطوبتی از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است. وجود توده‌های ریزوبیوم در خاک‌های صحرایی و تشکیل غده‌های موثر در این زمین‌ها مبین توانایی کارکرد این باکتری‌ها در خاک‌های با رطوبت کم است. افزایش عملکرد لوبیا توسط باکتری‌های ریزوبیومی در شرایط تنش خشکی توسط پژوهش گران متعددی گزارش شده است(همتی و فیضیان، ۲۰۱۴، و والورد و همکاران، ۲۰۰۶).

جدول ۱- میانگین مربعات عملکرد و مقدارعناصر کم نیاز در دانه لوبیا تحت تاثیر تیمارهای کود زیستی و تنش خشکی

منبع تغییرات	درجه آزادی	عملکرد دانه	آهن	منگنز	روی	مس
سال Year(Y)	۱	۳۰۴۳۳۶^{ns}	۵۸۵۶۴**	۳۵۲۰/۴۴ **	۴۹^{ns}	۲/۵^{ns}
خطای سال Year Erorr	۶	۲۹۹۶۱۲	۲۶۱/۷۷	۶۸/۲۴	۵۵/۰۱	۴/۳۵
تنش خشکی(A)	۲	۳۴۸۳۲۷*	۲۷۷۱/۱۷**	۳۵۲/۱۱**	۱۶/۰۹*	۴*
سال×تنش خشکی A×Y	۲	۲۷۰۹۸۵۵**	۱۳۳۱۱**	۲۱۱/۳۶*	۳۲/۷۷*	۰/۴۶^{ns}
خطاError	۱۲	۳۴۷۸۱۹	۳۵۶/۴۵	۳۸/۳۹	۱۱/۰۶	۰/۸۱
کودزیستی(B)	۵	۲۷۸۵۵۱*	۱۹۸۴۷۵**	۸۹/۶۷*	۱/۵۶^{ns}	۰/۱۵^{ns}
سال ×کود زیستی B×Y	۵	۶۰۹۶^{ns}	۱۸۶۸۱/۰۸**	۶۰/۱۴^{ns}	۴/۸۳^{ns}	۰/۱۲^{ns}
تنش خشکی ×کود زیستی A×B	۱۰	۱۶۰۹۷۱^{ns}	۱۲۶۴۳/۲**	۶۰/۳۵^{ns}	۲/۹۸^{ns}	۰/۴۲^{ns}
سال× تنش×کود A×B×Y	۱۰	۲۳۷۳۸۲^{ns}	۱۴۵۹۲/۶**	۸۱/۵۳^{ns}	۲/۹۷^{ns}	۰/۰۸^{ns}
خطا Erorr	۹۰	۲۱۰۹۵۵	۴۶۸/۵۶	۴۳/۳۳	۶۸/۷۵	۰/۶۷
ضریب تغییرات(%) C.V		۲۱/۹	۱۸/۳	۱۷/۸	۱۱/۶	۱۱/۲

**و* و ns به ترتیب معنی دار در سطح یک درصد و پنج درصد وغیر معنی دار.

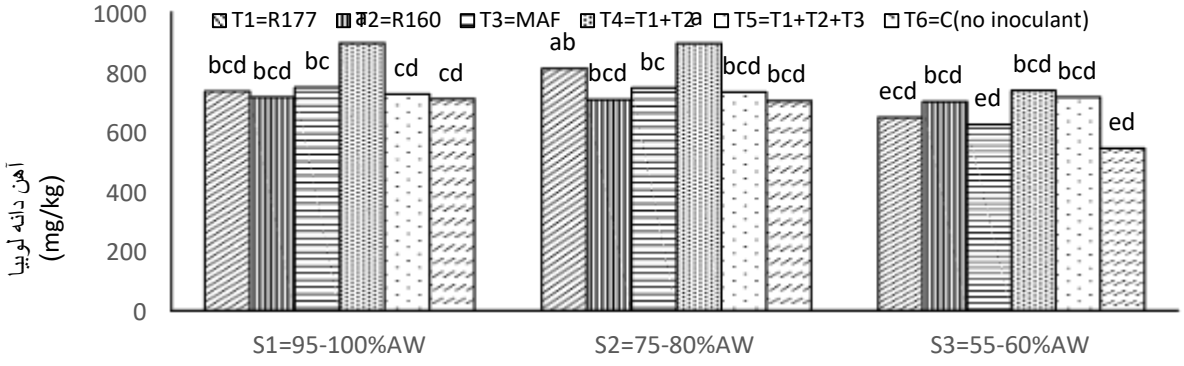


شکل ۱- اثرات متقابل تیمارهای کود زیستی و تنش خشکی در عملکرد دانه لوبیا

(ریزوبیوم گونه‌ی۱۷۷=R177، ریزوبیوم گونه‌ی۱۶۰=R160، قارچ میکوریز آربوسکولار=AMF، تیمارشاهد =T6، آبیاری در دامنه ۱۰۰ تا۹۵ درصد آب قابل استفاده=S1، آبیاری در دامنه ۸۰ تا۷۵ درصد آب قابل استفاده=S2، آبیاری در دامنه ۶۰تا۵۵ درصد آب قابل استفاده=S3).

کاربرد تیمارها در جذب عناصر غذایی کم نیاز توسط گیاه لوبیا

غلظت آهن، بر اساس نتایج این پژوهش، گرچه بیشترین مقدار آهن در دانه و اندام هوایی لوبیا در تیمار تنش خشکی متوسط(S2) بود ولی با افزایش شدت تنش، مقدارآهن در دانه لوبیا کاهش یافت(شکل۲). میانگین مقدار آهن در اندام هوایی لوبیا بیش از چهار برابر دانه بود. افزایش آهن در دانه و اندام هوایی لوبیا به واسطه کاربرد قارچ میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های ریزوبیوم به‌ترتیب برابر ۲۱/۴ و ۱۵/۸ درصد بود. افزایش اندازه آهن در دانه و اندام هوایی گیاه توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های ریزوبیوم تحت تنش های غیر زیستی گزارش شده است(مرادی و همکاران ۱۳۸۷).



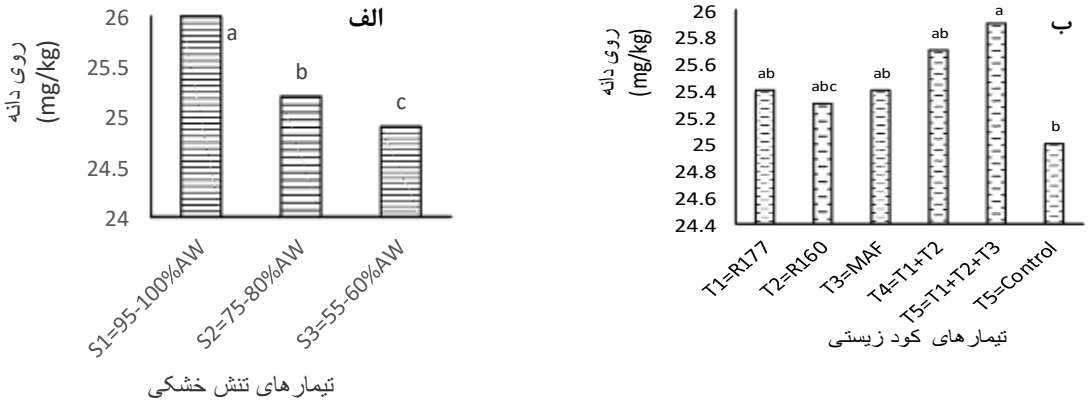
شکل ۲-اثرات متقابل تیمارهای کود زیستی و تنش خشکی در مقدار آهن دانه لوبیا

(ریزوبیوم گونه‌ی۱۷۷=R177، ریزوبیوم گونه‌ی۱۶۰=R160، قارچ میکوریز آربوسکولار=AMF، تیمارشاهد =T6، آبیاری در دامنه ۱۰۰ تا۹۵ درصد آب قابل استفاده=S1، آبیاری در دامنه ۸۰ تا۷۵ درصد آب قابل استفاده=S2، آبیاری در دامنه ۶۰تا۵۵ درصد آب قابل استفاده=S3).

غلظت منگنز، کمترین و بیشترین مقدار منگنز در دانه به‌ترتیب برابر۳۱/۷ و ۴۳/۷ میلی گرم در کیلوگرم بود که توسط تیمارهای S3T2 و S1T4 حاصل شده‌اند. نتایج این آزمایش نشان داد گرچه با افزایش شدت تنش خشکی از مقدار منگنز دانه لوبیا کاسته شده، در عین حال در شرایط تنش

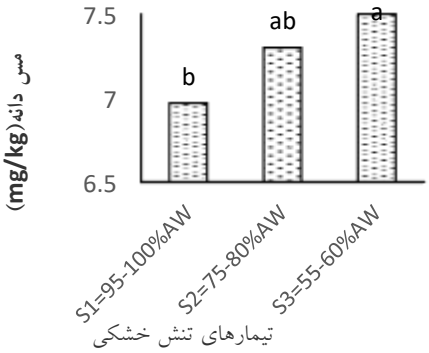
خشکی کاربرد باکتری‌های ریزوبیوم خصوصاً به صورت تلفیقی منجر به جذب بیشترین منگنز در دانه لوبیا شده است. به‌طوری که اندازه افزایش منگنز دانه نسبت به تیمار شاهد (T6) ۶میلی گرم در کیلوگرم بود. افزایش جذب عناصر کم نیاز مانند منگنز توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را به پتانسیل ریداکس پایین‌تر در ریزوسفر، افزایش ترشحات کلات کننده، و کاهش بیشتر واکنش خاک در ریزوسفر گیاهان دارای قارچ نسبت به گیاهان بدون قارچ مرتبط دانسته‌اند(ونگ و همکاران ۲۰۰۷).

غلظت روی: بیشترین مقدار روی در دانه برابر ۲۶/۲ میلی گرم در کیلوگرم در تیمار مصرف تلفیقی باکتری‌های ریزوبیوم و قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی متوسط (S2T5) بود. کمترین مقدار روی نیز برابر ۲۴/۱ میلی گرم در کیلوگرم در تیمار تلقیح سویه‌ی ریزوبیوم ۱۶۰ در شرایط تنش خشکی زیاد(S3T2) بود. این نتایج مبین کاهش مقدار روی با افزایش تنش خشکی و افزایش مقدار آن در صورت استفاده از باکتری‌های ریزوبیوم و قارچ میکوریز آربوسکولار در شرایط بدون تنش خشکی و یا تنش متوسط است(شکل های ۳ الف و ب).

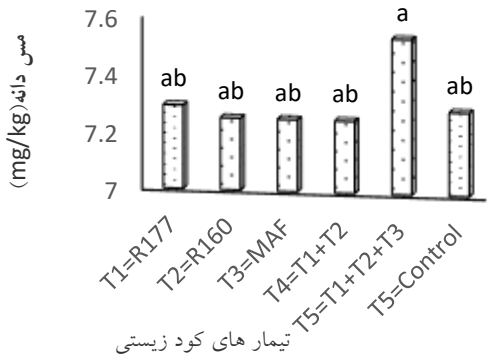


شکل۳- اثر تیمارهای تنش خشکی(الف) و کودهای زیستی(ب) در مقدار روی دانه لوبیا

غلظت مس: نتایج این آزمایش نشان داد با افزایش تنش خشکی مقدار مس در لوبیا بر خلاف آهن، منگنز و روی افزایش یافته است(شکل۴). استفاده تلفیقی باکتری‌های ریزوبیوم و قارچ میکوریز (تیمار T5) مقدار مس در دانه لوبیا را افزایش داده است(شکل۵). نتایج این آزمایش نشان داد کاربرد باکتری ریزوبیوم سویه‌های R160 و R177 همراه با قارچ میکوریز آربوسکولار منجر به افزایش ۳/۳ و ۲/۳ درصدی مس در دانه و اندام هوایی لوبیا نسبت به تیمار کنترل(عدم مایه زنی) شده است. در همین راستا گزارش شده کاربرد تلفیقی باکتری‌های ریزوبیوم و باسیلوس، مقدار مس اندام هوایی لوبیا را حدود۳۶۵/۴ درصد و مس دانه را حدود ۳۶۶/۷ درصد نسبت به تیمار کنترل(عدم مایه‌زنی) افزایش داده است(الکوکا و همکاران ۲۰۱۰).



شکل۴- اثر تیمارهای تنش خشکی در مقدار مس دانه لوبیا



شکل۵- اثر تیمارهای کود زیستی در مقدار مس دانه لوبیا

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد اگر چه تنش خشکی شدید سبب کاهش جذب عناصر غذایی و عملکرد در لوبیا می‌گردد ولی در تنش‌های متوسط با تلقیح بذر لوبیا چیتی با زادمایه‌ی باکتری ریزوبیوم به مقدار دو کیلوگرم در هکتار و یا تلقیح خاکی قارچ میکوریزا آربوسکولار به مقدار ۱۵۰ کیلوگرم زادمایه در هکتار، سبب افزایش جذب عناصر غذایی، آب و به تبع آن افزایش عملکرد می‌شود.

منابع

مرادی، ص.، بشارتی،ح.، نادیان، ح. و فیضی اصل، و. ۱۳۸۷. تاثیر قارچهای میکوریز آربسکولار و باکتری ریزوبیوم بر جذب عناصر غذایی در نخود تحت شرایط تنش خشکی. پایان نامه کارشناسی ارشد، خاکشناسی، دانشگاه زنجان.

همتی، ا.، حسینی، س. م.، اسدی رحمانی، ه.، امینی، ز. و میرطالبی، س. ح. ۱۳۹۳. بررسی کارآیی سویه های ریزوبیوم در شرایط تنش آبی درلوبیا چیتی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، نشریه شماره۱۸۴۹، موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج. ۱۸ صفحه.

یحیی آبادی، م. و اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۴. مطالعه اثر سویه های مختلف ریزوبیوم بر جذب عناصر ریز مغذی در گیاه لوبیا. نهمین کنگره علوم خاک ایران، ص ۳۵- ۳۴.

Elkoca, E., Turan, M., and Figen Donmez, M. 2010. Effects of single, dual and triple inoculation with bacillus subtilis, basillus megaterom and rhizobium legominosarum bv. Phaseoli on nodulation, nutrition, nutrient uptake, yield, yield parameters of common bean. Journal of Plant Nutrition, 33, 2104-2119.

Figueiredo, M., Burity, H. A., Martinez, C. R., and Chanway, C. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean *Phaseolus vulgaris L.*) by co-inoculation with Paenibacillus polymyxa and Rhizobium tropic. Appliedsoil ecology, 40, 18 2 – 188.

Havlin, J. L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L., and Nelson, W. L. 2004. Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management. Sixth Ed. Prentice Hall, New Jersey USA.

Hemmati, A., and Feizian, M. 2014. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by Rhizobium strains. 9" International Soil Science Congress on "The Soul of Soil and Civilization", 14-16 October, 2014, Side, Antalya Turkey.

Smith, S. E., Facelli, E., and Pope, S. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. Plant Soil, 326, 3-20.

Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Vela, E., Rodri, C., Emilio Cervantes, B., Chamber, M., and Mariano, J. 2006. Differential effects of co-inoculations with Pseudomonas jessenii PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and Mesorhizobium ciceri C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Journal of Plant and Soil, 28, 43-50.

Wang, M.Y., Xia, R.X., Hu, L.M., Dong,T., and Wu, Q.S. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate iron deficient chlorosis in *Poncirus trifoliata L*. RAF under calcium bicarbonate stress. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82,776-780.

Wu, Q.S., and Zou, Y.N. 2009. Mycorrhizal Influence on nutrient uptake of citrus exposed to drought stress. The Philippine Agricultural Scientist, 92, 33-38.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of Biofertilizers on Micronutrients Content and Yield of Common Bean Under Drought Stress Condition.

Hemmati[1]*, A., Rejali [2], F.

[1] Assistant Prof., Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran

[2] Associate Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Abstract

This research was conducted to determine the effects of rhizobium bacteria strains and arboscular mycorrhiza fungi on yield and micro nutrients content in bean under drought stress condition. Two years' field experiments were conducted during 2015, 2016 years. Three irrigation, S1=95-100, S2=75-80 and S3=55-60 % available water were assigned to main plots and six bio-fertilizer treatments including, T1= 177rhizobium strain and T2= 160 rhizobium strain used for seed inoculation, T3= Soil application of arboscular mycorrhiza fungi, T4= T1+T2, T5= T1+T2+T3 and T6= control was randomized to subplots in a split plot experimental design. There were significant differences ($p<0.05$) in yield and nutrients uptake between drought stress and bio-fertilizer treatments. Highest grain yield (2371 $kgha^{-1}$) was obtained in S2T2 treatment. The highest Fe, Mn, Zn, and Cu seed plant were obtained from co-inoculation of 160 and 177 Rhizobium strains which increased Fe, Mn, Zn and Cu contents of plant by 21.4 %, 5.7%, 3.5%, 3.3% and 8% respectively in drought stress treatment (S2). The results showed that the highest of seed protein (21.5%) was obtained in drought stress (S3) with Rhizobium strain 177 inoculated treatment. Base of this results, the highest yield can obtain by $2kgha^{-1}$ of seed bean rhizobium inoculation in moderate drought stress condition.

Keywords: Bean, Mycorrhiza, Nutrient Elements, Rhizobium, Soil Moisture

* Corresponding author, Email: a.hemati@areeo.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثر کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیمی خاک

عرفانه چهاردوری[۱]، شکوفه رضائی[۲*]، علی خانمیرزایی‌فرد[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر کود بیولوژیک بر فعالیت آنزیمی خاک بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور کود بیولوژیک و زمان انکوباسیون در سه تکرار انجام شد. نمونه‌های خاک با کود بیولوژیک (*آزوسپریلوم*) در دو سطح صفر و یک درصد وزنی خاک تلقیح و ۲۴ و ۷۲ روز پس از انکوباسیون، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی و اوره‌آز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر زمان و کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز و اثر متقابل زمان در کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل زمان و کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. با گذشت زمان فعالیت آنزیم اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی افزایش و فسفاتاز اسیدی کاهش یافت. کود زیستی باعث افزایش فعالیت فسفاتازها و اوره‌آز شد. به طور کلی تغییرات فعالیت آنزیمی در خاک بسته به نوع آنزیم، زمان انکوباسیون و شرایط خاک متفاوت است.

کلمات کلیدی: آزوسپریلوم، اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی

مقدمه

آنزیم‌ها از مهم‌ترین محصولات میکروبی هستند که نقش اساسی در فرایندهای خاک از جمله چرخه عناصر غذایی و تبدیل انرژی به وسیله کاتالیزکردن واکنش‌های بیوشیمیایی دارند (Shi و همکاران، ۲۰۰۸). آنزیم‌های خاک می‌توانند شاخصی برای نشان دادن آلودگی، حاصلخیزی و سلامت خاک باشند(Martinez و همکاران، ۲۰۰۷) زیرا در ارتباط نزدیک با ویژگی‌های بیولوژیک خاک بوده و به تغییرات مدیریتی خاک به سرعت واکنش نشان می‌دهند (تاجیک و همکاران، ۱۳۹۱). در سال‌های اخیر به دلیل توجه به کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای بیولوژیک افزایش یافته است. بنابراین در این تحقیق به بررسی فعالیت برخی از آنزیم‌های خاک تحت تاثیر کودبیولوژیک پرداخته شد. کاربرد کودهای بیولوژیک و شیمیایی موجب افزایش فعالیت‌های میکروبی خاک از جمله افزایش تعداد باکتری‌ها، قارچ‌ها و فعالیت آنزیم‌های خاک نسبت به خاک شاهد شد(Anita و همکاران، ۲۰۱۱) کاربرد کود بیولوژیک موجب افزایش تجمع دی‌اکسید کربن در مقایسه با خاک شاهد در طی ۴۸ ساعت گردید(Piotrowska و همکاران، ۲۰۱۲). پژوهش Manna و همکاران(۲۰۰۷) نشان داد تنفس خاک، کربن زیست‌توده‌ی میکروبی و فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز در تیمارهای ورمی‌کمپوست بسیار بیشتر از تیمارهای حاوی کودهای شیمیایی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج اجرا شد. نمونه‌های خاک از افق سطحی (۲۰-۰سانتی‌متری) تهیه، در معرض هوا خشک و سپس از الک ۲میلی‌متری عبور داده شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک از قبیل اسیدیته درگل اشباع و هدایت الکتریکی در عصاره اشباع، مواد آلی به روش اکسیداسیون تر، بافت به روش هیدرومتری و ظرفیت زراعی خاک اندازه‌گیری شد (علی‌احیایی و بهبهانی‌زاده، ۱۳۷۲). کود بیولوژیک آزوسپریلوم طبق تیمارها(صفر و یک درصد وزنی) به صورت پودری با توجه به وزن خاک توزین و به صورت کامل با خاک مخلوط و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با حفظ رطوبت در ۶۰ درصد ظرفیت زراعی انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۷۲ روز، از خاک‌ها نمونه‌برداری و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی(Eivazi و Tabatabai، ۱۹۹۷) و اوره‌آز (Zantua و Bremner ، ۱۹۷۵) اندازه‌گیری شد. در پایان تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفت.

*ایمیل نویسنده مسئول: Rezaee_sh@yahoo.com

نتایج و بحث

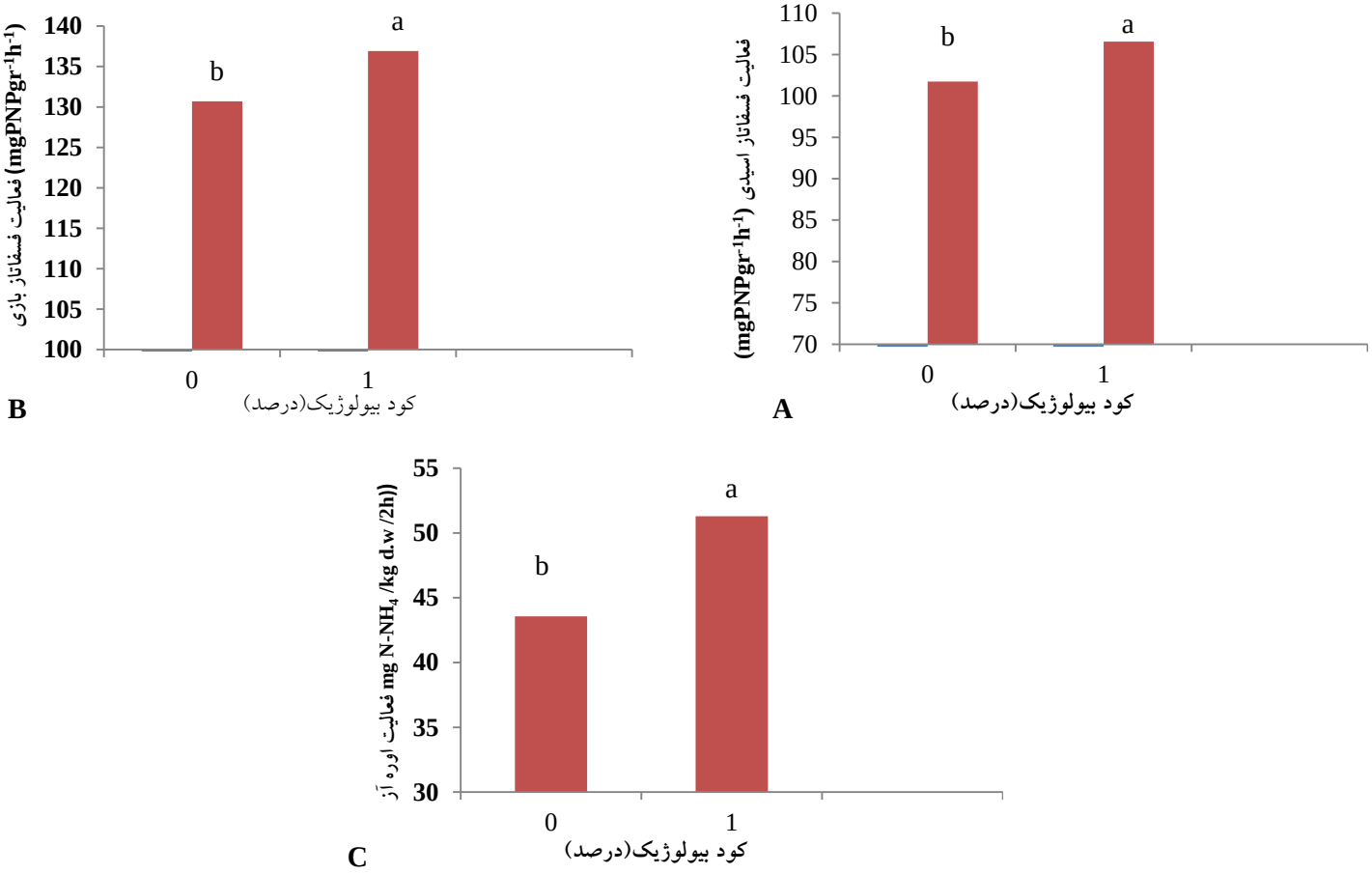
نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر زمان و کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز و اثر متقابل زمان در کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در سطح احتمال ۱ ٪ و اثر متقابل زمان و کود بیولوژیک بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شده است (جدول۱).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر کود بیولوژیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی، قلیایی و اوره‌آز

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فسفاتاز اسیدی	فسفاتاز قلیایی	اوره‌آز
زمان	۱	۲۱۸۴/۲۶۹**	۲۰۰۲/۲۶۴**	۶۳۱۷/۴۵۶**
کود بیولوژیک	۱	۸۳۴/۹۲۱**	۱۳۸۹/۲۵۱**	۲۱۴۴/۳۶۴**
زمان×کود بیولوژیک	۱	۸۲۹/۹۸۷**	۶۷۰/۲۶۶*	۱۶۰۶/۳۰۳*
خطای آزمایش	۱۲۳	۹۲/۹۰	۱۳۱/۹۰	۳۰۹/۲۴
ضریب تغییرات		۹/۲۵	۸/۵۸	۳۷/۰۶

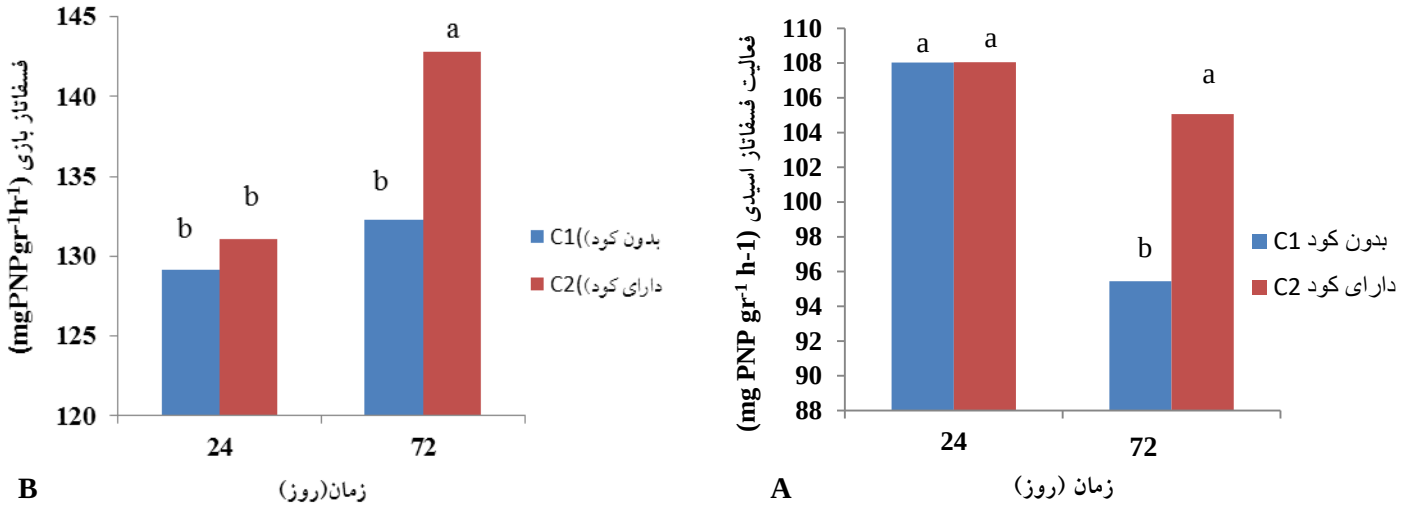
ns ،**،* به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

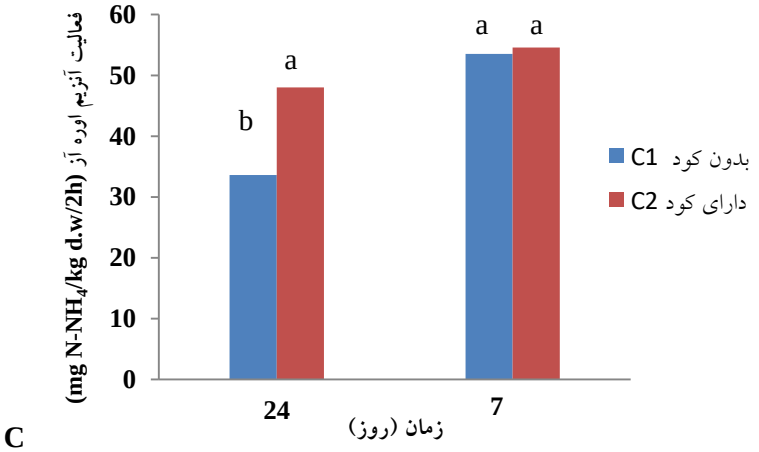
استفاده از کود بیولوژیک باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی شد. فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در تیمار شاهد (سطح صفر کود بیولوژیک) به ترتیب در حدود ۱۰۱ و ۱۳۰ ($mgPNPgr^{-1}h^{-1}$) و در سطح ۱ ٪ وزنی کود بیولوژیک به ترتیب در حدود ۱۰۶ و ۱۳۶ ($mgPNPgr^{-1}h^{-1}$) قرائت شد(شکل A.۱ و B.۱). میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در سطح صفر و ۱ ٪ کود بیولوژیک به ترتیب حدود ۴۳ و ۵۱ ($mg\ N\text{-}NH_4/kg\ d.w/2h$) گزارش شد بعبارت دیگر استفاده از کود بیولوژیک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اوره‌آز شد(شکل C.۱). کودهای بیولوژیک به دلیل افزودن مواد آلی و کربن به خاک سبب افزایش فعالیت‌های آنزیمی در خاک می‌شوند. افزایش مواد آلی در نتیجه افزودن کودهای بیولوژیک به خاک می‌تواند بر روی فعالیت آنزیم‌های خاک موثر باشد و سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های خاک گردد(Marinari و همکاران، ۲۰۰۰). افزودن ماده آلی و یا ورمی‌کمپوست(کودهای زیستی) به خاک باعث افزایش فعالیت‌های آنزیمی خاک(اسید فسفاتاز، دی‌هیدروژناز و...) و نیز افزایش تولید دی‌اکسیدکربن می‌شود و در نتیجه سبب افزایش فعالیت میکروبی به علت وجود مواد آلی غنی در خاک خواهد شد. بیان کردند افزودن پسماند گیاهی به خاک بسته به نوع پسماند و گونه‌ی گیاهی، تقریباً فعالیت همه‌ی آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد(Michael و Joshua، ۲۰۰۳). پژوهش Kourtev و همکاران(۲۰۰۲) نشان داد افزودن پسماند گیاهی به خاک می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیمی در خاک شود. فرقانی(۱۳۸۲) بیان کرد یکی از کودهای آلی و یا همان اصلاح‌کننده‌های آلی، لجن فاضلاب می‌باشند که موجب افزایش ظرفیت پتانسیل بیوشیمیایی خاک و فعالیت آنزیم‌های مختلف خاک می‌شود.



شکل۱- اثر کود بیولوژیک روی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی(A)، فسفاتاز قلیایی(B) و اوره‌آز (C)

شکل A.۲، اثر متقابل زمان و کود بیولوژیک را بر روی فعالیت فسفاتاز اسیدی نشان می‌دهد. در حالت بدون کود در زمان ۲۴ روز فعالیت آنزیم در حدود ۱۰۸ ($mg\ PNP\ gr^{-1}h^{-1}$) و در زمان ۷۲ روز فعالیت آنزیم در حدود ۹۵ ($mg\ PNP\ gr^{-1}h^{-1}$) و در حالت کاربرد کود، در زمان ۲۴ روز فعالیت آنزیم ۱۰۸ ($mg\ PNP\ gr^{-1}h^{-1}$) و در زمان ۷۲ روز فعالیت آنزیم ۱۰۵ ($mg\ PNP\ gr^{-1}h^{-1}$) است، در واقع گذر زمان باعث کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی شده است ولی با افزودن کود، روند کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی کند شده است به عبارت دیگر افزودن کود بیولوژیک اثر کاهشی زمان را تا حدودی تعدیل کرده است. فعالیت فسفاتاز قلیایی در زمان ۲۴ روز در تیمار شاهد (بدون کود بیولوژیک) و دارای کود بیولوژیک به ترتیب معادل ۱۲۹ و ۱۳۱($mgPNPgr^{-1}h^{-1}$) و در زمان ۷۲ روز در تیمار شاهد در حدود ۱۳۲($mgPNPgr^{-1}h^{-1}$) و در حالت دارای کود در حدود ۱۴۲($mgPNPgr^{-1}h^{-1}$) اندازه‌گیری شد در واقع در هر دو زمان میزان فعالیت آنزیم با افزایش کود بیولوژیک افزایش یافته است ولی این افزایش فعالیت آنزیم در ۷۲ روز مشهودتر است(شکل B.۲). فعالیت آنزیم اوره‌آز در تیمار شاهد در زمان ۲۴ و ۷۲ روز به ترتیب معادل ۳۰ و ۵۲ ($mg\ N\text{-}NH_4/kg\ d.w/2h$) بود که با افزودن کود بیولوژیک فعالیت آنزیم در زمان ۲۴ روز به ۴۷واحد و در زمان ۷۲ روز به ۵۴واحد افزایش یافت. در واقع افزودن کود بیولوژیک سبب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز شده است (شکل ۲. C).





شکل۲- اثر کود بیولوژیک روی فعالیت فسفاتاز اسیدی(A)، فسفاتاز قلیایی(B) و اوره‌آز (C) در زمان‌های مختلف

استفاده از کودهای بیولوژیک نه تنها از طریق افزایش فعالیت میکروبی بلکه از طریق پایدارسازی آنزیم فسفاتاز در خاک باعث افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود(خادمی و همکاران، ۲۰۰۶). کودهای زیستی منبع غنی مواد آلی، کربن و ... می‌باشند از این رو افزودن کودهای زیستی به خاک سبب می‌شود.

نتیجه‌گیری

استفاده از کودهای زیستی و آلی باعث افزایش فعالیت آنزیمی خاک می‌شود زیرا این کودها به واسطه دارا بودن منبع کربن باعث افزایش جمعیت و فعالیت میکروبی خاک شده در نتیجه تجزیه مواد آلی بهتر صورت گرفته و سوبسترای لازم برای آنزیم‌ها فراهم می‌گردد. فعالیت آنزیم‌های خاک بسته به نوع آنزیم، زمان تماس خاک با کودبیولوژیک و شرایط خاک از جمله مقدار ماده آلی بسیار متفاوت است.

منابع

تاجیک، س.، ایوبی، ش. و نوربخش، ف. ۱۳۹۱. برآورد فعالیت برخی آنزیم های خاک با استفاده از خصوصیات خاک و پستی و بلندی زمین در بخشی از اراضی تپه ماهوری سمیرم استان اصفهان. نشریه آب و خاک(علوم و صنایع کشاورزی)، جلد ۲۶، ۷۶۱-۷۵۳.

علی‌احیایی، م. و بهبهانی‌زاده، ع. ا. ۱۳۷۲. شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. نشریه‌ی مؤسسه‌ی تحقیقات خاک و آب، شماره ۸۹۲.

فرقانی، ا. ۱۳۸۲. تاثیر سه نوع کود آلی کمپوست، ورمی‌کمپوست و لجن فاضلاب بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و فعالیت آنزیم اوره‌آز. همایش ملی علوم آب ، خاک ،گیاه و مکانیزاسیون کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول، دزفول، ایران.

کوچکی، ع.، عالمی، ع.، مهدوی‌دامغانی، م. و تبریزی، ل. ۱۳۸۴. اصول کشاورزی زیستی ارگانیک. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Anita, J., Anita, S., Zsuzsa, K. and Janos, K. 2011. The Effect of alternative methods of nutrient supply on some microbiological characteristics of a Chernozem soil, Analele Universitatii din Oradea. Fascicula Protectia Mediului, 17, 85-90.

Eivazi, J. and Tabatabai, M. A. 1997. Phosphatases in soil. Soil Biol. Biochem, 27, 1011–1016.

Khademi, H., Mohammadi, J. and Nael, M. 2006. Comparison of selected soil quality indicators in different land use management systems in Boroojen, Chaharmahal Bakhtiari province. The scientific Journal of Agriculture, 29, 111-124.

Kourtev, P. S., Ehrenfeld, J. G. and Huang, W. Z. 2002. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hard wood forests of newjersey. soil biology and biochemistry, 34, 1207-1218.

Manna, M. C., Swarup, A., Wanjari, R. H., Mishari, B. and Shahi, D. K. 2007. Long-term fertilization, manure and liming effects on soil organic matter and crop yields. Soil and Tillage Research, 94, 397-409.

Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B. and Grego, S. 2000. Influance of organic and mineral fertilization soil biological and physical properties. Bioresource technology, 72, 9-17.

Martinez, V. A., Crus, L., Ramirezand, D. S. and Alegria, L. P. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. App. Soil Ecol, 35(1), 35-45.

Michael, N. W. and Joshua, P. S. 2003. Interaction between carbon and nitrogen mineralization and soil organic matter chemistry in Arctic Tundra soils. Ecosystems, 23, 129-143

Piotrowska, A., Dlugosz, J., Zamorski, R. and Bogdanowicz, P. 2012. Changes in Soil and Biological Chemical Properties of an Arable Soil Treated with the Microbial Biofertilizer. Journal of Environmental Studies, 21(2), 455-463.

Shi, Z. J., Lu, Y., Xu, Z. G. and Fu, S. L. 2008. Enzyme activities of urban soils under different land use in the Shenzhen city, China. Plant, Soil and Environment, 54, 341-346.

Zantua, M. I. and Bremner, J. M. 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. Soil Biol. Biochem, 7, 291–295.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of biofertilizer on soil enzymes activity

Chahardori[1], E., Rezaei[*2], Sh., Khanmirzaei[2], A

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of biofertilizer on soil enzyme activities (acid phosphatase, alkaline phosphatase and urease). This research was conducted in a completely randomized design with two factors including of biological fertilizer (*Azospirillum)* in two levels: 0(control) and 1wt% and time of incubation (24 and 72 day) with three replicates. The results showed that incubation time and biofertilizer had a significant effect on the activity of acid phosphatase, alkaline phosphatase and urease ($p< 0.01$). Interaction between biofertilizer and incubation of time was significant on the acid phosphatase activity ($p< 0.01$) and alkaline phosphatase and urease activity ($p< 0.05$). increasing time of incubation increased the urease and alkaline phosphatase activity but decreased the acid phosphatase activity. Also, application of biofertilizer increased urease, acid and alkaline phosphatase activity. The soil enzyme activity varied in relation to the enzyme type, the time of incubation and the soil properties.

Keywords: *Azospirillum,* Acid phosphatase, Alkaline phosphatase, Urease

[*] Corresponding author, Email: Rezaee_sh@yahoo.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی فسفاتی و روی در افزایش کیفیت دو رقم لوبیا (Phaseolus vulgaris L.)

محمود محمدی*

استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد کودهای زیستی محتوی فسفر و روی بر کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای لوبیا چیتی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل دو رقم لوبیا چیتی (تلاش و صدری)، چهار سطح فسفر (P_0: شاهد،P_1: مصرف سوپرفسفات تریپل بر اساس آزمون خاک، P_2: مصرف کود زیستی فسفاتی و سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ درصد توصیه بر اساس آزمون خاک و P_3: کود زیستی فسفاتی) و سه سطح روی (Zn_0: شاهد، Zn_1: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات روی وZn_2: کود زیستی روی) بود. نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای بین دو رقم نشان نداد. تیمار فسفر و روی تفاوت معنی‌دار در ویژگی‌های مورد بررسی ایجاد نمودند. کمترین میزان این ویژگی‌ها در تیمار فسفری از تیمار P_2 و در تیمار روی از تیمارهای Zn_1 و Zn_2 به‌دست آمد. اثر متقابل تیمارهای فسفر و روی بر صفات مورد بررسی به‌جز بازدارنده‌های تریپسین معنی‌دار شد. کمترین میزان اسید فیتیک، اسید فنلیک، تانن از تیمار P_2Zn_1 و بازدارنده‌های تریپسین ازتیمار P_2Zn_2 حاصل شد.کودهای زیستی مورد استفاده با افزایش رشد، جذب عناصر غذایی و غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن باعث بهبود کیفیت تغذیه‌ای دو رقم لوبیا چیتی شدند.

کلمات کلیدی: اسید فیتیک،روی، سودوموناس، میکوریزا، تانن

مقدمه

لوبیا (Phaseolus vulgaris L.) از حبوباتی است که با داشتن ۲۵-۲۰ درصد پروتئین ۶۰ درصد کربوهیدرات، ویتامین‌ها، فیبر، آنتی-اکسیدان و ترکیبات آمینواسیدی حاوی آهن و روی اهمیت ویژه‌ای در رژیم غذایی دارد (Fageria & Santos, 2008). کودهای زیستی فرآورده‌های حاوی موجودات زنده کارآمدی هستند که برآیند اثرات متقابلشان با محیط خاک و ریشه موجب جذب عناصر غذایی، افزایش عملکرد، تعدیل اثرات نامطلوب انواع تنش‌های زنده و غیرزنده و بهبود ویژگی‌های خاک می‌گردند (Vessey, 2003). از جمله این کودها می‌توان به کودهای زیستی حاوی قارچ‌های میکوریزی(Marschner & Dell, 1994) و باکتری‌های حل‌کننده اشکال نامحلول فسفر و روی اشاره نمود (Khan et al., 2009؛ Sarathambalm et al., 2010). قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه مثل باکتری Azotobacter و Pseudomonas توان افزایش رشد گیاه و جذب عناصر غذایی، به‌ویژه زمانی که با هم مصرف می‌شوند را دارند (Smith & Read, 2008).

ارزش غذایی لوبیا با وجود یکسری ویژگی‌های نامطلوب تغذیه‌ای کاهش پیدا می‌کند. مهمترین این فاکتورها شامل اسید فیتیک (میو اینوزیتول هگزا فسفات)، اسید فنلیک، تانن، لکتین، فلاونوئیدها و بازدارنده‌های تریپسین می‌باشند (Xu & Chang, 2008). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین میزان جذب فسفر از خاک و غلظت اسید فیتیک و رابطه معکوس بین فراهمی روی در خاک و افزایش مقدار آن در دانه با غلظت اسید-فیتیک وجود دارد (Balakrishnan & Subramanian, 2012). همزیستی میکوریزی از طریق افزایش کلونیزاسیون ریشه، ترشح ترکیبات سیدروفوری، افزایش تولید اسیدهای کلات‌کننده آهن و روی نظیر اسید موجنئیک باعث اسیدی کردن ریزوسفر و آزادسازی روی نامحلول و روی شدید پیوند یافته در کنار انتقال از طریق هیف قارچی می‌گردد و به‌واسطه افزایش میزان روی دانه، غلظت اسید فیتیک کاهش پیدا می‌کند (Subramanian et al. 2009). اسید فنلیک باعث ایجاد طعم نامطلوب، کاهش جذب مواد غذایی، کاهش هضم فیبر و پروتئین می‌شود (Khattab & Arntfield, 2009; Xu & Chang, 2008). این اسید قابلیت ترکیب شدن با دیگر ترکیبات از قبیل کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها را دارد (Xu & Chang, 2008). تحقیقات نشان می‌دهند با مصرف کودهای زیستی در سویا غلظت روی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش و میزان ترکیبات فنلی کاهش پیدا نمود (Hanan et al., 2008). تانن‌ها موادی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که با داشتن تعداد قابل ملاحظه‌ای گروه هیدروکسیل فنلیک پیوند قوی با

*ایمیل نویسنده مسئول: m.mohamadi@areeo.ac.ir

پروتئین، پلی‌ساکاریدها و سایر ماکرومولکولها تشکیل می‌دهند (Aura et al., 2010). بازدارنده‌های تریپسین از شناخته‌ترین مواد بازدارنده پروتئازها می‌باشند. و حضور آن‌ها در رژیم غذایی منجر به تشکیل کمپلکس غیرقابل‌برگشت آنزیم تریپسین– بازدارنده تریپسین می‌گردد. این کمپلکس باعث کاهش تریپسین در روده و کاهش قابلیت هضم پروتئین موجود در رژیم غذایی می‌شود (Gupta et al., 2000). بازدارنده‌های تریپسین موجود در لگوم‌ها مانع هیدرولیز پروتئین به آمینواسید شده و به‌خصوص هنگامی‌که لگوم‌ها پخته می‌شوند دارای اثرات مخربی هستند. این بازدارنده‌های به میزان معنی‌داری باعث کاهش قابلیت هضم و استفاده از اسیدهای آمینه می‌شوند (Khattab & Arntfield, 2009). روش‌های مختلفی از قبیل حرارت‌دهی، خیساندن در آب، جوشاندن و جوانه دار کردن برای از بین بردن ترکیبات ضدتغذیه‌ای استفاده می‌شود که همگی درمراحل بعد از برداشت محصول می‌باشد. اما بر روش‌های زراعی و زیستی کاهش‌دهنده این صفات قبل از برداشت محصول تحقیقات چندانی صورت نگرفته است. با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت موضوع، این تحقیق در راستای افزایش عملکرد کمی و کیفی لوبیا با هدف بررسی اثرات کاربرد کودهای زیستی فسفاتی و روی در مقیاس مزرعه‌ای بر کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دو رقم لوبیا چیتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در اراضی لوبیا کاری بخش کیار استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از فاکتور اول ارقام لوبیا چیتی شامل C1: تلاش و C2: صدری، فاکتور دوم کاربرد فسفر در چهار سطح P0: شاهد، P1: استفاده از کود شیمیائی سوپر فسفات تریپل بر اساس آزمون خاک ، P2: استفاده از کود زیستی فسفاتی و مصرف ۵۰ درصد کود سوپر فسفات تریپل بر اساس آزمون خاک و P3: استفاده از کود زیستی فسفاتی، فاکتور سوم کاربرد روی در سه سطح شامل Zn0: شاهد، Zn1: استفاده از کود شیمیایی سولفات روی مطابق آزمون خاک و Zn2: استفاده از کود زیستی حاوی روی بود. تیمار کود زیستی فسفاتی مورد استفاده شامل مایه تلقیح حاوی باکتری حل‌کننده فسفات از جنس Azotobacter chroococcum strain 5 و سه گونه قارچ میکوریزا Glomus etunicatum، Glomus intraradices و Glomus mosseae بود. کود زیستی روی حاوی باکتری‌هایی از جنس Pseudomonas aeruginosa strain MPFM و Pseudomonas fluorescens strain 187 بود. کشت محصول به‌صورت خطی انجام گرفت. در طول فصل رشد مراقبت‌های زراعی لازم شامل آبیاری، مبارزه با علف‌های هرز، آفات و بیماری‌ها به‌طور یکنواخت برای همه تیمارها اعمال شد. در پایان فصل رشد برداشت محصول انجام و پس از اندازه‌گیری عملکرد، میزان خصوصیات کیفی نامطلوب شامل اسید فیتیک، اسید فنلیک، تانن و بازدارنده‌های تریپسین اندازه‌گیری شدند و داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

اسید فیتیک: در این آزمایش، اختلاف معنی‌داری در میزان اسید فیتیک در دو رقم مورد استفاده مشاهده نشد (جدول ۱). مقدار اسید فیتیک در رقم تلاش و صدری به‌ترتیب ۴/۵۶ و ۵/۴۶ گرم در کیلوگرم بود که این میزان در رقم صدری ۲۰ درصد بیشتر از رقم تلاش شد (جدول ۲). تیمار فسفری بر میزان اسید فیتیک تأثیر معنی‌دار داشت. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد، بیشترین میزان اسید فیتیک در نتیجه کاربرد تیمارP1 به میزان ۵/۷۵ گرم در کیلوگرم به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۱۷ درصد افزایش را نشان داد. در این آزمایش با مصرف کودهای شیمیایی فسفاتی، فسفر دانه و میزان اسید فیتیک افزایش پیدا می‌کند. تیمار روی باعث تفاوت معنی‌دار بر میزان اسید فیتیک دانه شد (جدول ۱). کمترین میزان اسید فیتیک از تیمارZn2 به‌میزان ۴/۹۲ گرم در کیلوگرم بدست آمد که با Zn1 در یک گروه مشترک آماری قرار گرفتند و نسبت به تیمار شاهد (Zn0) ۱۳ درصد کاهش را نشان داد (جدول ۲). از بین اثرات متقابل، اثرات متقابل فسفر با روی و رقم با روی بر میزان اسید فیتیک معنی‌دار شدند (جدول ۱). کمترین میزان اسید فیتیک از P2Zn1 به‌میزان ۳/۹۰ گرم در کیلوگرم بدست آمد که در مقایسه با تیمار P1Zn0 با ۶/۶۶ گرم در کیلوگرم اسید فیتیک، ۴۲ درصد کاهش را نشان داد.. در خصوص اثر متقابل رقم با روی بیشترین و کمترین میزان اسید فیتیک از تیمارهای C2Zn0 و C1Zn1 به‌ترتیب به‌میزان ۵/۹۲ و ۴/۱۰ گرم در کیلوگرم بدست آمد. در این تحقیق کاهش مقدار اسید فیتیک دانه به دلیل افزایش میزان روی دانه با مصرف کود شیمیایی سولفات روی (تیمار Zn1) و آزادسازی و افزایش جذب روی با مصرف تیمار زیستی روی (تیمار Zn2) می‌باشد. این نتیجه با نتایج تحقیقات Balakrishnan & Subramanian (2012) مطابقت دارد. باکتری‌های حل‌کننده روی توانایی انحلال روی را از منابع نامحلول و کم‌محلول روی

توسط مکانیسم‌های مختلفی از قبیل افزایش میزان پروتون و کاهش pH، تولید اسیدهای آلی مانند اسید گلوکونیک و مخصوصاً اسید دوکتوگلوکونیک و ترشح مواد کلات‌کننده و سیدروفور، تولید اسیدهای معدنی مانند اسیدسولفوریک، نیتریک و کربنیک و تولید هورمون اکسین به‌صورت محلول دارا می‌باشند (Abbaszade et al., 2012 ;Shahab & Ahmed, 2008 ;Marschner & Dell, 1994).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر استفاده از کودهای زیستی فسفاتی و روی بر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دو رقم لوبیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		اسید فیتیک	اسید فنلیک	تانن	بازدارنده‌های تریپسین
رقم	۱	۱۴/۴^{ns}	۰/۷۵^{ns}	۰/۱^{ns}	۰/۳^{ns}
تکرار (رقم)	۴	۴/۱	۲۰	۸	۲۲/۸
فسفر	۳	۶*	۲۰**	۱۶**	۱۰/۷**
روی	۲	۰/۱۴**	۷/۶**	۷**	۹/۳**
فسفر × روی	۶	۳/۷*	۲/۸*	۱/۷*	۰/۷^{ns}
رقم × فسفر	۳	۲/۱^{ns}	۰/۴^{ns}	۰/۳^{ns}	۰/۲^{ns}
رقم × روی	۲	۱۸/۷**	۳*	۲^{ns}	۰/۱^{ns}
رقم × فسفر × روی	۶	۳^{ns}	۱/۶^{ns}	۲*	۰/۸^{ns}
خطا	۴	۱/۶	۰/۸	۰/۷	۰/۴
کل	۷۱				
ضریب تغییرات (٪)		۴/۸	۱۲/۷	۱۱	۹/۵

^{ns} و * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ پنج و یک درصد.

اسید فنلیک: طبق نتایج جدول تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در میانگین غلظت اسید فنلیک در ارقام مورد مطالعه مشاهده نگردید (جدول ۱). مقدار این اسید در رقم تلاش۵/۶۷ و در رقم صدری۵/۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه بود (جدول ۲). میزان اسید فنلیک در رقم صدری ۴/۵ درصد کمتر از رقم تلاش بود. تیمار فسفری باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در مقداراسید فنلیک شد، به‌طوری‌که کمترین مقدار از تیمار P_2 به‌میزان ۴/۲۸ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه به‌دست آمد که در مقایسه باتیمار شاهد، ۳۵ درصد کاهش را نشان داد (جدول ۲). تیمار روی بر این ویژگی در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. کمترین مقداراسید فنلیک به‌میزان ۵ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه از تیمار Zn2 حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد (Zn_0) با ۶/۱۸ میلی‌گرم اسید گالیک ۲۴ درصد کاهش را نشان داد (جدول ۲). اثر متقابل تیمارهای فسفر با روی بر این صفت معنی‌دار شد ($P \leq$۰/۰۵) (جدول ۱). حداقل مقدار این صفت از تیمار P_2Zn_1 به میزان ۳/۱۳ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم دانه به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد، ۱۲۷ درصد کاهش را نشان داد. این کاهش در اسید فنلیک از تیمار Zn_2 می‌تواند ناشی از آزادسازی روی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های آزاد کننده روی باشد (Abbaszade et al., 2012 ;Shahab & Ahmed, 2008 ;Marschner & Dell, 1994). اسید فنلیک به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلی با کاتیون‌های دو ظرفیتی عمدتاً آهن و روی تشکیل کلات داده و منجر به کاهش قابلیت دسترسی به این عناصر می‌گردند و با کاهش غلظت و آهن در دانه، غلظت اسید فنلیک افزایش پیدا می‌کند (Hanan et al., 2008; Cárdenas et al., 2010). افزایش جذب آهن و روی دردانه در اثر استفاده از کودهای زیستی فسفاتی در نتایج تحقیقات متعددی گزارش شده است (Subramanian et al., 2009; Sarathambalm ;et al., 2010 ; Mohammadi et al., 2015). این افزایش می‌تواند ناشی از انتقال توسط هیف قارچی، اسیدی شدن ریزوسفر، تولید سیدروفورهای آهن و روی و بهبود شرایط کلات نمودن و افزایش فراهمی این دو عنصر باشد. باکتری‌های سودوموناس می‌توانند با ترشح سیدروفورها، هورمون‌های گیاهی، ترکیبات با وزن ملکولی پایین و برخی آنزیم‌ها به افزایش جذب آهن و روی در دانه کمک می‌کنند (Abbaszade et al., 2012 ;Shahab & Ahmed, 2008 ;Sarathambalm et al., 2010). کاهش نسبی در غلظت اسید فنلیک در نتیجه کاربرد تیمارهای زیستی حاوی روی، می‌تواند به‌دلیل نقش آن‌ها در افزایش رشد گیاه و بهبود شرایط غنی‌سازی زیستی عناصر غذایی کاهش‌دهنده ترکیبات فنلی مانند آهن و روی باشد. در این تحقیق با افزایش غلظت آهن و روی در دانه غلظت اسید فنلیک کاهش یافت.

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای فسفری و روی بر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دانه دو رقم لوبیا چیتی

رقم	اسید فیتیک	اسید فنلیک	تانن	بازدارنده‌های تریپسین
	گرم در کیلوگرم	میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه		میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه
C1- تلاش	۴/۵۶a	۵/۶۷a	۴/۳۴a	۶/۶۰a
C2-صدری	۵/۴۶a	۵/۴۷a	۴/۴۲a	۶/۴۷a
P0	۴/۹۱ab	۶/۵۷a	۵/۲۸a	۷/۲۴a
P1	۵/۷۵a	۶/۲۹a	۵ ba	۶/۹۱ab
P2	۴/۳۵b	۴/۲۸c	۳/۲۸c	۵/۴۶b
P3	۵/۰۴b	۵/۱۵b	۳/۹۱b	۶/۵۲b
Zn0	۵/۶۸a	۶/۱۸a	۴/۹۴a	۷/۲۴a
Zn1	۵/۰۷b	۵/۴۷b	۴/۳۲b	۶/۳۰b
Zn2	۴/۹۲b	۵b	۳/۸۷b	۶/۱۰b

در هر ستون میانگین‌هایی که در هر قسمت حداقل در یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تانن: بین دو رقم استفاده شده در این تحقیق اختلاف معنی‌داری در غلظت تانن مشاهده نشد (جدول ۱). میزان تانن در رقم تلاش و صدری ۴/۳ و ۴/۴ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه بود (جدول۲). اثرات تیمار فسفر، روی و اثر متقابل رقم در فسفر و رقم در روی در سطح یک درصد و اثرات متقابل فسفر در روی و رقم در فسفر در روی در سطح ۵ درصد بر این صفت معنی‌دار شدند (جدول۱). تیمار فسفر باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در مقدار تانن شد، به‌طوری‌که حداقل مقدار تانن از تیمار P_2 به میزان۳/۳ به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد، ۳۷/۷ درصد کاهش را نشان داد (جدول۲). کمترین مقدار تانن به‌میزان ۳/۸۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه از تیمار Zn_2 به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۲۲ درصد کاهش داشت (جدول۲). حداقل مقدار تانن در نتیجه کاربرد تیمار P_2Zn_1 به‌میزان ۲/۴۵ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۵۷ درصد کاهش را نشان داد. تانن موجود در لوبیا به‌صورت تانن متراکم می‌باشد. تانن متراکم میل بالایی برای ترکیب با پروتئین از طریق پیوند هیدروژنی دارد و باعث رسوب آنزیم‌های میکروبی و هضمی می‌شود (Aura et al., 2010). غنی‌سازی زیستی باعث افزایش غلظت عناصر غذایی در لوبیا شده و با افزایش عناصر غذایی مانند آهن و روی منجر به کاهش فاکتورهای ضد تغذیه‌ای از قبیل تانن‌ها، فیتازها واکسالات‌ها شده و از این طریق فراهمی عناصرغذایی را برای مصرف کننده افزایش می‌دهند (Welch, 2002). تیمارهای زیستی استفاده شده در این تحقیق علاوه بر جذب آب، مواد غذایی، بهبود رشد و عملکرد کمی و کیفی گیاه توانستند از طریق افزایش جذب و فرآهمی عناصر آهن و روی به‌طور غیر مستقیم غلظت تانن را کاهش داده و از این طریق بر افزایش کیفیت لوبیا و کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای تأثیر گذاشتند.

بازدارنده‌های تریپسین: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که میانگین غلظت بازدارنده‌های تریپسین در دو رقم تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). مقدار این بازدارنده در رقم تلاش ۶/۶ و در رقم صدری ۶/۴ میلی‌گرم واحد تریپسین در گرم دانه بود (جدول ۲). تیمار فسفری باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در روی در سطح یک درصد در مقدار این صفت شد، به‌طوری‌که کمترین میزان از تیمار P_2 به‌میزان ۵/۴۶ میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه به‌دست آمد که در مقایسه باتیمار شاهد ۲۵ درصد کاهش را نشان داد (جدول ۲). تیمار روی بر این ویژگی در سطح یک درصد معنی‌دار شد. کمترین مقدار بازدارنده تریپسین در نتیجه کاربرد تیمار Zn_2 به میزان ۶/۱ میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه حاصل شد (جدول ۲). این کاهش در میزان بازدارنده تریپسین در نتیجه تأثیر تیمارZn_1 ناشی از افزایش جذب روی دانه با تأمین روی مورد نیاز گیاه از طریق افزودن کود سولفات روی به خاک و در تیمار Zn_2 ناشی از آزادسازی روی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های آزاد کننده روی بود. اثر متقابل مصرف تیمارهای فسفر و روی بر این خصوصیت معنی‌دار نگردید. مقایسه میانگین‌ها نشان داد، کمترین مقدار بازدارنده از تیمار P_2Zn_2 به‌میزان ۴/۷ میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه حاصل شد که نسبت به شاهد ۴۱ درصد کاهش را نشان داد. مصرف کود شیمیایی فسفاتی باعث افزایش میزان فسفر دانه و به دلیل اثر رقابتی فسفر با عناصر آهن و روی باعث کاهش مقدار این عناصر و افزایش مقدار بازدارنده تریپسین می‌گردد. اما در تیمارهائی‌که مقدار روی و آهن افزایش می‌یابد میزان بازدارنده تریپسین

کاهش پیدا می‌کند (Cárdenas et al. 2010 ;Khattab &Arntfield, 2009). میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در تیمارهای کودهای زیستی فسفاتی و روی می‌توانند از طریق همزیستی میکوریزی و افزایش کلونیزاسیون ریشه (Khan et al., 2009)، ترشح ترکیبات سیدروفوری و تولید اسیدهای آلی و کلات‌کننده (Sarathambalm et al., 2010 ; Abbas-Zade et al., 2012) باعث افزایش فرآهمی و جذب عناصر غذایی فسفر، نیتروژن، آهن و روی برای گیاه شدند. همچنین ترشح هورمون‌های گیاهی و آنزیم‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه با کاربرد این تیمارها افزایش پیدا خواهد نمود. غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند می‌تواند به‌طور غیر مستقیم باعث کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای و افزایش کیفیت و ارزش غذایی در دو رقم لوبیا مورد مطالعه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد کودهای زیستی فسفاتی و روی به‌طور جداگانه و یا به‌صورت ترکیبی سبب کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب در دو رقم لوبیا چیتی مورد مطالعه شدند. با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در تیمارهای زیستی می‌توانند از طریق همزیستی میکوریزی و افزایش کلونیزاسیون ریشه، ترشح ترکیبات سیدروفوری و تولید اسیدهای کلات‌کننده باعث افزایش فرآهمی و جذب عناصر غذایی فسفر، نیتروژن، آهن و روی برای گیاه شوند. غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند به‌طور غیر مستقیم می‌تواند باعث کاهش مقدار اسید فیتیک و دیگر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در لوبیا شود. در شرایط این تحقیق بهترین تیمار استفاده از مایه تلقیح Azotobacter و قارچ‌های میکوریزی به همراه مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سوپرفسفات تریپل و ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات روی (تیمار P2Zn1) بود.

منابع

Balakrishnan, N., and Subramanian, K. 2012. Mycorrhizal symbiosis and bioavailability of micronutrients in maize grain. Mydica Journal 57: 129-138.

Cárdenas, L.A., Leonel, J., Costa, M.B., and Reis, F.P. 2010. Zinc bioavailability in different bean as affected by cultivar type and cooking conditions. Journal of Food Research 43: 573-581.

Fageria, N.K., and Santos, A.B. 2008. Yield physiology of dry Bean. Journal of Plant Nutrition 31: 983: 1004.

Gupta, P., Dhawan, K., Malhotra, S.P, and Singh, R. 2000. Purification and characterization of trypsin inhibitor from seeds of faba bean (Vicia faba L.). Journal of Acta Physiologiae Plantarum 22: 433-438.

Hanan, A., Taie, A., El-Mergawi, R., and. Radwan, S. 2008. Isoflavonoids, Flavonoids, Phenolic Acids Profiles and Antioxidant Activity of Soybean Seeds as Affected by Organic and Bioorganic Fertilization. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environment. Science 4: 207-213.

Khan, A.A., Jilani, G. Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., and Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. Journal of Agriculture and Biology Science 1:48-58.

Khattab, R.Y., and Arntfield, SD. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. Journal of Food Science and Technology 42: 1113–1118.

Marschner, H., and Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Journal of Plant and Soil 159: 89 – 102.

Smith, S.E., and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, London. UK.

Sarathambalm, C., Thangaraju, M., Paulraj, C., and Gomathy, M. 2010. Assessing the Zinc solubilization ability of Gluconacetobacter diazotrophicus in maize rhizosphere using 65labelled Zn compounds. Indian J. Microbiol 50 (1):103-109.

Subramanian, K.S., Tenshia, V., Jayalakhshmi, K., and Ramachandran, V. 2009. Role of arbuscular mycorrhizal fungus (Glomus intraradices) - (fungus aided) in zinc nutrition of maize. Journal of Agriculture Biotechnology Sustainable Development 1: 029-038.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of phosphate and zinc chemical and biological fertilizers on quality increase of two cultivars of bean (Phaseolus vulgaris L)

Mohammadi*, M.,

Assistant Professor, Chaharmahal and Bakhtiari Agricultural and Natural Resources Research and Education Center; Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shahrekord, Iran

Abstract

In order to study the effect of using Phosphate (P) and Zinc (Zn) biofertilizers on decrease of antinutritional factors of bean, an experiment was conducted as a factorial based on a randomized complete block design. The treatments of this research consisted of two cultivars of Chiti bean (Talash and Sadri), four levels of P (P_0: Control, P_1: Chemical fertilizer on the basis of soil test, P_2: 50 percent of recommended P + bio-fertilizer (P), and P_3: bio-fertilizer (P)), three levels of Zn (Zn_0: Control, Zn_1: 50 kg ha-1 Zinc sulphate, and Zn_2: bio-fertilizer (Zn)). The results of analysis variance showed that there weren't significant difference between two cultivars on studying factors. The effect of P and Zn treatment was significant on studying parameters. The least of studying factors was obtained from P_2, Zn_1 and Zn_2. The interaction effect of P and Zn was significant on these antinutritional factors except the trypsin inhibitors. The least rate of PA, phenolic acid, tannin were obtained from P_2Zn_1 and trypsin from P_2Zn_2. Application of bio fertilizers in this study caused to improve nutritional quality of two cultivars of bean with increase of growth and nutrient uptake and seed bioenrichment with iron (Fe) and Zn.

Keywords: Phytic acid, Zinc, Pseudomonas, Mycchorizae, Tannin

* Corresponding author, Email: m.mohamadi@areeo.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی مقاومت به خشکی جدایه‌های محرک رشد گیاهی قارچ‌های *تریکودرما* جهت استفاده به عنوان یک کود بیولوژیک مناسب در مناطق گرم و خشک

هاجره تب[۱]، پیمان عباس‌زاده دهجی*[۲]، حسین علایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

[۲] استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

[۳] دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استفاده از قارچ‌های تریکودرمای مقاوم به خشکی یک راهبرد موثر برای تسهیل رشد گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد. بدین منظور تعداد ۴۳ جدایه قارچ از آزمایشگاه بیماری بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه و میزان مقاومت آنها به خشکی اندازه‌گیری گردید. جهت بررسی مقاومت به خشکی جدایه‌های مختلف از محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (PDB) با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول[۱] (PEG) که به ترتیب حدود پتانسیل‌های معادل ۰، ۵-، ۱۰-، ۲۰-، ۳۰- بار بود استفاده شد. نتایج نشان داد که مقاومت هریک از جدایه‌های قارچ *تریکودرما* در هر سطح خشکی با یکدیگر متفاوت بود. نتایج حاکی از آن بود که در سطح ۱۰ درصد PEG جدایه T_{11} با داشتن ۹۵ درصد رشد بیشترین میزان رشد در این سطح خشکی را در مقایسه با شاهد (بدون استفاده از PEG) به خود اختصاص داد و مقاوم‌ترین جدایه در این سطح خشکی شناسایی شد. کمترین مقاومت به خشکی در سطح ۱۰ درصد PEG مربوط به T_{36} با ۵۳/۵ درصد رشد بود و حساس‌ترین جدایه نسبت به تنش خشکی در این سطح شناخته شد. در سطح ۲۰ درصد PEG جدایه‌های T_{41} و T_{34} به ترتیب با ۸۹/۸ و ۸۹/۴ درصد رشد بیشترین مقاومت به خشکی را به خود اختصاص دادند و هم‌چنین جدایه‌های T_{16} و T_{36} در این سطح رشد نکردند. در سطح ۳۰ درصد PEG بیشترین مقاومت به خشکی مربوط به جدایه T_{28} با ۷۷/۲ درصد رشد بود و کمترین مقاومت مربوط به جدایه‌های T_4 و T_{15} و T_{16} و T_{36} بود که رشدی نداشتند. در سطح ۴۰ درصد PEG هم بیشترین مقاومت به خشکی مربوط به جدایه T_{28} با ۷۰/۸ درصد رشد در مقایسه با شاهد بود و کمترین مقاومت هم مربوط به T_4 و T_{15} و T_{16} و T_{26} و T_{36} بود که در این سطح رشد نکردند. این آزمایش هم‌چنین نشان داد که دو جدایه T_{28} و T_{30} به تمام سطوح خشکی مقاومت قابل توجهی نشان دادند. لذا با توجه به نتایج این تحقیق و با شناسایی و بررسی صفات محرک رشدی این جدایه‌ها، می‌توان از جدایه‌های برتر به‌عنوان کود بیولوژیک با انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در شرایط تنش خشکی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پوتیتو دکستروز براث، پلی‌اتیلن گلیکول، تنش خشکی، *تریکودرما*

مقدمه

شرایط نامساعد محیطی از جمله خشک‌سالی مهم‌ترین و رایج‌ترین تنش محیطی است که هر ساله خسارت‌های هنگفتی به محصولات کشاورزی در جهان به‌خصوص ایران که به عنوان کشوری خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود، وارد می‌نماید. در ایران خشکی و کم‌آبی همواره یکی از مهم‌ترین مسائل و مشکلات کشاورزی بوده به‌طوری‌که کشور ما با متوسط نزولات آسمانی معادل ۲۴۰ میلی‌متر در زمره‌ی مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا طبقه‌بندی می‌شود (Modarrees و همکاران، ۲۰۰۷). تنش خشکی رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار داده که باعث کاهش تعرق، هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز و جذب آب توسط سیستم ریشه‌ای و به‌هم‌خوردن موازنه‌ی هورمونی در گیاه می‌گردد (Khalafallah و همکاران ۲۰۰۸). به طور میانگین بیش از ۵۰ درصد عملکرد بسیاری از محصولات گیاهی در اثر تنش خشکی کاهش می‌یابد (Zlatev و همکاران، ۲۰۱۲). ضرورت افزایش عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی منجر به استفاده بیش از حد کودهای شیمیایی شده که آلودگی‌های زیست محیطی جدی را ایجاد کرده است. استفاده از عوامل بیولوژیک که در بهبود استفاده از عناصر غذایی موجود در خاک و تحریک رشد گیاهی نقش دارند جانشین مناسبی

* ایمیل نویسنده مسئول: P.abbaszadeh@vru.ac.ir

[1] Polyethylene glycol

برای افزایش تولید با کم‌ترین اثرات اکولوژیکی می‌باشد (Hermosa و همکاران، ۲۰۱۲). بدون تردید کاربرد کودهای بیولوژیک علاوه بر اثرات مثبتی که بر خصوصیات خاک دارند، از جنبه‌های اقتصادی، زیست‌محیطی و اجتماعی نیز مثمر ثمر هستند و می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای کودهای شیمیایی باشند. در حال حاضر نگرش‌های جدیدی که در ارتباط با کشاورزی تحت عنوان کشاورزی پایدار، ارگانیک و بیولوژیک مطرح است بر مبنای بهره‌برداری از چنین منابعی استوار است (Saleh Rastin، ۲۰۰۱). یکی از راه‌های بیولوژیک افزایش رشد گیاهان در تنش خشکی استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌های مایکوریز، ریزوبیوم‌ها، ریزوباکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت است که در افزایش رشد گیاه و تعدیل فرآیندهای فیزیولوژیکی نقش مهمی بازی می‌کنند (Ali و همکاران، ۲۰۱۴). *تریکودرما* قارچی است که در ریزوسفر و بسیار نزدیک به ریشه‌های گیاهان یافت می‌شود. کلنیزاسیون گیاهان با قارچ *تریکودرما* سرعت توسعه، افزایش عملکرد و تحمل به شرایط تنش‌های مختلف را در گیاهان فراهم می‌کند (Hashem و همکاران، ۲۰۱۴). این قارچ از طریق مکانیسم‌های مختلفی بر رشد گیاهان تاثیر می‌گذارد و با فعالیت‌های زیستی که در خاک انجام می‌دهد می‌تواند باعث افزایش معدنی شدن عناصر و به‌تبع آن افزایش طول ریشه و تعداد ریشه‌های مویین برای اشغال کردن بیشتر فضای خاک برای جذب عناصر شود. همچنین این قارچ‌ها می‌توانند با تولید عوامل کلات‌کننده آهن مانند سیدروفور و عوامل کنترل کننده پاتوژن‌های گیاهی مانند سیانید هیدروژن باعث افزایش رشد گیاه شوند (Zang و همکاران، ۲۰۱۳). توان ترشح آنزیم‌های مختلف خارج سلولی در خاک، توان بالای کلنیزاسیون فراریشه، قدرت همزیستی در ریشه، توان اسپورزایی زیاد، تحمل به تنش و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه از خصوصیات مهم گونه‌های مختلف جنس *تریکودرما* به حساب می‌آید (Harman و همکاران، ۲۰۰۴).

تریکودرما نقش مهمی در آزاد کردن بعضی از متابولیت‌ها مثل فیتوهورمون‌ها دارند که باعث افزایش رشد گیاه تحت تنش خشکی می‌شود (Chepsergon و همکاران، ۲۰۱۴). گونه‌های مختلف *تریکودرما* علاوه بر تولید اکسین، توانایی تولید اسیدهای‌آلی مانند اسیدگلوکونیک، سیتریک و فوماریک را نیز دارند و این قارچ‌ها می‌توانند با تولید این اسیدهای آلی و کاهش pH خاک، فسفات و برخی عناصر مانند آهن، منیزیم و منگنز را به فرم قابل جذب درآورده تا به آسانی در اختیار گیاه قرار گیرند (Benitez و همکاران، ۲۰۰۴). *تریکودرما* با چندین مکانیسم شامل افزایش جذب عناصرغذایی (Harman و همکاران، ۲۰۰۴)، بهبود رشد ریشه، افزایش ظرفیت نگهداری آب در گیاه و ایجاد سازگاری مورفولوژیکی در گیاه (Doni و همکاران ۲۰۱۴)، تولید اکسین و سیدروفور و افزایش رشد ریشه (Rawat و همکاران، ۲۰۱۱)، بیان پروتئین‌های دفاعی در گیاه (Thakur و همکاران، ۲۰۱۳)، حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر (Sara-vanakumar و همکاران، ۲۰۱۳) و حفاظت آنتی‌اکسیدانی گیاه علیه خسارت ناشی از کمبود آب (Brotman و همکاران، ۲۰۱۳) می‌تواند رشد گیاه در شرایط خشکی را افزایش دهد.

گزارش شده که مایه‌کوبی فلفل با سویهٔ *T. harzianum* T203 سبب بهبود شاخص‌های رشدی ارتفاع گیاه، طول ریشه و وزن خشک گیاه به ترتیب به میزان ۲۳، ۴۷ و ۲۸ درصد شد و گیاهان مایه‌کوبی شده نسبت به گروه شاهد رشد بهتر، قوی‌تر و کلروفیل بالاتری داشتند (Joshi و همکاران، ۲۰۱۰). Mona و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که تنش خشکی باعث کاهش سطح هورمون‌هایی مانند اکسین و جیبرلین در گیاه گوجه‌فرنگی گردید و تلقیح قارچ *T. harzianum* به گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی باعث افزایش ۴۰/۰، ۳۸/۵ و ۲۷/۰ درصدی غلظت اکسین، جیبرلین و دیگر فیتوهورمون‌ها تحت تنش خشکی شد. Mastouri و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با قارچ *T. harzianum* باعث کاهش تنش خشکی در این گیاه شد. این محققین افزایش رشد در این گیاه را به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل استفاده از قارچ *تریکودرما* نسبت دادند. *تریکودرما* در شرایط تنش خشکی باعث افزایش کلروپلاست و افزایش کارایی فتوسنتز شده و هم‌چنین می‌تواند باعث کاهش خسارت آنیون‌های سوپراکسید و دیگر گونه‌های فعال که در فتوسنتز حضور دارند، شود (Mastouri و همکاران، ۲۰۱۰). *تریکودرما* از طریق افزایش آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسیددسموتاز و پراکسیداز سبب افزایش تحمل به خشکی می‌گردد (Shoresh و همکاران، ۲۰۰۸)

بنابراین با توجه به نقش این قارچ‌های محرک رشد گیاه در افزایش مقاومت به شرایط تنش خشکی و تحریک رشد در این شرایط از آن می‌توان به عنوان یک روش بیولوژیک، مفید و سالم برای افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش خشکی استفاده کرد. بدین منظور مقاومت به خشکی ۴۳ جدایه *تریکودرمای* محرک رشد گیاه به‌منظور انتخاب چند جدایه مقاوم به خشکی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی میزان تحمل جدایه‌ها به سطوح مختلف خشکی، ۴۳ جدایه از قارچ *تریکودرما* که قبلا صفات محرک رشدی آنها اندازه‌گیری شده بود از بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان تهیه گردید. محیط کشت PDB[2]با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG) (به ازای هر لیتر محیط کشت PDB) تهیه شد که به ترتیب پتانسیل‌های آبی ۰، ۵-، ۱۰-، ۲۰- و ۳۰- بار را ایجاد می‌کند. توان رشد قارچ‌ها با اندازه‌گیری میزان وزن خشک اسپور و میسلیوم تولید شده توسط قارچ‌ها بعد از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و درصد رشد قارچ در شرایط سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول در مقایسه با کنترل (بدون پلی‌اتیلن گلیکول) محاسبه گردید (Asghar و همکاران، ۲۰۱۵). این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزارSAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. جدول‌ها با استفاده از برنامه‌های Word ارائه شد.

نتایج و بحث

در جدول تجزیه واریانس، تاثیر تنش‌های خشکی در سطوح مختلف برروی جدایه‌های قارچ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تاثیر هر چهار سطح خشکی بر درصد رشد جدایه‌های قارچ در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس تاثیر درصدهای مختلف PEG بر درصد رشد جدایه‌های قارچی در مقایسه با شاهد (بدون PEG)

منابع تغییرات	درجه آزادی	۱۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۴۰٪
قارچ	۴۲	۳۳۶**	۴۰۴**	۴۴۵**	۵۳۷**
خطا	۸۶	۳۸/۷	۳۷/۰	۲۹/۸	۲۰/۱
ضریب تغییرات		۷/۹۸	۹/۴۲	۱۰/۴	۱۰/۱

** نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن

همانطورکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اکثر جدایه‌ها تا۴۰٪ تنش خشکی را تحمل نموده و رشد کرده‌اند. براساس نتایج بیشترین مقاومت به خشکی مربوط به جدایه T_{28} در سطح ۴۰ درصد PEG با ۷۰/۸ درصد رشد در مقایسه با شاهد (بدون استفاده از PEG) می‌باشد. پس از آن جدایه‌های T_{30}، T_{34} و T_{21} به ترتیب با ۶۷/۱، ۶۵/۴ و ۶۳/۷ درصد رشد در مقایسه با شاهد، بیشترین مقاومت به تنش خشکی را در سطح ۴۰ درصد خشکی داشتند. کمترین مقاومت در این سطح مربوط به جدایه‌های T_4، T_{15}، T_{16}، T_{26} و T_{36} بود که در این سطح خشکی رشد نکردند. در سطح ۳۰ درصد PEG بیشترین رشد مربوط به جدایه T_{28} با ۷۷/۲ درصد رشد بود. جدایه‌های T_4، T_{15}، T_{16} و T_{36} در این سطح خشکی رشد نکردند. در سطح ۲۰ درصد PEG جدایه‌های T_{41} و T_{34} به ترتیب با ۸۹/۸ و ۸۹/۴ درصد رشد در مقایسه با شاهد بیشترین مقاومت را نشان دادند. جدایه‌های T_{40} و T_{30} به‌ترتیب با ۷۹/۳ و ۷۹/۸ درصد رشد در مقایسه با شاهد در رتبه سوم و چهارم مقاوم به خشکی بودند. همچنین جدایه‌های T_{15}، T_{16} و T_{36} در این سطح رشدی نداشتند. در سطح ۱۰ درصد PEG بیشترین مقاومت به خشکی را T_{11} با ۹۵ درصد رشد در مقایسه با شاهد به خود اختصاص داد. همچنین جدایه‌های T_{23}، T_{26}، T_{34}، T_{35}، T_{41}، T_{40}، T_{31}، T_{28}، T_{24} و T_{15} در سطح ۱۰ درصد PEG رشدشان در مقایسه با شاهد بیش

[2] Potato Dextrose Broth

از ۸۰ درصد بود. Daniel و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند قارچ *تریکودرما* باعث کاهش تنش محیطی و بالا بردن مقاومت به استرس خشکی در گیاه از طریق افزایش نفوذپذیری ریشه در پروفیل خاک می‌شود. انتخاب جدایه‌های مقاوم به خشکی یکی از مهمترین عواملی است که در کاربرد قارچ‌های *تریکودرما* در شرایط خشکی باید درنظر گرفت. قارچ‌های *تریکودرما* می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی باعث افزایش رشد گیاهان شوند. این مکانیسم‌ها شامل ساخت فیتوهورمون‌ها، افزایش دسترسی گیاه به فسفر را از طریق تجزیه‌ی آنزیمی و غیر آنزیمی فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی، گسترش سیستم ریشه‌ای، فعالیت‌های آنزیمی چون ACC-دآمیناز، افزایش گره‌زایی و تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی می‌باشد (Antoun و همکاران، ۲۰۰۱). در گیاهان برنج تلقیح شده با *Trichoderma harzianum* t35 تحمل به خشکی، فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان، سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربیک اسید پراکسیداز (APX) افزایش یافت و از این راه از آسیب اکسیداتیو برنج با حذف سریع اکسیژن فعال (ROS) جلوگیری به‌عمل آمد (Gusain و همکاران، ۲۰۱۴). تلقیح گیاهان با *تریکودرما* در شرایط تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش طول ساقه، طول ریشه، مقدار پرولین و پروتئین در گیاه شود (Mona و همکاران، ۲۰۱۷). زمانی‌که گیاهان در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، مقدار ROS در گیاه افزایش می‌یابد و به حد سمی می‌رسد (Mittler، ۲۰۰۲). در این شرایط قارچ *تریکودرما* می‌تواند غلظت ROS را از طریق بیان ژن‌های ترکیب دهنده‌ی آنزیم‌ها کاهش دهد (Chepsergon و همکاران، ۲۰۱۴).

جدول۲- نتایج مقایسه میانگین درصد رشد قارچ‌های مختلف *تریکودرما* در درصدهای مختلف PEG در مقایسه با شاهد

	۰٪	٪۱۰	٪۲۰	٪۳۰	٪۴۰
T_1	۱۰۰a	۵۶/۴qr	۶۱/۳jp	۵۲/۲hk	۴۱/۳jk
T_2	۱۰۰a	۷۰/۳kp	۶۱/۳FM	۵۵/۱FJ	۴۷/۷hj
T_3	۱۰۰a	۷۸/۱em	۷۲/۱bd	۴۵/۱jl	۲۷/۶mo
T_4	۱۰۰a	۶۳/۹nr	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s
T_5	۱۰۰a	۷۴/۰hn	۵۶/۰kp	۵۱/۷hk	۲۴/۴o
T_6	۱۰۰a	۸۶/۱ah	۶۲/۳em	۵۴/۲gj	۴۸/۰gj
T_7	۱۰۰a	۵۹/۲pr	۴۸/۸nq	۳۴/۷ln	۲۳/۸o
T_8	۱۰۰a	۷۱/۰kp	۴۹/۳nq	۳۷/۷lm	۳۲/۴lo
T_9	۱۰۰a	۹۰/۶ad	۵۰/۶mq	۲۶/۶n	۲۶/۵nq
T_{10}	۱۰۰a	۶۸/۲lp	۵۷/۰jo	۳۵/۵ln	۲۷/۲mo
T_{11}	۱۰۰a	۹۵/۰a	۶۸/۷bi	۳۵/۰ln	۳۰/۹lo
T_{12}	۱۰۰a	۶۱/۶or	۵۸/۷hn	۴۳/۷kl	۳۰/۱lo
T_{13}	۱۰۰a	۷۴/۷ck	۴۱/۲q	۳۶/۷ln	۲۸/۳mo
T_{14}	۱۰۰a	۷۴/۷g	۵۴/۶kp	۴۳/۵kl	۳۴/۹kn
T_{15}	۱۰۰a	۸۴/۶aj	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s
T_{16}	۱۰۰a	۶۶/۹nq	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s
T_{17}	۱۰۰a	۶۹/۱kp	۴۶/۸oq	۴۱/۷Lm	۳۵/۱kn
T_{18}	۱۰۰a	۷۵/۲gn	۵۱/۵۱q	۳۸/۳lm	۳۳/۶kn
T_{19}	۱۰۰a	۷۲/۶jo	۶۰/۲gn	۵۷/۳di	۵۳/۲ei
T_{20}	۱۰۰a	۷۸/۴dm	۶۳/۰el	۵۵/۶fj	۴۹/۱gj
T_{21}	۱۰۰a	۸۸/۵fe	۶۹/۲bh	۶۶/۷be	۶۳/۷ad
T_{22}	۱۰۰a	۷۵/۷gn	۷۰/۶bh	۵۹/۴di	۵۶/۵dg

T_{23}	۱۰۰a	۹۰/۸ac	۷۰/۰bh	۶۵/۴bf	۴۹/۷gi
T_{24}	۱۰۰a	۸۵/۴ah	۶۲/۱em	۵۴/۹fj	۵۴/۱ei
T_{25}	۱۰۰a	۷۷/۰fm	۶۶/۴dk	۵۳/۲hk	۴۶/۳ij
T_{26}	۱۰۰a	۹۱/۷ac	۶۶/۸cj	۵۶/۵ei	۰/۰s
T_{27}	۱۰۰a	۸۰/۲cl	۷۷/۶bd	۶۲/۳bh	۵۵/۷dh
T_{28}	۱۰۰a	۸۶/۵ag	۷۸/۵bc	۷۷/۲a	۷۰/۸a
T_{29}	۱۰۰a	۶۸/۱mp	۶۴/۰ek	۵۷/۷di	۵۴/۲ei
T_{30}	۱۰۰a	۸۹/۰fe	۷۹/۸ab	۷۱/۷ab	۶۷/۱ab
T_{31}	۱۰۰a	۸۶/۷ag	۶۸/۲bi	۴۳/۷kl	۳۵/۶km
T_{32}	۱۰۰a	۷۹/۶cl	۷۳/۶be	۶۷/۶ad	۶۱/۰be
T_{33}	۱۰۰a	۷۰/۳kp	۶۹/۲bh	۶۴/۶bg	۵۸/۷cf
T_{34}	۱۰۰a	۹۲/۵ab	۸۹/۴a	۷۰/۷ac	۶۵/۴ac
T_{35}	۱۰۰a	۹۰/۳ae	۷۳/۰bf	۶۰/۸ci	۵۱/۹fi
T_{36}	۱۰۰a	۵۳/۵r	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s
T_{37}	۱۰۰a	۷۱/۲ko	۶۶/۴dk	۵۴/۳gj	۳۷/۲kl
T_{38}	۱۰۰a	۷۹/۵cl	۶۱/۳fm	۵۶/۱fi	۵۳/۲ei
T_{39}	۱۰۰a	۸۵/۲ci	۷۷/۹bd	۵۷/۷di	۵۲/۳fi
T_{40}	۱۰۰a	۸۹/۴ae	۷۹/۳ab	۶۵/۲bf	۳۳/۹kn
T_{41}	۱۰۰a	۹۲/۵ab	۸۹/۸a	۵۰/۹ik	۴۵/۸ij
T_{42}	۱۰۰a	۷۳/۱io	۶۱/۹em	۵۴/۳gj	۴۸/۰gj
T_{43}	۱۰۰a	۷۷/۱fm	۴۴/۷pq	۳۲/۸mn	۲۸/۹lo

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد

نتیجه‌گیری کلی

در اکثر مناطق ایران مشکل کم‌آبی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده‌ی رشد گیاه است. با توجه به این‌که که تعدادی از جدایه‌ها مانند T_{21}، T_{28} و T_{30} توانایی بالایی در مقاومت به خشکی در سطوح مختلف PEG داشتند، احتمالا استفاده از این جدایه‌ها می‌تواند نقش موثری در افزایش رشد گیاهان در شرایط تنش خشکی داشته باشند. به منظور اثبات این فرضیه انجام آزمون گلخانه‌ای و مزرعه‌ای الزامی می‌باشد.

منابع

Ali, S., Charles, T, C. and Glick, B. R. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. Plant Physiology and Biochemistry, 80, 160-167.

Antoun, H., and Kloepper, J. W. 2001. Plant growth promoting rhizo-bacteria. Encyclopedia of Genetics, Academic, New York 1477-1480.

Benitez, T., Rincón, A. M. Limón, M. C. and Codon, A. C. 2004. Bio-control mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology, 7(4): 249-260.

Brotman, Y., Landau, U. Cuadros-Inostroza, A, Takayuki T, Fernie AR. 2013. Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. PLoS Pathog 9(3):e10032

Chepsergon, J., Mwamburi, L. and Kassim, M. K. 2014. Mechanism of drought tolerance in plants using *Trichoderma* spp. International Journal of Science Research, 3(11): 1592-1595.

Daniel, L., A. E., Praveen Kumar, G., Desai, S. and Mir Hassan, A. S. K. 2011. In-vitro Characterization of *Trichoderma viride* for Abiotic Stress Tolerance and Field Evaluation against Root Rot Disease in *Vigna mungo* L. Journal of Agricultural Science and Food Research, 2 (3):1-5

Doni, F., Isahak, A., Zain, CRCM., Ariffin, SM., Mohamadand, WNW. And Yusoff, WMW. 2014a. Formulation of Trichoderma sp. SL2 inoculants using different carriers for soil treatment in rice seedling growth. Springer Plus, 3-532

Gusain, Y. S., Singh, U. S. and Sharma, A. K. 2014. Enhance activity of stress related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.) induced by plant growth promoting fungi under drought stress. African Journal of Agricultural Research, 9(19): 1430-1434

Harman, GE., Howell, CR., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, 2, 43-56.

Hashem, A., Abd Allah, EF. and Alqarawi, AA .2014. Alleviation of abiotic stress in Ochradenus baccatus (Del.) by Trichoderma hamatum (Bonord.) Bainier. Journal of Plant Interactions, 9: 857–86.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158: 17-25.

Joshi, BB., Bhatt, RP. and Bahukhandi, D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. Journal of Environmental Biology 31(6): 921-928.

Khalafallah, A. A. and Abo-Ghalia, H. H. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. Journal Application Science Research, 4(5): 559-569.

Mastouri, F., Björkman, T. and Harman, G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Phytopathology, 100: 1213-1221.

Mastouri, F., Bjorkman, T. and Harman, G. E. 2012. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. Molecular plant-microbe interactions, 25(9): 1264-1271.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science, 7(9): 405-410.

Mona, S. A., Hashem, A., Abd_Allah, E. F. and Alqarawi, A. A. 2017. Increased resistance of drought by *trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. Journal of Integrative Agriculture, 16 (8): 1751-1757.

Rawat, R., Tewari, L. 2011. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. Curr Microbiol, 62: 1521–1526

Saleh Rastin, N. (2001). Biofertilizers and their role in order to reach to sustainable agriculture. A compilation of papers of necessity for the production of biofertilizers in Iran 1-54 pp.

Shoresh, M. and Harman, G. E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. Plant physiology, 147(4): 2147-2163.

Zlatev, Z., and Lidon, F.C. 2012. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. Emirates Journal of Food and Agriculture, 24(1): 57-72.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The investigation of drought resistance of plant growth promoting *Trichoderma* isolates for use as an appropriate biological fertilizer in hot and dry areas

Teb, H[1]., Abbaszadeh-Dahaji, P[*2]., Alaei, H.[3] Hoseini, F. [1]

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University Of Rafsanjan, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University Of Rafsanjan, Iran
[3] Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

Abstract

Drought stress is one of the most important environmental stresses which affect plant growth and yield. The use of drought resistant *Trichoderma* fungi is an effective strategy to facilitate the growth of plants in arid and semi-arid regions. For this purpose, 43 isolates of *Trichoderma* were obtained from the gene bank of Vali-e-Asr University of Rafsanjan and their resistance to drought stress was measured. In order to evaluate their resistance to drought, different isolates were isolated in potato dextrose broth (PDB) with concentration of 0, 10, 20, 30 and 40% of polyethylene glycol (PEG) has approximately potential of 0, -5, -10, -20, -30 MPa used. The results indicated that the resistance of each of the isolates of *Trichoderma* was different at each drought level. The results show that at 10% level of PEG, T11 isolate with 95% of growth had the highest growth rate at this drought level compared to control (without using of PEG), and was identified as the most resistant isolate at this level of drought. The lowest drought resistance at this level was recorded for T36 with 53.5% of growth which is the most sensitive isolate for drought stress at this level. T41 and T34 isolates with 89.8% and 89.4% of growth, respectively, had the highest drought resistance at 20% of PEG level, and T16 and T36 isolates did not grow at this level. The highest drought resistance was observed for T28 isolate with 77.2% growth and the least resistance was observed for T4, T15, T16 and T36 isolates that did not grow at the level of 30% of PEG. At 40% level, the highest drought resistance was recorded for T28 isolate with 70.8% of growth compared to the control and the least resistance was found for T4, T15, T16, T26 and T36, which did not grow at this level. This experiment also showed that T28 and T30 isolates had significant resistance to all levels of drought. Therefore, according to the results of this study and by identifying and investigating the growth traits of these isolates, superior isolates can be used as biological fertilizers by conducting greenhouse and field experiments under drought stress conditions.

Keywords: Potato dextrose broth, polyethylene glycol, drought stress, *Trichoderma*

[*] Corresponding author, Email: P.abbaszadeh@vru.ac.ir

محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی

تأثیر باکتری ریزوبیوم تریفولی و قارچ میکوریز آربسکولار بر عملکرد و غلظت کادمیوم در گیاه شبدر برسیم تحت تنش کادمیوم

لیلا قاسمی‌فر[1*]، احمد گلچین [2]، فاطمه رخش [3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه زنجان

[2] استاد گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه زنجان

[3] دکتری گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه زنجان

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر مایه زنی با باکتری ریزوبیوم تریفولی و قارچ میکوریز آربسکولار بر عملکرد و غلظت کادمیوم در گیاه شبدر برسیم تحت تنش کادمیوم به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. سطوح کادمیوم خاک شامل صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و مایه زنی با ریزجانداران شـامل تیمارهای بدون مایه زنی (WI)، مایه زنی با قارچ گلوموس موسهآ (M)، مایه زنی با قارچ گلوموس اینترادیس (I)، قارچ گلوموس موسهآ + باکتری ریزوبیوم تریفولی (MT)، قارچ گلوموس اینترادیس + باکتری ریزوبیوم تریفولی (IT)، مایه زنی با باکتری ریزوبیوم تریفولی (T)، مایه زنی با قارچ‌های گلوموس موسهآ + گلوموس اینترادیس (MI) و مایه زنی با قارچ‌های گلوموس موسهآ + گلوموس اینترادیس + باکتری ریزوبیوم تریفولی (MIT) بود. نتایج نشان داد با افزایش سطوح کادمیوم عملکرد گیاه شبدر کاهش یافت. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک وزن تر بخش هوایی ۴۸/۰۲ درصد و وزن تر ریشه ۵۰/۳۲ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافتند. به‌طورکلی این پژوهش نشان می‌دهد که اثر باکتری ریزوبیوم تریفولی و قارچ میکوریز آربسکولار عملکرد گیاه شبدر برسیم تحت تنش کادمیوم را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی خاک، گلوموس موسهآ، گلوموس اینترادیس، فلزات سنگین

مقدمه

فلزات سنگین آن دسته از فلزاتی را گویند که چگالی آن‌ها در حدود ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب می‌باشد و در گروه عناصر واسطه قرار دارند و این فلزات سنگین به لایه‌های زیرین خاک انتقال نمی‌یابند؛ بنابراین با افزایش غلظت این عناصر در خاک، آن‌ها در لایه سطحی خاک و عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک تجمع می‌یابند و بنابراین بیشتر در معرض جذب و انتقال به گیاه، قرار می‌گیرند (شیرانی، ۱۳۸۷). غلظت فلزات سنگین در خاک در درجه اول به نوع و ترکیب شیمیایی ماده مادری که از آن به وجود می‌آید بستگی دارد؛ اما سایر منابع ورودی از قبیل فعالیت‌های انسانی نیز منجر به افزایش غلظت این عناصر در خاک می‌شود (Mirsal, 2008). گیاه‌پالایی فناوری مبتنی بر تلفیق فعالیت گیاهان برای تجزیه، انتقال، غیرفعال کردن و ساکن‌سازی ترکیبات آلاینده خاک و آب‌های زیرزمینی است. گیاه‌پالایی یک روش زیستی است که در آن از گیاهان مختلف برای کاهش آلودگی‌های محیطی ازجمله آلودگی ناشی از تجمع فلزات سمی مانند کادمیوم، مس، سرب، روی، کروم و غیره در خاک استفاده می‌شود. گیاهانی که توان بالایی در جذب فلزات سنگین و آلاینده‌ها دارند مشخص و معرفی می‌گردند. شناسایی گیاهانی که مصرف خوراکی ندارند در گیاه‌پالایی از اهمیت بیش‌تری برخوردار است. گیاه‌پالایی یکی از روش‌های ارزان قیمت و با حداقل خسارت به طبیعت محسوب می‌شود (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۰). در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، حضور ریز جاندارانی مانند قارچ میکوریز آربسکولار در ریزوسفر، می‌تواند فراهمی و سمیت فلزات سنگین را برای گیاه تغییر دهد و از این طریق نقش مهمی در گیاه‌پالایی داشته باشد (Biro and Takacs, 2007). گیاه‌پالایی یکی از روش‌های ارزان قیمت و با حداقل خسارت به طبیعت محسوب می‌شود (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۰). در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، حضور ریز جاندارانی مانند قارچ میکوریز آربسکولار در ریزوسفر، می‌تواند فراهمی و سمیت فلزات سنگین را برای گیاه تغییر دهد و از این طریق نقش مهمی در گیاه‌پالایی داشته باشد (Biro and Takacs, 2007). به‌منظور کاهش واردات کودهای شیمیایی و اثرات زیان‌بار زیست‌محیطی آن‌ها، در این تحقیق صرفاً از ریز جانداران استفاده شد. با توجه به نقش سودمند ریز جانداران در رشد و نمو گیاه و کاهش تنش‌های محیطی و نیز اهمیت اقتصادی گیاه شبدر، این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر قارچ میکوریز آربسکولار و باکتری ریزوبیوم *تریفولی* بر عملکرد گیاه شبدر برسیم تحت تنش کادمیوم صورت گرفت.

* qasmyfrleila@gmail.com

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کادمیوم خاک و مایه زنی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری ریزوبیوم *تریفولی* بر عملکرد گیاه شبدر برسیم یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. سطوح کادمیوم خاک شامل صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود که از منبع سولفات کادمیوم ($Cd_3O_{12}S_3.8H_2O$) تأمین و مصرف شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در خاک شامل قارچ میکوریز *گلوموس موسه‌آ*، *گلوموس اینترادیس* و باکتری ریزوبیوم *تریفولی* بودند که هم به‌صورت جداگانه و هم به‌صورت مخلوط با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفتند. بنابراین تیمارها شامل بدون مایه زنی (WI)، مایه زنی با قارچ *گلوموس موسه‌آ* (M)، مایه زنی با قارچ *گلوموس اینترادیس* (I)، قارچ *گلوموس موسه‌آ* + باکتری ریزوبیوم *تریفولی* (MT)، قارچ *گلوموس اینترادیس* + باکتری ریزوبیوم *تریفولی* (IT)، مایه زنی با باکتری ریزوبیوم *تریفولی* (T)، مایه زنی با قارچ‌های *گلوموس موسه‌آ* + *گلوموس اینترادیس* (MI) و مایه زنی با قارچ‌های *گلوموس موسه‌آ* + *گلوموس اینترادیس* + باکتری ریزوبیوم *تریفولی* (MIT) بودند، بنابراین تعداد تیمارهای آزمایشی ۴۰ عدد بود که با لحاظ کردن ۳ تکرار در مجموع ۱۲۰ واحد آزمایشی وجود داشت. برای کاشت شبدر از جعبه‌های کوچک حاوی ۵ کیلوگرم خاک استفاده شد. مقدار مصرف کود جامد قارچی ۵۰ گرم در هر جعبه و بذر شبدر برسیم قبل از کاشت با باکتری ریزوبیوم *تریفولی* آغشته گردید. در هر جعبه به‌طور یکسان ۲ گرم بذر شبدر برسیم کشت شد. بافت خاک مورد استفاده در آزمایش بافت لوم بود و خاک بعد از آلوده شدن به کادمیوم، قبل از کاشت برای رسیدن به تعادل به مدت ۱ ماه در رطوبت ظرفیت مزرعه نگهداری گردید. قبل از کاشت آزمایش‌های اولیه برای اندازه‌گیری عناصر کم‌مصرف و پرمصرف و کادمیوم قابل‌جذب انجام و در صورت وجود کمبود در خاک، قبل از کاشت اقدام به رفع کمبودهای عناصر غذایی شد (جدول ۱). عملیات داشت به مدت سه ماه انجام و در پایان دوره رشد وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌های گیاهی ابتدا با آب مقطر شسته و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند؛ و وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر توزین گردید. همچنین برای اندازه‌گیری غلظت کادمیوم از روش هضم سه اسید استفاده شده و غلظت کادمیوم در بخش هوایی و ریشه با استفاده از دستگاه جذب اتمیک اندازه‌گیری گردید (Estefan, 2017). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. در ضمن مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

شن	سیلت	رس	بافت خاک	pH	EC	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	آهن	روی	مس	منگنز	کادمیوم	سرب
درصد			-	-	µS/cm	درصد	میلی‌گرم بر کیلوگرم							
۳۸/۲	۴۲/۳	۱۹/۵	لوم	۷/۶۰	۱۵۰	۰/۰۱۴	۱۰	۲۵۰	۳/۵	۰/۰۲۶	۰/۸۴	۳/۱۵	۰/۰۶	۰/۲۴

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم خاک، اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر داشت (جدول ۲). با افزایش غلظت کادمیوم، وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه کاهش یافت. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک وزن تر بخش هوایی ۴۸/۰۲ درصد و وزن تر ریشه ۵۰/۳۲ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافتند (شکل ۱ و ۲). همچنین با افزایش غلظت کادمیوم خاک، غلظت کادمیوم ریشه و بخش هوایی افزایش یافت. بیشترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک به ترتیب به میزان ۹/۳۹ و ۱۵/۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه از تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۰/۰۰۱۷ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمدند (شکل ۳ و ۴). غلظت بالای کادمیوم علاوه بر ایجاد مسمومیت با ایجاد رقابت باعث کاهش جذب عناصر کم‌مصرف شده و با ایجاد ترکیبات فسفات کادمیوم و نیترات کادمیوم جذب عناصر پرمصرف را نیز کاهش می‌دهد که این امر کاهش شاخص‌های رشد و به دنبال آن کاهش عملکرد گیاه را در پی خواهد داشت (Benavides et al., 2005). زیمداح[1] و همکاران (۱۹۷۶) نشان دادند که افزایش محتوای کادمیوم خاک، باعث افزایش محتوای این عنصر در ریشه شد.

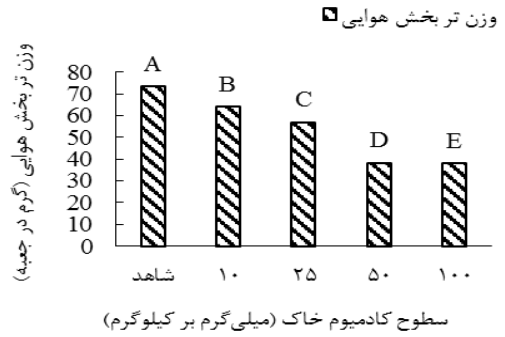
[1]-Zimdahl,

موبین و خان[1](۲۰۰۷) نشان دادند که با افزایش سطوح کادمیوم خاک، مقدار کادمیوم میوه گوجه‌فرنگی افزایش یافت. کلارک[2](۱۹۹۶) بیان کرد گیاه ذرت ازجمله گیاهانی است که محتوای کادمیوم بیشتری در ریشه نسبت به بخش هوایی دارد.

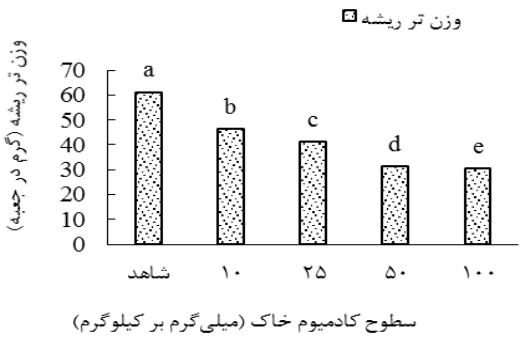
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر بخش هوایی	وزن تر ریشه	کادمیوم بخش هوایی	کادمیوم ریشه
		گرم در جعبه			
سطوح کادمیوم	۲	۹۶۰/۲۰**	۱۵۹۵/۰۴۲**	۳۵۱/۱۹**	۹۰۸/۷۲**
نوع مایه زنی	۳	۲۴۶۱/۱۶**	۱۵۵۲/۰۲**	۵/۰۸**	۱۳/۳۶**
سطوح کادمیوم × نوع مایه زنی	۶	۲۷۹/۸۱**	۲۸۴/۴۹ **	۰/۵۵**	۱/۳۴**
خطا	۲۲	۱۱/۲۹	۵۷/۴۲	۰/۰۷	۰/۳۸
درصد ضریب تغییرات	-	۵/۲۹	۱۵/۰۳	۶/۹۳	۹/۱۶

** و * به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار و ns اختلاف معنی‌دار نیست.



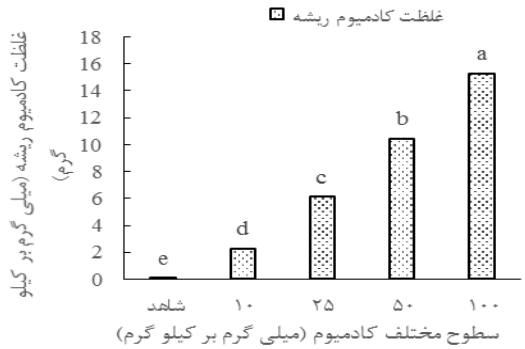
شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر وزن تر بخش هوایی گیاه



شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر وزن تر ریشه گیاه



شکل ۳: تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر غلظت کادمیوم بخش هوایی گیاه

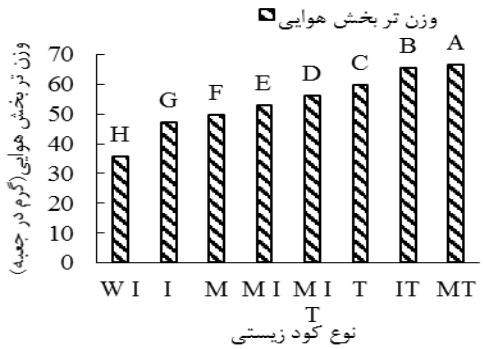


شکل ۴: تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر غلظت کادمیوم ریشه گیاه

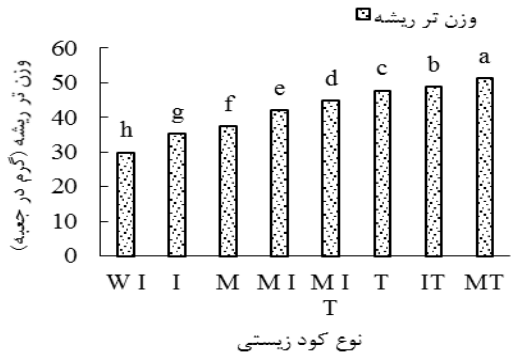
[1]-Mobin and Khan
[2]-Clarke

تأثیر نوع مایه زنی بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم

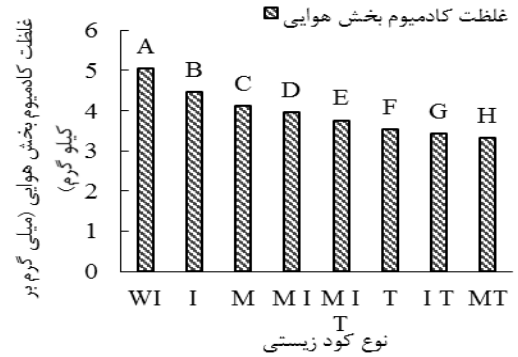
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که کاربرد کود زیستی بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مایه زنی تأثیر مثبتی بر وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر داشت. بیش‌ترین وزن تر بخش هوایی در اثر مایه زنی مشترک قارچ گلوموس موسهآ و باکتری ریزوبیوم تریفولی (MT) به میزان ۶۶/۶۲ گرم در جعبه به دست آمد. همچنین کمترین وزن تر بخش هوایی در تیمار شاهد (بدون مایه زنی یا WI) به میزان ۳۵/۷۳ گرم در جعبه اندازه‌گیری گردید. همچنین بیشترین وزن تر ریشه در اثر مایه زنی مشترک قارچ گلوموس موسهآ و باکتری ریزوبیوم تریفولی به میزان ۵۱/۲۵ گرم در جعبه و کمترین وزن تر ریشه در تیمار شاهد (بدون مایه زنی) به میزان ۲۹/۸۰ گرم در جعبه به دست آمد (شکل ۵ و ۶). همچنین نتایج نشان داد که مایه زنی با قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم تریفولی باعث کاهش غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر گردید. کمترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه در اثر مایه زنی با قارچ میکوریز گلوموس موسهآ و باکتری ریزوبیوم تریفولی (MT) به ترتیب به میزان ۳/۳۱ و ۵/۶۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد و همچنین بیشترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه در تیمار بدون مایه زنی (WI) به ترتیب به میزان ۵/۰۴ و ۸/۳۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شدند (شکل ۷ و ۸). بریسیل[1] و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که غلظت کادمیوم بخش هوایی گیاه لوبیا در حضور قارچ میکوریز افزایش یافت ولی غلظت کادمیوم در بذر لوبیا در حضور قارچ‌های میکوریز نسبت به تیمار بدون قارچ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در آزمایشی که توسط سانهیتا-گوپتا[2] و همکاران (۱۹۹۵) انجام گرفت مایه زنی بذر گوجه‌فرنگی با سه نوع باکتری آزوسپریلوم، ازتوباکتر و سودوموناس سبب افزایش رشد رویشی گیاه و درنهایت عملکرد گیاه شد.



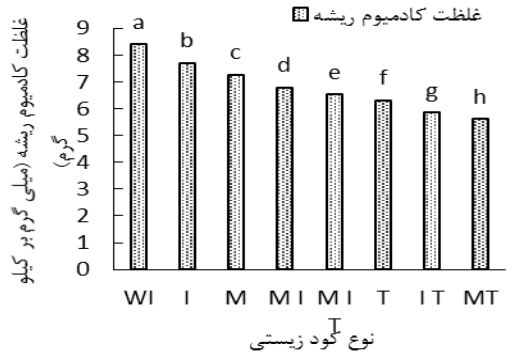
شکل ۵: تأثیر نوع مایه زنی بر وزن تر بخش هوایی گیاه



شکل ۶: تأثیر نوع مایه زنی بر وزن تر ریشه گیاه



شکل ۷: تأثیر نوع مایه زنی بر غلظت کادمیوم بخش هوایی گیاه



شکل ۸: تأثیر نوع مایه زنی بر غلظت کادمیوم ریشه گیاه

[1]-Becerril
[2]-Sanhita-Gupta

اثر متقابل کادمیوم و نوع مایه زنی بر وزن تر و غلظت بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که اثر متقابل کادمیوم و نوع مایه زنی بر وزن تر و غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم در اثر مایه زنی با قارچ *گلوموس موسه‌آ* + ریزوبیوم *تریفولی* و بدون مصرف کادمیوم به ترتیب به میزان ۹۰/۰۷ و ۷۷/۳۰ گرم در جعبه به دست آمد. همچنین کمترین وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک و عدم مایه زنی به ترتیب به میزان ۲۶/۳۷ و ۲۵/۵۵ گرم در جعبه اندازه‌گیری شدند. (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد که کمترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه در اثر مایه زنی با قارچ *گلوموس موسه‌آ* + ریزوبیوم *تریفولی* و بدون مصرف کادمیوم به ترتیب میزان ۰/۰۰۱۲ و ۰/۰۰۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمدند. بیشترین غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک و بدون مایه زنی به ترتیب به میزان ۱۱/۲۵ و ۱۷/۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شدند (جدول ۳). ادول[1] و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی اثرات قارچ‌های میکوریزی بر توانایی گیاه‌پالایی محصول آفتاب‌گردان در خاک‌های آلوده به عناصر سنگین سرب و کادمیوم نشان دادند که میکوریز میزان جذب عناصر کادمیوم و سرب را در ریشه‌های خشک آفتاب‌گردان به‌طور معنی‌داری کاهش داد و باعث مقاومت گیاه آفتاب‌گردان به آلودگی گردید و میزان عملکرد این گیاه افزایش یافت.

جدول ۳: مقایسه میانگین‌های اثر متقابل سطوح کادمیوم و مایه زنی با کود زیستی بر وزن تر بخش هوایی و غلظت کادمیوم گیاه شبدر برسیم

سطوح کادمیوم	نوع مایه‌زنی	وزن تر بخش هوایی	وزن تر ریشه	کادمیوم بخش هوایی	کادمیوم ریشه
میلی‌گرم بر کیلوگرم		گرم در جعبه		میلی‌گرم بر کیلوگرم	
صفر	WI	۳۴/۸۴۳l	۲۸/۷۶۳m-o	۰/۰۰۲۲t	۰/۰۳۴۷q
	I	۶۲/۴۴۳e-g	۴۲/۹۲۷c-i	۰/۰۰۲۰t	۰/۰۰۹۸q
	M	۶۹/۹۱۰ed	۵۱/۰۲۷b-e	۰/۰۰۱۹t	۰/۰۰۷۹q
	T	۸۲/۴۰۰bc	۷۴/۵۳۳a	۰/۰۰۱۵t	۰/۰۰۵۶q
	MI	۷۹/۲۹۰c	۶۸/۲۷۰a	۰/۰۰۱۸t	۰/۰۰۷۸q
	IT	۸۸/۵۹۰ab	۷۵/۲۶۳a	۰/۰۰۱۴t	۰/۰۰۴۹q
	MT	۹۰/۰۷۳a	۷۷/۳۰۰a	۰/۰۰۱۲t	۰/۰۰۴۶q
	MIT	۷۹/۸۸۰c	۷۱/۷۲۳a	۰/۰۰۱۶t	۰/۰۰۶۱q
۱۰	WI	۵۵/۷۳۳f-i	۴۰/۰۱۳f-l	۱/۸q	۴/۲۴mn
	I	۵۶/۲۹۳f-g	۴۰/۴۸۰e-k	۱/۴qr	۳/۵۵n
	M	۵۶/۸۸۰f-i	۴۱/۰۷۰d-j	۱/۱rs	۲/۳۴o
	T	۷۰/۶۸۰de	۵۱/۵۷۰b-d	۰/۸۸s	۱/۶op
	MI	۵۸/۹۱۰f-h	۴۲/۷۶۷c-i	۰/۹۶rs	۱/۹po
	IT	۷۵/۰۶۰cd	۵۲/۵۰۰bc	۰/۸۶s	۱/۵۶po
	MT	۷۵/۴۱۰cd	۵۷/۸۳۰b	۰/۸۲s	۱/۰۲qp
	MIT	۶۳/۶۵۷ef	۴۵/۷۷۷c-g	۰/۹۱s	۱/۸۹po
۲۵	WI	۳۰/۴۱۰lm	۲۷/۰۲۳no	۴/۶l	۷/۳gi
	I	۵۳/۴۶۷h-k	۳۷/۱۰۳g-n	۳/۸m	۶/۶jk
	M	۵۳/۷۵۷h-j	۳۷/۳۷۳f-n	۳/۳۳n	۶/۵jk
	T	۶۳/۹۷ef	۴۶/۱۹۰c-g	۲/۷op	۵/۸lk
	MI	۵۴/۴۵۷g-j	۳۸/۶۵۰f-m	۳/۱۳no	۶/۲ljk
	IT	۶۷/۷۹۷de	۴۷/۹۷۳b-f	۲/۶p	۵/۴۶lk
	MT	۶۸/۰۲۷de	۵۰/۸۹۷b-e	۲/۵p	۵/۱lm
	MIT	۶۳/۵۷۰ef	۴۴/۱۶۷c-h	۲/۷۷op	۵/۸۹lk

[1]-Adewole

۵۰	WI	۳۱/۲۸۳lm	۲۷/۶۷۷m-o	۷/۵۶۳۳g	۱۲/۶f
	I	۳۱/۶۵۷lm	۲۷/۷۵۰m-o	۶/۹h	۱۱/۸f
	M	۳۲/۵۳۳lm	۲۸/۴۶۳m-o	۶/۵۱۳۳hi	۱۱/۶۶۶۷f
	T	۳۶/۶۶۰l	۳۲/۶۴۳i-o	۵/۲j	۹/۸g
	MI	۳۵/۸۳۳l	۲۹/۹۳۳k-o	۶/۴i	۱۰/۵۶g
	IT	۴۹/۴۷۰i-k	۳۴/۹۱۷h-o	۵/۱۸۶۷k	۸/۴h
	MT	۵۲/۸۶۳h-k	۳۶/۶۸۷g-n	۵/۱۲k	۸/۲hi
	MIT	۳۶/۵۲۰l	۳۱/۴۳۲j-o	۵/۹j	۱۰/۲۴g
۱۰۰	WI	۲۶/۳۷۳m	۲۵/۵۵۰o	۱۱/۲۵a	۱۷/۸a
	I	۳۳/۹۶۰lm	۲۷/۷۷۰m-o	۱۰/۲b	۱۶/۶b
	M	۳۵//۷۸۷l	۲۹/۱۸۰l-o	۹/۶۶c	۱۵/۸bc
	T	۴۵/۴۷۰k	۳۳/۲۱۰i-o	۸/۸۸ed	۱۴/۳ed
	MI	۳۶/۲۶۷l	۳۰-۲۶۰j-o	۹/۲۸۶۷cd	۱۵/۳dc
	IT	۴۶/۲۴۷jk	۳۳/۲۷۳i-o	۸/۵ed	۱۳/۸e
	MT	۴۶/۷۳۷jk	۳۳/۵۳۷h-o	۸/۱۲f	۱۳/۷۳۳۳e
	MIT	۳۶/۴۵۷l	۳۰/۶۱۳j-o	۹/۲cd	۱۴/۶ed

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال درصد ندارند

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، با افزایش سطوح آلودگی خاک به کادمیوم وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه شبدر برسیم کاهش یافت ولی مایه زنی خاک با ریزجانداران اثر سو آلودگی خاک به کادمیوم را کاهش داد. مایه‌زنی جداگانه قارچ‌های میکوریز نیز نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی باعث کاهش غلظت کادمیوم در بخش هوایی و ریشه شد ولی استفاده هم‌زمان از قارچ‌های میکوریز و باکتری ریزوبیوم تأثیر بیشتری در کاهش غلظت کادمیوم بخش هوایی و ریشه گیاه داشت. با توجه به تأثیر بهتر مایه زنی مشترک باکتری ریزوبیوم تریفولی و قارچ میکوریز این تیمار برای کاهش اثر سو کادمیوم در خاک‌های آلوده پیشنهاد می‌شود.

منابع

شیرانی، م. ۱۳۸۷. تغییرات مکانی کادمیوم و نیکل در برخی خاک‌های کشاورزی، شهری و صنعتی مشهد و اطراف آن. دومین همایش و نمایشگاه تخصصی مهندسی محیط‌زیست مشهد.

مقیمی، م.، یوسفی راد، م.، ارادتمند اصلی، د. و عسکری قاهانی، م. ۱۳۹۰. اثر اسید هیومیک بر گیاه‌پالایی کادمیوم توسط گیاه شبدر. ششمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان.

Adewole, M. B., Awotoye, O. O., Ohiembor, M. O. and Salami, A. O. 2010. Influence of Mycorrhizal fungi on phytoremediating potential and yield of sunflower in cd and Pb polluted soils. Journal of Agricultural Science. 55: 17-28.

Becerril, F. R., Calantzis, C. Turnau, K. Caussanel, J. P. Belimov, A. A. Gianinazzi, S. Strasser, R. J. and Pearson, V. G. 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium industed stress by arbuscular mycorrhiza in three Pisum sativum L.genotypes. Journal of Experimental Botany. 53 (371): 1177-1185.

Biro, I. and Takacs, T. 2007. Effects of Glomus mosseae strains of different origin on plant macro-and micronutrient uptake in Cd-polluted and unpolluted soils. Acta Agronomica Hungarica. 55(2): 183-192.

Clark, R. B and Zeto, S. K. 1996. Mineral acquisition by mycorrhizal maize grown on acid and alkaline Soil. Soil Biology and Biochemistry. 28: 1495-1503.

Estefan, G. 2017. Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A Manual for the West Asia and North Africa Region.

Mirsal, I. A. 2008. Soil Pollution. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany: pp 115-172.

Sanhita-Gupta, D., Dilp, K., Arora, K. D. and Srivastava, K. 1995. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on rhizoctonia solani. Soil Biology Biochemistry. 27: 1051-1058.

Zimdahl, R. L. (1976). Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources. Journal of the Air Pollution Control Association. 26 (7): 655-660.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Effect of Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobium trifolii on Yield and Concentration of Cadmium in Berseem Clover Under Cadmium Stress

Laila Qasemi Far*[1], Ahmad Golchin[2], Fatemeh rakhsh[3]

[1]M.Sc. Graduate, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

[2]Professor, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

[3] Ph.D. Graduate, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

Abstract

Cadmium is a very mobile element in soil that is absorbed by plant roots and translocation of cadmium from root to shoot deteriorates crop quality. Therefore, this study was carried out with the aim of investigating the effects of arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium *trifolii* on the growth and Cd Concentrations of berseem clover under cadmium stress. A factorial experiment was conducted in the greenhouse of Faculty of Agriculture, the University of Zanjan, using a completely randomized design and three replications. In this experiment, the effects of different levels of soil cadmium (0, 5, 10, 25 and 50 mg/kg) and soil inoculation (without inoculation and inoculation with *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* + Rhizobium *trifolii*, *Glomus intraradices* + Rhizobium *trifolii*, Rhizobium *trifolii*, *Glomus mosseae* + *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* + *Glomus intraradices* + Rhizobium *trifolii*) on growth of berseem clover were assessed. The results of this study showed a significant effect (1% and 5% probability level) due to soil Cd levels on fresh weights and Cd concentrations of aerial parts and roots of berseem clover. The fresh weights of aerial parts and roots of berseem clover decreased as the levels of soil cadmium increased. Also, The results of this experiment showed that soil inoculation with mycorrhizal fungi and Rihzobium *trifolii* had a significant effect (at 1% and 5% probability level) on fresh weights of aerial parts and roots of berseem clover. The highest fresh weights of aerial parts and roots of berseem clover were measured in treatments co-inoculated with *Glomus mosseae* and Rhizobium *trifolii*. The highest Cd concentrations in aerial parts and roots were measured 11.25 and 17.80 mg/kg in treatment 100 mg Cd/kg and without inoculation and the lowest Cd concentrations in aerial parts and roots were 0.0012 and 0.0046 mg/kg in treatment co-inoculated with *Glomus mosseae* and Rhizobium *trifolii* and without Cd.

Keywords: Heavy metals, Glomus intraradices, Glomus mosseae, Rhizobium trifolii, Soil Pollution.

* Corresponding author, Email: qasmyfrleila@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

غربالگری و جداسازی باکتری‌های حل‌کننده روی

بهمن خوشرو*[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲]، علیرضا جعفری[۳]، عطا جودتی[۳] و فهیمه رحمدل [۳]

[۱] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در این پژوهش غربالگری و جداسازی باکتری‌های حل‌کننده روی (Zn) برای تعدادی از باکتری‌های موجود در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. تعداد ۱۱ جدایه بر اساس توان تشکیل هاله شفاف در محیط جامد حاوی منابع کم‌محلول روی شامل اکسید روی، کربنات روی و فسفات روی (به صورت جداگانه و مخلوط) با ۳ تکرار غربالگری شده و در ادامه جدایه‌های منتخب برای تعیین دقیق‌تر توان حل‌کنندگی، مورد آزمون کمّی (در محیط مایع) قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که از بین ۱۱ باکتری، چهار باکتری C17-1M، RPS9، PS4 و C1-4O قادر به تشکیل هاله شفاف در محیط جامد بودند (۳۶ ٪). در ارزیابی کمی انحلال Zn، بین باکتری‌ها و نیز بین منابع مختلف Zn کم‌محلول، اختلاف معنی‌دار از نظر غلظت Zn محلول و pH وجود داشت. باکتری C1-17M از منابع فسفات و اکسید روی و باکتری C1-4O از منبع کربنات روی و باکتری PS4 از ترکیب این سه منبع بیشترین انحلال Zn را از خود نشان دادند. از میان منابع روی نامحلول مورد استفاده بیشترین انحلال روی به ترتیب از فسفات روی، سپس اکسید روی و در نهایت کربنات روی به دست آمد. همبستگی بالایی بین کاهش pH و انحلال Zn توسط باکتری‌ها (r=۰/۸۹) بدست آمد.

کلمات کلیدی: PGPR، خاک‌های آهکی، کمبود روی، انحلال روی

مقدمه

کمبود روی (Zn) از شایع‌ترین مشکلات تغذیه‌ای گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Fernández and Ebert 2005). با وجود این‌که معمولاً روی به مقدار زیاد در خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک وجود دارد، اما به علت آهکی بودن خاک، بالا بودن pH و شوری، به شکل‌های قابل جذب برای گیاه نبوده و علائم کمبود این عنصر در گیاه بروز می‌کند (Gregory و همکاران ۲۰۱۷). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که حاصلخیزی خاک‌ها به علت استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی و بدون توجه به اعمال مدیریت مناسب و اصول کشاورزی پایدار کاهش یافته است (Fess and Benedito 2018). بر اساس برخی تخمین‌ها، حدود ۵۰ درصد از اراضی زیرکشت غلات در جهان دارای مقادیر کم روی قابل جذب برای گیاهان می‌باشند (Fei و همکاران ۲۰۱۶). این موضوع منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (Suja و همکاران ۲۰۱۷ ، Fei و همکاران ۲۰۱۶). نتایج تجزیه خاک‌های کشاورزی ایران نیز مؤید آن است که کمبود روی در این خاک‌ها به دلایل متعددی از جمله آهک زیاد، pH بالا، حضور بی‌کربنات بالا در آب آبیاری و مصرف بیش از حد کودهای فسفاتی، گسترش دارد (ملکوتی و نفیسی ۱۳۷۶، شهبازی و بشارتی ۱۳۹۲). از بین ویژگی‌های گفته شده، pH خاک مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر قابلیت استفاده از روی برای ریشه‌های گیاه می‌باشد. افزایش pH خاک سبب تشدید تثبیت روی در سطح ذرات خاک، نظیر کانی‌های رسی و اکسیدهای فلزی می‌شود. تثبیت سطحی روی، سبب کاهش حل‌پذیری و کاهش قابلیت استفاده روی برای گیاه می‌شود (Bashir و همکاران ۲۰۱۲). ریزجانداران خاک، به عنوان کلوییدهای آلی فعال خاک، ترکیبات آلی متنوعی مانند اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم، کربوهیدرات‌ها و آنزیم‌ها را ترشح می‌کنند که این امر موجب می‌شود تا pH ریزوسفر یک تا دو واحد با توده خاک متفاوت باشد (Huang و همکاران ۲۰۰۴). به طورکلی با کاهش pH، حل‌پذیری روی افزایش یافته و رسوب آن بر روی هیدروکسیدها، فسفات‌ها، کربنات‌ها و سیلیکات‌ها کاهش می‌یابد (Baurah and Barthakur 1999).

*ایمیل نویسنده مسئول: bahmankhoshru@yahoo.com

یکی از روش‌های افزایش فراهمی روی در خاک استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[2]) است (Gontia-Mishra و همکاران ۲۰۱۷). این باکتری‌ها توانایی استفاده از منابع متنوع کربنی را دارا هستند و به دلیل ویژگی‌های متابولیکی و عملکردی متنوع، نقش بارزی در بهبود باروری و سلامت خاک ایفا می‌کنند (Vaid و همکاران ۲۰۱۴). مطالعات مربوط به تأثیر فعالیت‌های میکروبی بر تحرک و فراهمی عناصر غذایی در توده خاک نشان داده است که فرآیندهای میکروبی می‌توانند بر واکنش‌های مختلف عناصر از قبیل جذب زیستی، کمپلکس شدن، انحلال، اکسایش و احیا تأثیر گذارند (Shahab and Ahmed 2008). باکتری‌های Bacillus ،Azotobacter chroococcum edaphicus و B. megaterium توانایی افزایش فراهمی روی در محیط خاک را نشان داده‌اند (Wu و همکاران ۲۰۰۶). این باکتری‌ها می‌توانند با سازوکارهایی از جمله تولید اسیدهای آلی و معدنی و ترشح پروتون موجب کاهش pH ریزوسفر شده و فراهمی عناصر غذایی از جمله روی و آهن را برای گیاه افزایش دهند (Goteti و همکاران ۲۰۱۳). افزایش غلظت روی در گیاهان مختلف تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه توسط پژوهش‌گران گزارش شده است (Dinesh و همکاران ۲۰۱۸). در پژوهشی مشخص شد که باکتری Gluconacetobacter diazotrophicus ترکیبات کم‌محلول روی را با تولید اسید گلوکونیک به صورت محلول درآورده و تلقیح این باکتری در خاک، کمبود روی را کاهش داد (Sarathambalm و همکاران ۲۰۱۰).

در راستای نیل به کشاورزی پایدار که هدف آن استفاده از راه‌کارهای سازگار با محیط زیست است می‌توان از پتانسیل‌های میکروبی و متابولیت‌های آن-ها برای تأمین روی مورد نیاز برای رشد گیاهان استفاده نمود. امروزه استفاده از پتانسیل‌های زیستی به‌عنوان عوامل دوستدار محیط زیست و جایگزینی آن‌ها به‌جای ترکیبات شیمیایی موردتوجه ویژه است (Fess and Benedito 2018). مشکل تأمین روی مورد نیاز گیاهان در خاک‌های آهکی با pH بالا به دلیل عدم حلالیت روی می‌باشد و فرآهمی روی را برای گیاهان با چالش جدی مواجه ساخته است. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده روی یکی از راه‌های مواجه با این مشکل می‌باشد. لذا هدف این پژوهش اجرای برنامه غربالگری اولیه باکتری‌های توانمند حل‌کننده روی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۱ باکتری (RPS9، RPS7، PS4، C16-2O، C1-4O، C17-1M، S16-3، S11-2، AZ-48، AZ-5 و 14SP1) از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز دریافت شد تا ویژگی انحلال روی کم‌محلول از منابع مختلف روی (شامل اکسید، کربنات، فسفات و ترکیب آن‌ها) مورد ارزیابی قرار گیرد.

آزمون کیفی توان حل‌کنندگی جدایه‌ها برای Zn کم محلول

برای بررسی نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی Zn در جدایه‌ها از محیط پایه تریس جامد دارای ۱ ٪ روی کم‌محلول استفاده شد که در این محیط از سه نوع منبع Zn کم‌محلول اکسید روی، کربنات روی و فسفات روی استفاده شد. جدایه‌ها در پلیت‌ها کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بمدت ۷ روز انکوبه شدند. بعد از این مدت وجود هاله اطراف کلنی برای جدایه‌ها بررسی شد (Saravanan و همکاران ۲۰۰۷).

آزمون کمی توان حل‌کنندگی جدایه‌ها برای روی کم محلول

برای بررسی کمی توان حل‌کنندگی روی در جدایه‌ها و تاثیر آن‌ها روی pH، از محیط Tris minimal salt broth با روی کم‌محلول ۰/۱ درصد استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته و اتوکلاو شد و بعد از استریل و سرد شدن محیط مایع، اقدام به تلقیح باکتری‌ها به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کرده و سپس در شیکر انکوباتور گرماگذاری گردیدند (دمای ۲۸ درجه سلسیوس بمدت ۱۴ روز). سپس نمونه‌ها از انکوباتور بیرون آمده و پس از سانتریفوژ (۶۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه) اقدام به اندازه‌گیری pH نموده و غلظت Zn در محلول صاف رویی توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Saravanan و همکاران ۲۰۰۷).

[2] *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش به صورت درون‌شیشه‌ای به صورت فاکتوریل با فاکتور باکتری (۱۱ سطح) و منبع نامحلول روی (۴ سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS آنالیز شده و نمودارها نیز از طریق نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

آزمون کیفی توان حل‌کنندگی روی توسط جدایه‌ها

این آزمایش بر روی محیط‌های کشت جامد تهیه شده از منابع مختلف روی انجام شد و مبنای حل‌کنندگی منبع کم‌محلول روی نیز تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی باکتری بود. از بین ۱۱ باکتری مورد آزمایش، ۴ باکتری C17-1M، RPS9، PS4 و C1-4O قادر به تشکیل هاله در منابع مختلف روی بودند که نتیجه تشکیل هاله توسط باکتری‌ها در محیط کشت‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است.

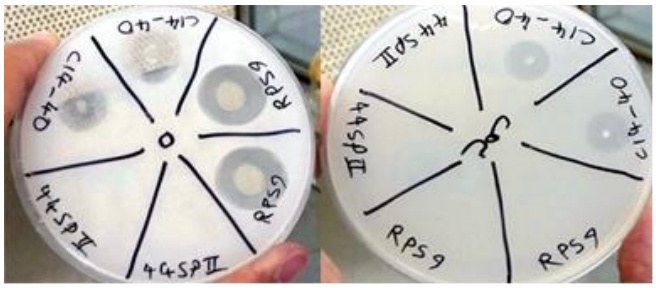
جدول ۱- نتایج تشکیل هاله شفاف در محیط حاوی منابع کم محلول روی توسط باکتری‌ها

باکتری	فسفات روی	اکسید روی	کربنات روی	ترکیبی
RPS9	+	+	–	–
PS4	+	+	–	–
C16-2O	–	–	–	–
S16-3	–	–	–	–
S11-2	–	–	–	–
C1-4O	–	+	+	–
RPS7	–	–	–	–
AZ-48	–	–	–	–
AZ-5	–	–	–	–
C17-1M	+	+	+	–
14SP1	–	–	–	–

توجه: + تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی و – عدم تشکیل هاله

با توجه به نتایج حاصل از آزمون کیفی حل‌کنندگی روی در محیط جامد، باکتری‌های C17-1M، RPS9، PS4 و C1-4O قادر به تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی خود بوده و لذا برای تعیین دقیق میزان حل‌کنندگی و انجام آزمون کمی انحلال روی انتخاب شده و باکتری 14SP1 نیز به عنوان شاهد منفی آزمایش در نظر گرفته شد (که قادر به تشکیل هاله در هیچ محیطی نبود). نمونه‌ای از انحلال منبع کم محلول روی توسط باکتری‌ها و تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی در شکل ۱ آورده شده است.

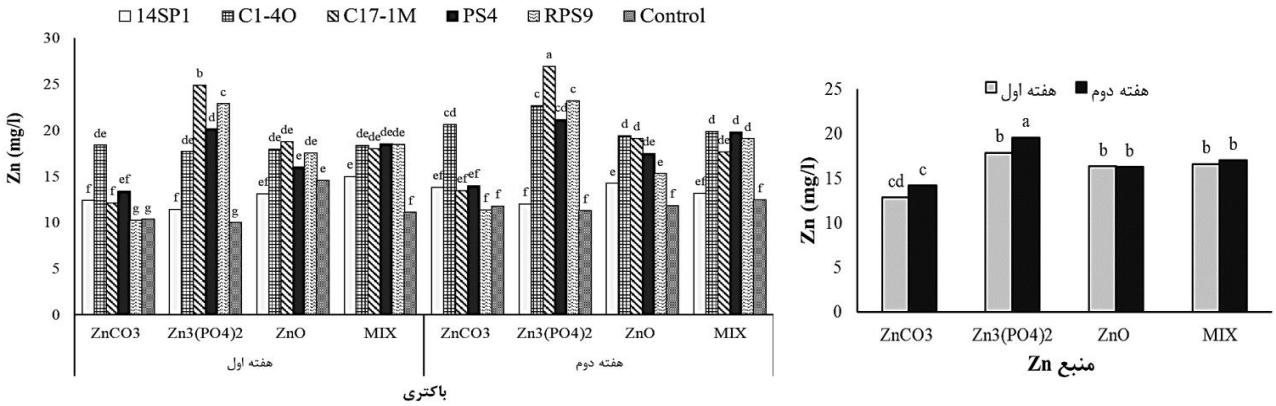
شکل ۱- تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی باکتری



آزمون کمی توان حل‌کنندگی روی توسط جدایه‌ها

این آزمایش برای تعیین دقیق‌تر میزان حل‌کنندگی روی توسط باکتری‌ها انجام گردید. مدت زمان آزمایش ۱۴روز (دو هفته) بود که برای بررسی روند تغییرات غلظت Zn و pH محیط‌های کشت اقدام به اندازه‌گیری دو پارامتر ذکر شده در هفته اول و دوم آزمایش شد تا روند تغییرات pH و آزادسازی Zn از منابع مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج بدست آمده نشان داد که باکتری‌های مورد آزمایش از نظر حل‌کنندگی Zn دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند ($p<0.05$) و همچنین بین منابع مختلف Zn نیز از نظر غلظت Zn آزاد شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0.05$). بیشترین میزان انحلال Zn نسبت به تیمار کنترل (تیمار بدون باکتری) توسط باکتری C17-1M به مقدار ۲۶/۹۵ mg/l از منبع فسفات روی بود. این باکتری همچنین برای منبع اکسید روی نیز دارای بالاترین میزان حل‌کنندگی بود که مقادیر انحلال برای هفته اول ۱۸/۷۸ و برای هفته دوم ۱۹/۴ mg/l بدست آمد. برای منبع کربنات روی، باکتری C1-4O در هفته اول با مقدار ۱۸/۴ و در هفته دوم با مقدار ۲۰/۶۴ mg/l بیشترین میزان آزاد سازی Zn را از خود نشان داد. برای حالت ترکیب ۳ منبع مختلف Zn، باکتری PS4 دارای بالاترین میزان انحلال بود که این مقدار برای هفته اول ۱۸/۵۶ و برای هفته دوم ۱۹/۸۳ mg/l بدست آمد. نکته حائز اهمیت در این آزمایش این است که باکتری C17-1M با وجود توانایی انحلال زیاد Zn از منابع فسفات و اکسید Zn بصورت جداگانه، دارای توان انحلال کمتری در حضور منابع مختلف Zn بصورت توأم (Mix) بود. از طرف دیگر باکتری 14SP1 که در آزمون کیفی انحلال Zn هیچ هاله‌ای تشکیل نداده بود و به عنوان شاهد منفی آزمون کمی انحلال Zn انتخاب شده بود توانست از منبع کربنات روی مقدار بیشتری Zn در مقایسه با باکتری‌های C17-1M و RPS9 حل کند (شکل ۱a). علت این‌که یک باکتری در حالت کیفی حل‌کنندگی (محیط جامد) توان تشکیل هاله نداشته باشد ولی در حالت مایع این توانایی را از خود نشان بدهد، به ماهیت دو روش بستگی دارد و برای مثال اگر یک باکتری تحرک منفی باشد به احتمال زیاد در محیط جامد نتواند هاله شفاف تشکیل دهد ولی در حالت مایع با تکان‌های شیکر و افزایش قابلیت دسترسی سوبسترا، این امکان برای باکتری فراهم می‌گردد (خوشرو و همکاران ۱۳۹۴). تفاوت در جنس و گونه باکتری‌ها و پتانسیل و قابلیت‌های ژنتیکی آنها، ابراز ژنهای خاص در شرایط مواجه با شرایط محیطی خاص (به عنوان مثال منابع روی نامحلول) می‌تواند از دلایل تفاوت رفتاری باکتری‌ها باشد (Bashir و همکاران ۲۰۱۲). کما اینکه تفاوت در ماهیت منابع روی مورد استفاده نیز بر تفاوت رفتار باکتری‌ها اثرگذار است. آزادسازی بیشتر روی از منبع فسفات روی شاید به نقش دوگانه این ترکیب در تامین فسفر و روی مورد نیاز باکتریها مربوط باشد.

[a] [b]

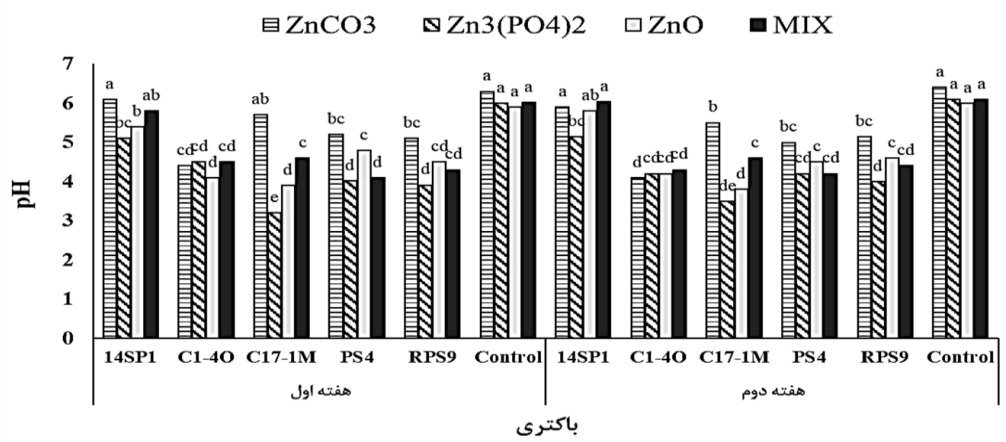


شکل۱- توان انحلال Zn کم‌محلول از منابع مختلف Zn توسط باکتری‌ها در هفته اول و دوم

مقایسه نتایج هفته اول و دوم انحلال Zn توسط باکتری‌ها از منابع مختلف Zn نشان داد که هرچند هفته دوم آزمایش دارای مقادیر بالاتری بود ولی این افزایش قابل ملاحظه نبوده و به دلیل وجود همبستگی بالا بین نتایج هفته اول و دوم آزمایش ($r=0.96$) می‌توان از هفته دوم آزمایش صرف نظر کرد و این آزمایش را در ۷ روز (یک هفته) انجام داد تا در زمان و سایر هزینه‌ها صرفه‌جویی شود. از نظر انحلال Zn از منابع مختلف روی، نتایج بصورت " فسفات روی> اکسید روی= ترکیبی> کربنات روی " بدست آمد (شکل ۱b).

تغییرات pH

همزمان با ارزیابی کمی انحلال Zn از منابع مختلف، اقدام به اندازه‌گیری pH گردید تا علاوه بر بررسی تغییرات pH، همبستگی آن با فرآیند انحلال Zn نیز ارزیابی شود. نتایج بدست آمده برای این بخش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین باکتری‌ها در تیمارهای مختلف آزمایش از نظر تغییرات pH وجود دارد ($p<0.05$) (شکل ۲). همبستگی بالایی بین کاهش pH و افزایش غلظت Zn محلول در محیط مایع مشاهده شد ($r=0.89$). کمترین pH اندازه‌گیری شده مربوط به باکتری C17-1M بدست آمد ($pH=3.2$). با توجه به اندازه‌گیری pH محیط مایع، بنظر می‌رسد که مکانیسم غالب آزادسازی Zn از منابع کم‌محلول همان تولید اسید باشد همانطور که در منابع نیز به سازوکارهایی از جمله تولید اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی، ترشح پروتون و تولید سایدروفور توسط میکروب‌ها در فراهمی عناصر غذایی از جمله روی و آهن برای گیاه اشاره شده است (Goteti و همکاران ۲۰۱۳).



شکل۲- تغییرات pH در منابع مختلف Zn توسط باکتری‌ها در هفته اول و دوم

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که ۳۶ درصد از کل باکتری‌های مورد ارزیابی، پتانسیل انحلال Zn از منابع کم‌محلول را دارند و میزان آزادسازی Zn از منابع مختلف آن یکسان نبوده و بصورت فسفات>اکسید> کربنات روی می‌باشد. با توجه به اینکه کمبود Zn در مناطق دارای خاک‌های آهکی از مشکلات رایج بوده و باعث کاهش در عملکرد گیاهان می‌شود، لذا استفاده از پتانسیل ریزجانداران خاکزی می‌تواند یک راه‌کار مناسب و دوستدار محیط زیست جهت حل مشکل کمبود Zn باشد. انجام ازمایشات گلدانی و مزرعه‌ای در حضور باکتری‌های منتخب این تحقیق توصیه می‌شود.

منابع

خوشرو ب.، ساریخانی م ر.، علی‌اصغرزاد ن.، زارع پ. ۱۳۹۴. ارزیابی ویژگی‌های مهم افزایندگی رشد گیاه در باکتری‌های جدا شده از کودهای زیستی بارور۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین. تحقیقات کاربردی خاک. جلد۳، شماره۱

شهبازی، ک.، و بشارتی، ح. ۱۳۹۲. بررسی اجمالی وضعیت حاصلخیزی خاکهای کشاورزی ایران، نشریه مدیریت اراضی، جلد ۱، شماره ۱، ص ۱-۱۵.

ملکوتی، م.، نفیسی م. ۱۳۷۶. مصرف کود در اراضی فاریاب و دیم. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس

Bashir, K., Ishimaru, Y. and Nishizawa, N.K. 2012. Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. Plant and soil, 361(1-2), 189-201.

Baurah, T.C., and Barthakur, H.P. 1999. A textbook of soil analysis. Vikas Publishers, New Delhy, 334p.

Dinesh, R., Srinivasan, V., Hamza, S., Sarathambal, C., Anke Gowda, S.J., Ganeshamurthy, A.N., Gupta, S.B., Aparna Nair, V., Subila, K.P., Lijina, A. and Divya, V.C., 2018. Isolation and characterization of potential Zn solubilizing bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content. Geofisica Internacional, 321, 173-186.

Fei, X.I.N.G., Fu, X.Z., Wang, N.Q., Xi, J.L., Hung, Y., Wei, Z.H.O.U., Ling, L.L. and Peng, L.Z. 2016. Physiological changes and expression characteristics of ZIP family genes under zinc deficiency in navel orange (Citrus sinensis). Journal of Integrative Agriculture, 15(4), 803-811.

Fernández, V. and Ebert, G. 2005. Foliar iron fertilization: a critical review. Journal of plant nutrition, 28(12), 2113-2124.

Fess, T.L. and Benedito, V.A. 2018. Organic versus conventional cropping sustainability: A Comparative System Analysis. Sustainability, 10(1), 272.

Gontia-Mishra, I., Sapre, S. and Tiwari, S. 2017. Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. Rhizosphere, 3, 185-190.

Goteti, P.K., Emmanuel, L.D.A., Desai, S. and Shaik, M.H.A. 2013. Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (Zea mays L.). International journal of microbiology, 17, 214-238

Gregory, P.J., Wahbi, A., Adu-Gyamfi, J., Heiling, M., Gruber, R., Joy, E.J. and Broadley, M.R. 2017. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. Global Food Security.

Huang, Q., Chen, W., and Guo, X. 2004. Chemical fractionation of copper, zinc and cadmium in two Chinese soils as influenced by rhizobia. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 35: 947-960.

Sarathambalm, C., Thangaraju, M., Paulraj, C., and Gomathy, M. 2010. Assessing the zinc solubilization ability of Gluconacetobacter diazotrophicus in maize rhizosphere using labelled 65Zn compounds. Indian J. Microbiol. 50: 103-109.

Saravanan, V.S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M. and Thangaraju, M. 2007. Solubilization of insoluble zinc compounds by Gluconacetobacter diazotrophicus and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode Meloidogyne incognita. Letters in applied microbiology, 44(3), 235-241.

Shahab, S. and Ahmed, N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. African Journal of Biotechnology, 7(10): 1543-1549.

Suja, G., Byju, G., Jyothi, A.N., Veena, S.S. and Sreekumar, J. 2017. Yield, quality and soil health under organic vs conventional farming in taro. Scientia Horticulturae, 218, 334-343.

Vaid, S.K., Kumar, B., Sharma, A., Shukla, A.K. and Srivastava, P.C., 2014. Effect of Zn solubilizing bacteria on growth promotion and Zn nutrition of rice. Journal of soil science and plant nutrition, 14(4), 889-910.

Wu, S.C., Luo, Y.M., Cheung, K.C. and Wong, M.H. 2006. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: a laboratory study. Environmental Pollution, 144(3), 765-773.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Screening and isolation of zinc solubilizing bacteria

B Khoshru[1]*, MR Sarikhani[2], A Jafari[3], A Joudati[3] and F Rahmdel [3]

[1] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

[2] Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

[3] MSc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

Abstract

In this research, screening and isolation of Zn solubilizing bacteria for a number of bacteria in the microbial bank of the soil microbiology lab of the Agriculture Faculty of University of Tabriz, were done. Bacterial isolates were screened on solid media based on the ability to form a clear zone. The solid media containing low-soluble sources of zinc including zinc oxide, zinc carbonate and zinc phosphate (individually and mixed) with 3 replications were used in the primary screening process. To determine the solubility potential of the isolate with more precise, the selected isolates were tested in liquid medium. The results showed that among the 11 bacterial isolates, 4 bacteria including (C17-1M, RPS9, PS4 and C1-4O) were able to form transparent halo in the solid medium (nearly 36% of the isolates). In the quantitative method, there was a significant difference among the bacteria and low-soluble sources of zinc in terms of Zn concentration and pH. The C1-17M bacteria from zinc phosphate and zinc oxide, C1-4O from zinc carbonate and the PS4 from the combination of these three sources showed the highest Zn dissolution. Among the insoluble sources, the highest zinc dissolution was obtained from zinc phosphate, then zinc oxide and finally zinc carbonate, respectively. High correlation was obtained between pH decrease and Zn dissolution by bacteria (r = 0.89).

Keywords: PGPR, Calcareous soils, Zinc deficiency, Zn Solubilization

*Corresponding Author: bahmankhoshru@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تغییرات آنزیمی سلولاز و لیگنیناز در طول کمپوست شدن در بسترهای مختلف لیگنین و گونه‌های باکتری ترموفیل

آرش همتی[۱*]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، رضا خاکور[۳]

[۱] فارغ التحصیل دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی مقاوم به تجزیه موثر باشند. این تحقیق به منظور بررسی روند آنزیم‌های سلولاز و لیگنیناز در بسترهای با درصد متفاوت لیگنین و همچنین باکتری‌های ترموفیل توانا (*P. validus* 1VC، *P. koreensis* 12C و *B. nealsonii* 104C) در طول کمپوست‌شدن انجام گردید. نتایج نشان داد تیمارهای لیگنین زیاد دارای لیگنیناز بیشتر و سلولاز کمتری نسبت به تیمارهای لیگنین کم بودند. فعالیت سلولاز و لیگنیناز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت سلولازی بود. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 12C، 1VC و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت لیگنینازی بودند. نتایج نشان از امکان بررسی کاربرد این گونه‌ها به صورت تجاری دارد.

کلمات کلیدی: کمپوست، ترموفیل، سلولاز، لیگنیناز

مقدمه

تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی و ترکیبات مقاوم به تجزیه موثر باشند و همچنین خصوصیات کیفی و کمی کمپوست را نیز بهبود بخشند (وارگاس-گراسیا، ۲۰۱۰).

در ابتدای فرآیند تولید کمپوست میزان کربن آلی توده بالاست ولی درصد قابل توجهی از آن در ماه اول تولید کمپوست کاهش می‌یابد که دلیل آن دماهای ترموفیلیک در این دوره می‌باشد. باکتری‌های ترموفیلیک ترکیبات آلی و از جمله کربن آلی را به سهولت تجزیه و دی اکسیدکربن، آب و حرارت تولید می‌کنند. در مراحل بعدی یعنی در مرحله بلوغ درصد کاهش کربن آلی کمتر از مراحل اولیه است که دلیل آن وجود ترکیبات کربنی مقاوم‌تر مثل سلولز و لیگنین می‌باشد (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۵ و برنال و همکاران، ۱۹۹۸). ترکیبات لیگنینی، مناسب‌ترین شاخص برای مشخص کردن رسیدگی کمپوست، در انتهای فرآیند کمپوست شدن می‌باشند (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۵؛ تومالا و همکاران، ۲۰۰۰).

لیگنوسلولزها متشکل از سه پلیمر عمده ساختاری، سلولز، همی‌سلولز و لیگنین هستند. کربوهیدرات از واحدهای بتا ۱و۴ پیرانوسیل[1] از قندهای مونومر تشکیل شده است؛ گلوکز در سلولز، گزیلوز در زایلان‌ها، مانوز در مانازها و مانوز و گلوکز در گلوکومانازها از جمله این مونومرها می‌باشند. آبکافت این کربوهیدرات‌ها از طریق تجزیه پیوندهای بتا ۱و۴ گلیکوزیدی در ساختار پلی‌ساکارید توسط سلولازها، زایلانازها، مانازها و لاکازها انجام می‌شود (سینگ و همکاران، ۲۰۰۳؛ پولیزلی و همکاران، ۲۰۰۵).

لیگنین فراوانترین پلیمر آروماتیک و دومین پلیمر آلی حاوی سلولز در روی زمین است. لیگنین بعد از سلولز به میزان ۶۰ میلیون تن در سال تولید می‌شود که در حدود ۳۰ درصد کربن آلی روی زمین را تشکیل می‌دهد که به نظر می‌رسد تعداد محدودی از میکروارگانیسم-ها می‌توانند آن را کاملاً تجزیه کنند. از نظر ساختمانی، بیوسنتز و تجزیه بیولوژیک لیگنین پیچیده می‌باشد (صفری سنجانی، ۱۳۸۲). دیواره سلولی چوب حاوی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین می‌باشد که همگی به شکل فیبرهای کریستالی مقاوم به تجزیه بوده و فرآیند تجزیه آن‌ها بسیار پیچیده و نیازمند سیستم آنزیمی متعدد و رادیکال‌های هیدرکسیل می‌باشد (کامیمورا و همکاران، ۲۰۱۷). در طبیعت، تجزیه لیگنین در دو مرحله انجام می شود: ۱- تجزیه اولیه لیگنین و تولید ترکیبات آروماتیک با وزن مولکولی پایین و ۲-

* ایمیل نویسنده مسئول: Hemati.arash@yahoo.com

[1] Pyranosyl

تجزیه مواد آروماتیک تولید شده. تجزیه لیگنین در طبیعت توسط اکسیدوردوکتازهای خارج سلولی مانند لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز، پراکسیدازها، لاکاز و پراکسیدازهای تجزیه‌کننده رنگ، از طریق تشکیل واسطه‌های رادیکال فنولیک انجام می‌شود (پلگیونی و همکاران، ۲۰۱۵).

باتوجه به موارد مطرح شده، تغییرات لیگنین و سلولز در فرآیند کمپوست شدن به منظور تعیین رسیدگی کمپوست، مهم می‌باشد. لذا این تحقیق به منظور بررسی روند آنزیم‌های سلولاز و لیگنیناز در بسترهای با درصد متفاوت لیگنین و همچنین باکتری‌های ترموفیل توانا در تولید آنزیم‌های لیگنوسلولاز در طول کمپوست‌شدن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

برای تولید کمپوست از ضایعات بخش کشاورزی استفاده شد. برای این منظور دو بستر به شرح زیر انتخاب گردید:

بستر اول مربوط به ضایعات بخش کشاورزی با درصد لیگنین کم (در حدود ۲۰-۱۵ درصد) بود. برای این منظور از چند ماده آلی با درصدهای مختلف استفاده شد (جدول ۱).

بستر دوم مربوط به ضایعات چوب با درصد لیگنین زیاد (درحدود ۳۰- ۲۵ درصد) بود. برای این منظور از کارگاه‌های تولید چوب، ضایعات جمع‌آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب مواد استفاده شده در ایجاد تل‌های کمپوست

	برگ سیب	بقایای تر گوجه فرنگی	بقایای تر سیب زمینی	خاک اره
لیگنین کم	۳۲	۳۳	۳۲	۳
لیگنین زیاد	۵	۵	۵	۸۵

کلیه مواد مورد استفاده برای کمپوست‌شدن، در ابعاد زیر دو سانتی‌متر پودر شد. مقدار کربن و نیتروژن از تجزیه CHNSO با دستگاه آنالایزر تعیین و از حدود ۴۰ کیلوگرم اوره برای تنظیم C/N در حدود ۲۵ در تیمارهای لیگنین زیاد استفاده گردید. با استفاده از موادی که قبلا ذکر شد اقدام به تل زنی شد. تل‌ها با ۳ متر طول ۱/۵ متر عرض و ۱ متر ارتفاع با وزن تقریبی ۲۲۵۰ کیلوگرم ایجاد شدند.

این تحقیق با طرح آشیانه‌ای فاکتوریل در جایگاه کمپوست شهرستان مراغه به مدت ۶ ماه اجرا شد. برای این منظور فاکتور اول شامل دو بستر آلی (بستر با درصد لیگنین زیاد و بستر با درصد لیگنین کم) و فاکتور دوم شامل جدایه‌های باکتری (سه جدایه تنها 1VC *P. validus*، 12C *P. koreensis* و 104C *B. nealsonii*، مخلوط سه جدایه و شاهد بدون تلقیح) بود. تیمارها با یک تکرار مجموعاً با ۱۰ تیمار انجام پذیرفت. جدایه‌های مورد استفاده قبلا در تحقیقات شناسایی و خالص‌سازی شده بودند (همتی، ۱۳۹۷).

سلولاز

یک گرم از نمونه‌های کمپوست با ۱۵ میلی‌لیتر CM-سلولز (هفت گرم در لیتر) به عنوان سوبسترا و ۱۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ $^{\circ}C$ با pH ۵/۵ نگه‌داری شدند. پتاسیم هگزاسیانوفرات احیا شده با سولفات فریک آمونیوم در یک محلول اسیدی واکنش داده و کمپلکس فریک هگزاسیانوفرات تشکیل می‌دهد. در نهایت کمپلکس فریک هگزاسیانوفرات به روش رنگ‌سنجی در طول موج ۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه گردید (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم). یک واحد از فعالیت سلولاز به عنوان یک میکرومول قند تولید شده در هر دقیقه بیان شد (علی اصغرزاد، ۱۳۸۵).

لیگنیناز

برای استخراج آنزیم، یک گرم نمونه کمپوست با ۵۰ میلی لیتر بافر استات سدیم (۵۰ میلی مولار، pH 4.6) به هر ارلن اضافه شد، به طور کامل مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه (۹۰ دور در دقیقه) تکان خورد. این مخلوط فیلتر شده و برای فعالیت لیگنینولیتیک خارج‌سلولی مورد آزمایش قرار گرفت. برای اینکه فعالیت میکروبی در عصاره آنزیمی غیرفعال شود، بلافاصله جوشانده شد (ماچادو و همکاران،۲۰۰۵).رنگ‌زدایی RBBR با واکنش دادن ۵ میلی لیتر از عصاره آنزیمی که در مرحله قبل استخراج شده بود با ۵۰ میکرولیتر از RBBR دو درصد انجام شد (المر و همکاران، ۱۹۸۴). بعد از یک

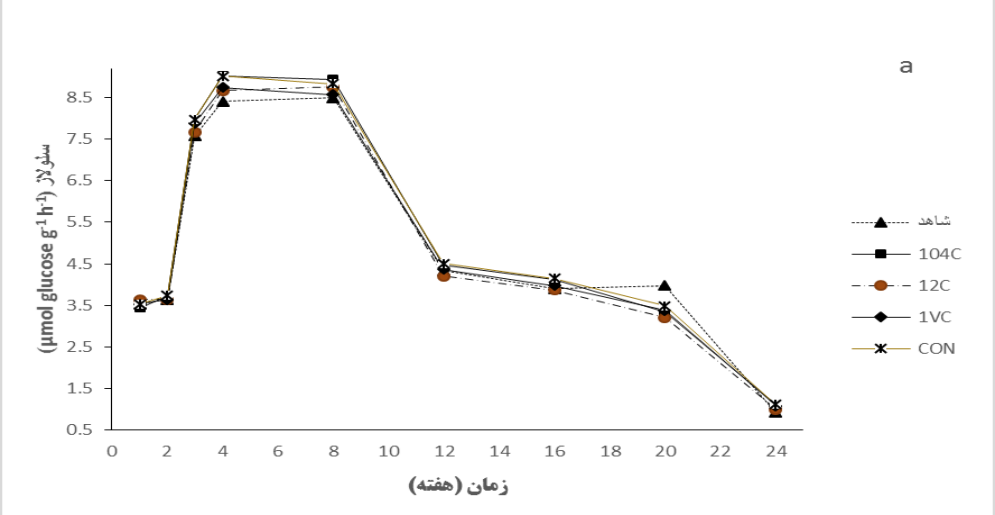
ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط آنزیمی با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد و مقدار جذب در طول موج ۵۸۵ نانومتر قرائت شد. این کار برای نمونه شاهد بدون آنزیم نیز انجام گردید و بمنظور برآورد نهایی فعالیت آنزیمی مقدار شاهد از مقدار قرائت شده هر تیمار کسر گردید.

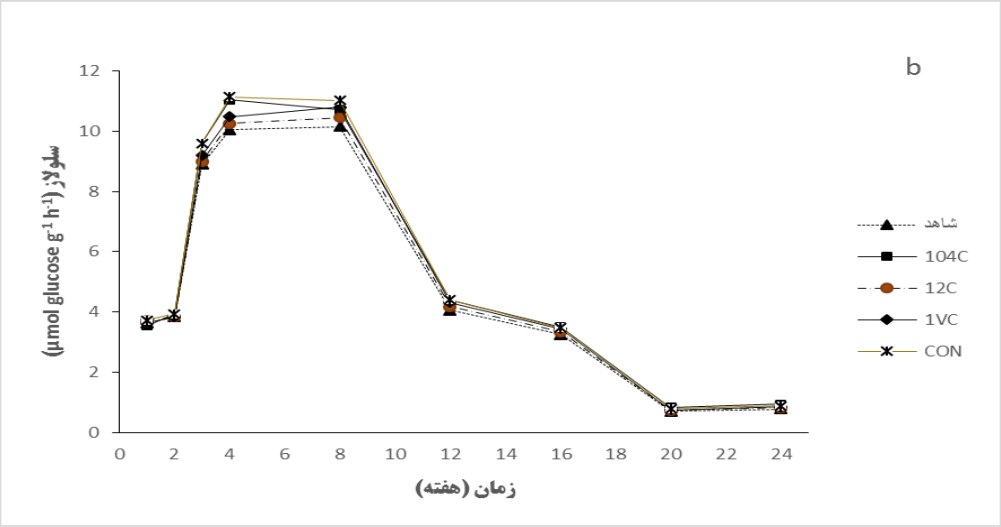
نتایج حاصله به کمک نرم افزار SAS تجزیه و جداول تجزیه واریانس مربوطه تهیه گردید. هم چنین مقایسه میانگین داده‌ها، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار MSTAT-C انجام شد. نمودارها به کمک نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

سلولاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد فعالیت آنزیم سلولاز در تمامی فاکتورها معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت سلولاز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. تیمارهای لیگنین پایین فعالیت بیشتری از این آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین بالا داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت بود. از هفته هشت به بعد تیمارهای لیگنین بالا دارای فعالیت بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین بودند. نتایج نشان داد گونه‌های باکتری استفاده شده موجب افزایش فعالیت این آنزیم در بسترهای کمپوستی شده اند (شکل ۱). با توجه به افزایش دما در فاز ترموفیلی، تغییر ساختار پلیمرها رخ می‌دهد و موجب افزایش مواد سهل‌الوصول (سوبسترا) شده و منجر به افزایش فرآیند آنزیمی و رشد میکروبی در ادامه فرآیند کمپوست‌شدن می‌شود (کوشیک و همکاران، ۲۰۱۳). کاهش فعالیت این آنزیم در هفته‌های انتهایی نشان از کاهش سوبسترا، پایان روند کمپوست‌شدن و رسیدگی محصول تولیدی می‌باشد (سونها-کودا و همکاران، ۲۰۰۷). بالا بودن مواد سلولزی در تیمارهای لیگنین پایین می‌تواند دلیل افزایش فعالیت این آنزیم در این تیمارها باشد. همچنین با توجه به سخت تجزیه پذیر بودن مواد لیگنینی و تجزیه دو مرحله‌ای این مواد، بعد از هفته هشت افزایش این آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین پایین نیز ممکن است در اثر وجود مواد سهل‌الوصول در این تیمارها باشد و اتمام مواد سلولزی در تیمارهای لیگنین پایین نیز دلیل این کاهش می‌تواند باشد.





شکل ۱- تغییرات فعالیت آنزیم سلولاز در طول کمپوست‌شدن (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌ها

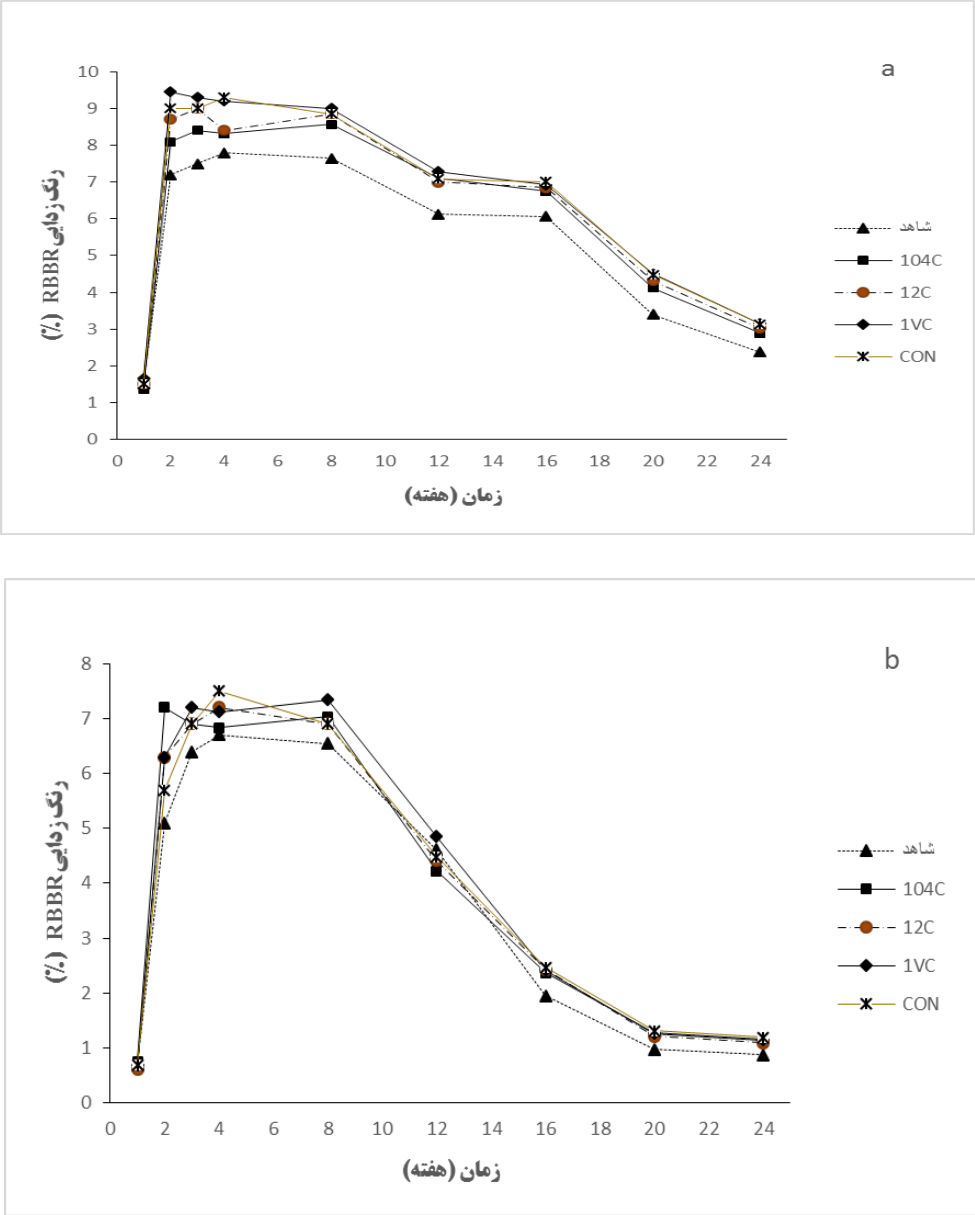
منبع تغییر	df	میانگین مربعات	
		سلولاز	لیگنیناز
باکتری	۴	۰/۹۴**	۶/۱۶**
لیگنین	۱	۳/۳۰**	۳۱۶/۴۲**
زمان	۸	۲۲۰/۵۶**	۱۳/۶۹**
باکتری*زمان	۳۲	۰/۱۳**	۰/۲۹**
باکتری*لیگنین	۴	۰/۱۴**	۱/۵۶**
باکتری*لیگنین*زمان	۴۰	۳/۰۸**	۱/۶۵**
تکرار	۲	۰/۴۸**	۰/۰۷**
خطا	۱۷۶	۰/۰۳	۰/۰۳
CV.	-	۳/۰۹	۳/۳۸

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد *معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ns غیر معنی‌دار

لیگنیناز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد فعالیت آنزیم لیگنیناز در تمامی فاکتورها معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت این آنزیم در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود. بیشترین فعالیت آنزیم لیگنیناز در فاز ترموفیلی در همه تیمارها دیده شد و کمترین آن در فاز رسیدگی مشاهده شد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 1VC ،12C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت بود و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت بودند. تیمارهای لیگنین پایین بعد از هفته ۸، کاهش شدیدی در مقدار این آنزیم داشتند درحالیکه تیمارهای لیگنین بالا دارای شیب کاهشی کمتری بودند (شکل ۲). با توجه به توان بالای تولید آنزیم لیگنیناز در این گونه‌های باکتری (همتی، ۱۳۹۷)، این گونه‌های باکتری لیگنیناز بیشتری در بسترهای

کمپوست نیز تولید کرده‌اند. با توجه به وجود سوبسترای بیشتر در تیمارهای لیگنین بالا احتمالاً همین موجب بالا بودن فعالیت آنزیم لیگنیناز در این تیمارها باشد. همچنین به دلیل سخت تجزیه پذیر بودن مواد لیگنینی احتمالاً با وجود سوبسترا در بسترهای لیگنین بالا این آنزیم در مدت زیادی در بسترهای کمپوست با مقدار زیاد تولید شده است (پلگیونی و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل ۲- تغییرات فعالیت آنزیم لیگنیناز در طول کمپوست‌شدن (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

نتیجه‌گیری

تیمارهای لیگنین زیاد دارای لیگنیناز بیشتر و سلولاز کمتری نسبت به تیمارهای لیگنین کم بودند. فعالیت سلولاز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. تیمارهای لیگنین پایین فعالیت بیشتری از این

آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین بالا داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت بود. از هفته هشت به بعد تیمارهای لیگنین بالا دارای فعالیت بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین بودند. برعکس نتایج سلولاز، فعالیت آنزیم لیگنیناز در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود. بیشترین فعالیت آنزیم لیگنیناز در فاز ترموفیلی در همه تیمارها دیده شد و کمترین آن در فاز رسیدگی مشاهده شد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 12C، 1VC و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت بود و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت بودند. تیمارهای لیگنین پایین بعد از هفته ۸، کاهش شدیدی در مقدار این آنزیم داشتند درحالیکه تیمارهای لیگنین بالا دارای شیب کاهشی کمتری بودند. در تیمارهای باکتریایی فعالیت آنزیم‌ها بیشتر از تیمار شاهد بود که نشان از توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های ذکر شده می‌باشد. نتایج نشان از امکان بررسی کاربرد این گونه‌ها به صورت تجاری دارد.

منابع

صفری سنجانی، ع. ا. ۱۳۸۲. بیوشیمی و بیولوژی خاک. دانشگاه بو علی سینا. انتشارات چاپ اول. ۳۸۴ صفحه.

عبدلی، م.ع.، رساپور، م. و کمالی، س.م. ۱۳۹۵. کمپوست (اصول مهندسی و مباحث طراحی)، ۲۹۷۳. ۲۵۲ صفحه.

علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روشهای آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. ترجمه. ۵۲۲ صفحه.

همتی، آ. ۱۳۹۷. جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست تجزیه‌کننده لیگنین برای تسریع تولید و بهبود کیفیت کمپوست. رساله دکتری تخصصی. مهندسی علوم خاک - بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک. دانشگاه تبریز.

Cunha-Queda, A.C., Ribeiro, H.M., Ramos, A. and Cabral, F. 2007. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eucalyptus bark. Bioresour. Technol. 98: 3213-3220.

Kamimura, N., Takahashi, K., Mori, K., Araki, T., Fujita, M., Higuchi, Y. and Masai, E. 2017. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade. ENV MICROBIOL REP. 9(6): 679–705.

Kaushik, P., Malik, A. and Sharma, S. 2013. Vermicomposting: an Eco-Friendly Option for Fermentation and Dye Decolourization waste disposal. Clean Soil, Air, Water. 41: 616–621.

Machado, K.M.G., Matheus, D.R. and Bononi, V.L.R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Braz J Microbiol. 36:246-252.

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. and Amorim, D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 577–591

Pollegioni, L., Tonin, F. and Rosini, E. 2015. Lignin-degrading enzymes. FEBS J. 282: 1190–1213.

Singh, S., Madlala, A.M. and Prior, B.A. 2003. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. FEMS Microbiol Rev 27:3–16

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresour. Technol. 72: 169-183.

Ulmer, D.C. and Leisola, M.S.A. 1984. Fiechter, A. Possible induction of the ligninolytic system of Phanerochaete chrysosporium. J. Biotechnol. 1: 13-24,

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. and Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Manag. 30: 771-778.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Enzymatic changes of cellulase and ligninase in different substrates of lignin and thermophilic bacteria during composting

Arash. Hemati [1]*, Nasser Aliasgharzad [2], Reza Khakvar [3]

[1] Ph.D. Tabriz University Soil Biology Biotechnology

[2] Professor of Department of Soil Sciences, University of Tabriz

[3] Assistant Professor of Department of Plant Pathology, University of Tabriz

Abstract

Research has shown that a number of microbes can be effective in decomposing organic matter decomposition. This research was conducted to investigate the process of cellulase and ligninase enzymes in substrates with different percentages of lignin as well as potent thermophilic bacteria (three isolates of 1VC (*P. validus*), 12C (*P. koreensis*) and 104C (*B. nealsonii*) during composting. The results showed that high lignin treatments had higher ligninase and less cellulase than low lignin treatments. The activity of cellulase and ligninase in the thermophilic phase increased and continued in the cooling and refluxing phase until the third month and further decreased significantly. Among the high and low lignin treatments, 104C and consortium had the highest activity and control without bacteria had the least cellulose activity. Among the high and low lignin treatments, the 12C, 1VC and consortium species had the highest activity and control treatments with the least ligninase activity. The results indicate that it is possible to investigate the use of these species commercially.

Keywords: Compost, Thermophil, Cellulase, Ligninase.

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر مقدار لیگنین و گونه‌های ترموفیل باکتری بر تنفس میکروبی طی فرآیند کمپوست شدن

آرش همتی[۱*]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، رضا خاکور[۳]

[۱] فارغ التحصیل دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

فرآیند معمولی تولید کمپوست زمان زیادی برای تجزیه نیاز دارد. این زمان می‌تواند با تلقیح میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه مواد سخت را دارند سریع تر انجام گیرد. از جمله این روش‌ها استفاده از میکروب‌هایی است که توانایی تجزیه لیگنین و سلولز را دارند. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر گونه‌های مختلف باکتریایی (سه جدایه *P. validus* 1VC، *P. koreensis* 12C و *B. nealsonii* 104C) در تجزیه مواد لیگنینی در درصدهای مختلف لیگنین انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار تنفس میکروبی به عنوان معیار اصلی فعالیت زیستی اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که بیشترین تنفس در هفته‌های اول مربوط به تیمارهای شاهد بدون باکتری بود ولی با گذشت زمان تیمارهای شاهد بیشترین کاهش تنفس را داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین، در چهار هفته بیشترین تنفس در تیمارهای لیگنین پایین مشاهده شد ولی بعد از چهار هفته اول و تقریبا تا پایان دوره کمپوست‌شدن، تیمارهای لیگنین بالا تنفس بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند. در بین گونه‌های باکتریایی استفاده شده، در بستر لیگنین پایین گونه 104C و کنسرسیوم بیشترین و تیمار شاهد کمترین تنفس و در بین تیمارهای لیگنین بالا گونه‌های 1VC و کنسرسیوم باکتریایی بیشترین و شاهد کمترین تنفس را در اوج دوره تنفس داشتند. در هر دو بستر لیگنینی تیمارهای باکتریایی در دوره ترموفیلی تنفس بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که نشان دهنده کارایی تیمارهای ترموفیلی باکتریایی در زنده‌مانی میکروبی بود.

کلمات کلیدی: کمپوست، ترموفیل، تنفس، باکتری، لیگنین

مقدمه

کمپوست‌شدن، تجزیه بیولوژیکی و تغییر شکل مواد آلی در شرایط ویژه‌ای از لحاظ رطوبت و تهویه می‌باشد که با تولید حرارت (شرایط ترموفیلیک) محصول نهایی تثبیت گردیده و عاری از عوامل بیماری‌زا و بذور گیاهان می‌شود. دیواره‌سلولی بقایای گیاهی از سه قسمت اصلی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین تشکیل شده است. ساختار سلولزی باعث شده است که تعداد اندکی آنزیم برای تجزیه آن کفایت کند. لیگنین یک پلیمر پیچیده از فنیل‌پروپان می‌باشد که پیچیده بودن ترکیب آن و داشتن حلقه‌های فنلی باعث شده است تا تجزیه بیوشیمیایی (آنزیمی) آن بسیار مشکل باشد (کلوژک- تورپینن و همکاران، ۲۰۰۳).

فرآیند معمولی تولید کمپوست زمان زیادی برای تجزیه نیاز دارد. این زمان می‌تواند با تلقیح میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه مواد سخت را دارند سریع تر انجام گیرد. از جمله این روش‌ها استفاده از میکروب‌هایی است که توانایی تجزیه لیگنین و سلولز را دارند. تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از این میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی و ترکیبات مقاوم به تجزیه موثر باشند و همچنین خصوصیات کیفی و کمی کمپوست را نیز بهبود بخشند (وارگاس-گراسیا، ۲۰۱۰).

با توجه به مسائل مطرح شده اگر از سویه‌های ترموفیلیک که توان بالایی در تجزیه ترکیبات مقاوم آلی و بهبود کیفیت کمپوست نهایی دارند، استفاده شود ضمن تسریع در روند کمپوست‌شدن، موجب بهبود کیفیت فرآورده نهایی نیز خواهند شد. در این زمینه تحقیقات زیادی در کشورهای دیگر انجام شده و تعداد محدودی از این میکروارگانیسم‌ها را معرفی نموده اند که اکثراً به صورت ثبت اختراع بوده و برای خرید آن‌ها باید مبالغ هنگفتی پرداخت شود. از طرفی نیز با توجه به متفاوت بودن شرایط آب و هوایی ایران با کشورهای دیگر و همچنین افزایش روز افزون پسماندهای شهری، لزوم تحقیقاتی جامع و کامل برای یافتن میکروارگانیسم‌های بومی که توانایی تجزیه مواد سخت تجزیه شونده (لیگنین) را داشته باشند و بکارگیری از آن‌ها در تسریع روند تجزیه پسماندهای شهری، بیش از پیش احساس می‌شود. با توجه به موارد مطرح شده، این تحقیق به منظور بررسی تاثیر گونه‌های مختلف

* ایمیل نویسنده مسئول: Hemati.arash@yahoo.com

باکتریایی در تجزیه مواد لیگنینی در درصدهای مختلف لیگنین انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار تنفس میکروبی به عنوان معیار اصلی فعالیت زیستی اندازه گیری گردید.

مواد و روش‌ها

سه جدایه ترموفیل P. validus 1VC، P. koreensis 12C و B. nealsonii 104C، که در روند قبلی تحقیقات به عنوان باکتری‌های برتر تجزیه کننده لیگنینوسلولاز شناسایی و خالص سازی شده بودند (همتی، ۱۳۹۷)، ابتدا از طریق کشت بر روی پلیت خالص‌سازی شدند. تک کلنی حاصله برای تکثیر وارد محیط کشت نوترینت براث (NB) گردید. جمعیت زادمایه کشت تازه هر جدایه باکتری در محیط کشت NB در حدود cfu.ml-1 ۴×۱۰۹ تنظیم شد (بوزاتو و همکاران، ۲۰۱۲).

برای تولید کمپوست از ضایعات بخش کشاورزی استفاده شد. برای این منظور دو بستر به شرح زیر انتخاب گردید:

بستر اول مربوط به ضایعات بخش کشاورزی با درصد لیگنین کم (در حدود ۲۰-۱۵ درصد) بود. برای این منظور از چند ماده آلی با درصدهای مختلف استفاده شد (جدول ۱).

بستر دوم مربوط به ضایعات چوب با درصد لیگنین زیاد (درحدود ۳۰- ۲۵ درصد) بود. برای این منظور از کارگاه‌های تولید چوب، ضایعات جمع‌آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب مواد استفاده شده در ایجاد تل‌های کمپوست

	برگ سیب	بقایای تر گوجه فرنگی	بقایای تر سیب زمینی	خاک اره
لیگنین کم	۳۲	۳۳	۳۲	۳
لیگنین زیاد	۵	۵	۵	۸۵

کلیه مواد مورد استفاده برای کمپوست‌شدن، در ابعاد زیر دو سانتی‌متر پودر شد. مقدار کربن و نیتروژن از تجزیه CHNSO با دستگاه آنالایزر تعیین و از حدود ۴۰ کیلوگرم اوره برای تنظیم C/N در حدود ۲۵ در تیمارهای لیگنین زیاد استفاده گردید. با استفاده از موادی که قبلا ذکر شد اقدام به تل زنی شد. تل‌ها با ۳ متر طول ۱/۵ متر عرض و ۱ متر ارتفاع با وزن تقریبی ۲۲۵۰ کیلوگرم ایجاد شدند.

هر ۵ لیتر زادمایه تهیه شده، به یک درصد از بسترهای مورد استفاده (خشک) اضافه گردید و بعد از سه روز به تل‌های مورد آزمایش اضافه و مخلوط گردید. رطوبت در طول کمپوست‌شدن در ۵۰ تا ۵۵ درصد وزنی به صورت دستی نگه‌داری شد. هوادهی نیز هر هفته یکبار با هم‌زدن انجام پذیرفت.

این تحقیق با طرح آشیانه‌ای فاکتوریل در جایگاه کمپوست شهرستان مراغه به مدت ۶ ماه اجرا شد. برای این منظور فاکتور اول شامل دو بستر آلی (بستر با درصد لیگنین زیاد و بستر با درصد لیگنین کم) و فاکتور دوم شامل جدایه‌های باکتری (سه جدایه تنها P. validus 1VC، P. koreensis 12C و B. nealsonii 104C، مخلوط سه جدایه و شاهد بدون تلقیح) بود. تیمارها با یک تکرار مجموعاً با ۱۰ تیمار انجام پذیرفت.

نتایج حاصله به کمک نرم افزار SAS تجزیه و جداول تجزیه واریانس مربوطه تهیه گردید. هم چنین مقایسه میانگین داده‌ها، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار MSTAT-C انجام شد. نمودارها به کمک نرم افزار Excel ترسیم شد.

تنفس میکروبی به روش تیتراسیون در یک ماه اول به صورت هفتگی و تا پایان کمپوست‌شدن (حدودا ۶ ماه) به صورت ماهیانه براساس زمان‌بندی فوق‌الذکر اندازه‌گیری شد (علی‌اصغرزاد، ۱۳۸۵).

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس نشان داد تاثیر نوع باکتری در سطح پنج درصد، میزان لیگنین، زمان، تاثیر متقابل باکتری*زمان، باکتری*لیگنین، باکتری*لیگنین*زمان در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). از لحاظ آماری هفته چهارم بیشترین و زمان شروع کمترین مقدار تنفس را داشت (شکل ۱). تیمارهای لیگنین بالا تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند (شکل ۲). در بین گونه‌های باکتری به جز تیمار

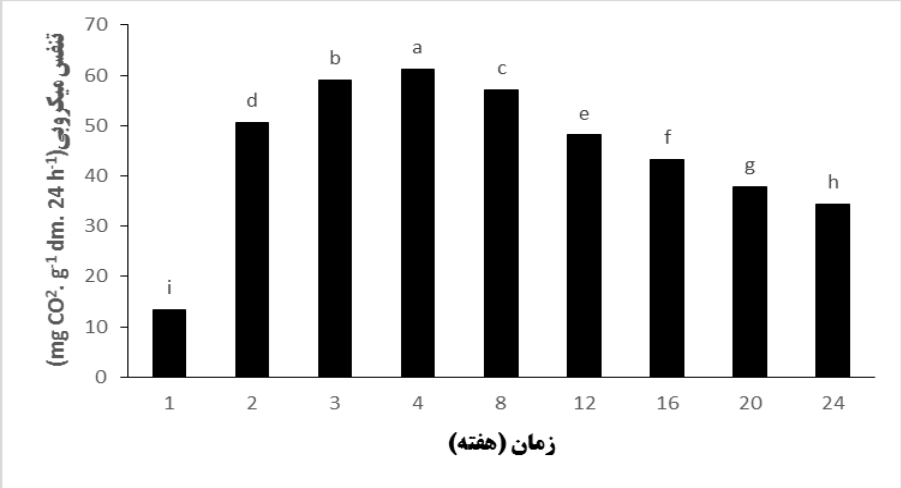
شاهد بدون باکتری لیگنین پایین بقیه تیمارها باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین تنفس در هفته‌های اول مربوط به تیمارهای شاهد بدون باکتری بود ولی با گذشت زمان تیمارهای شاهد بیشترین کاهش تنفس را داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین، در چهار هفته بیشترین تنفس در تیمارهای لیگنین پایین مشاهده شد ولی بعد از چهار هفته اول و تقریبا تا پایان دوره کمپوست‌شدن، تیمارهای لیگنین بالا تنفس بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند. در بین گونه‌های باکتریایی استفاده شده، در بستر لیگنین پایین گونه 104C و کنسرسیوم بیشترین و تیمار شاهد کمترین تنفس و در بین تیمارهای لیگنین بالا گونه‌های 1VC و کنسرسیوم باکتریایی بیشترین و شاهد کمترین تنفس را در اوج دوره تنفس داشتند (شکل ۴). بعد از هفته چهار در همه تیمارها کاهش معنی‌داری در مقدار تنفس مشاهده شد. افزایش محیط کشت (NB) به تیمارهای شاهد می‌تواند عامل اصلی افزایش جمعیت میکروبی در این تیمارها باشد. گرچه محیط کشت به همه تیمارها اضافه شده بود ولی با توجه به استفاده محیط کشت توسط باکتری‌ها در تیمارهای باکتریایی و عدم مصرف در تیمار شاهد (عناصر غذایی در محیط کشت به صورت محلول و در دسترس میکروارگانیسم‌ها قرار داشت) موجب افزایش تنفس در این تیمارها شده است. در چهار هفته نخست همانطور که الگوی دمایی نیز تایید می کند افزایش فعالیت میکروبی موجب افزایش دما شده و با افزایش دما تا مرحله ترموفیلی اکثر میکروارگانیسم‌های مزوفیل از بین رفته و موجب افت شدید تنفس بعد از هفته چهار شده است. تیمارهایی که در آن‌ها میکروارگانیسم ترموفیل به تل‌ها اضافه شده بودند نسبت به شاهد دارای تنفس بیشتری بعد از هفته چهار بود که نشان از توانایی تحمل این میکروارگانیسم‌ها و از بین نرفتن آن‌ها در این دما می‌باشد. با توجه به اینکه در تیمارهای لیگنین بالا از هفته چهار به بعد هنوز ماده آلی زیادی نسبت به تیمارهای لیگنین پایین وجود داشت، احتمالاً غذای کافی در این تیمارها وجود داشته که هنوز فعالیت میکروب‌ها کاهش نیافته است.

تیمارهای باکتریایی با داشتن حداکثر تنفس، نشان دادند که توانایی بیشتری در رشد و تکثیر و همچنین استفاده از منبع کربنی در بسترهای آلی را دارا هستند. تنفس به تعادل بین سرعت ورود کربن از طریق مواد آلی و سرعت خروج آن توسط تجزیه‌کنندگان موجود بستگی دارد (ادل، ۲۰۰۳). مطابق گزارشات قبلی، احتمالاً دلیل عدم افزایش جمعیت میکروبی با شیب قبلی بعد از هفته چهار، محدودیت در کربن آلی بستر، همچنین کمبود مواد غذایی می‌باشد، بعلاوه گزارش شده که بعد از این مرحله بدلیل کمبود منابع تغذیه، جمعیت باکتریایی کاهش و یا وارد دوره استراحت (کمون) می‌شوند (تیواری و همکاران، ۱۹۹۳ و کوشیک و همکاران، ۲۰۰۸).

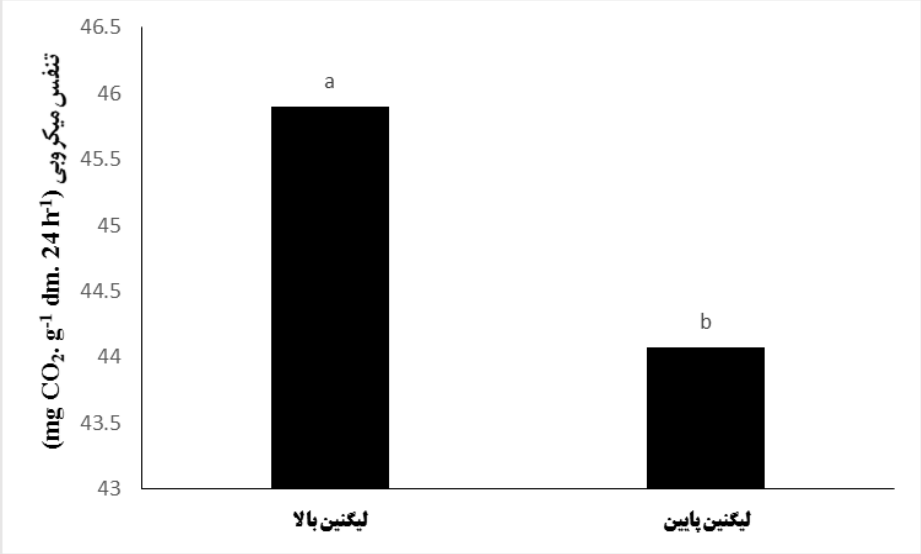
جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر تنفس میکروبی و کربن آلی

منبع تغییر	df	میانگین مربعات
		تنفس
باکتری	۴	۱۷/۳۴*
لیگنین	۱	۲۰۹/۶۸**
زمان	۸	۶۸۱۷/۰۵**
باکتری*زمان	۳۲	۵۲/۵۰**
باکتری*لیگنین	۴	۶/۷۶ns
باکتری*لیگنین*زمان	۴۰	۳۹/۵۹**
تکرار	۲	۱۴۵/۰۰**
خطا	۱۷۶	۶/۳۰
CV.	-	۵/۵۸

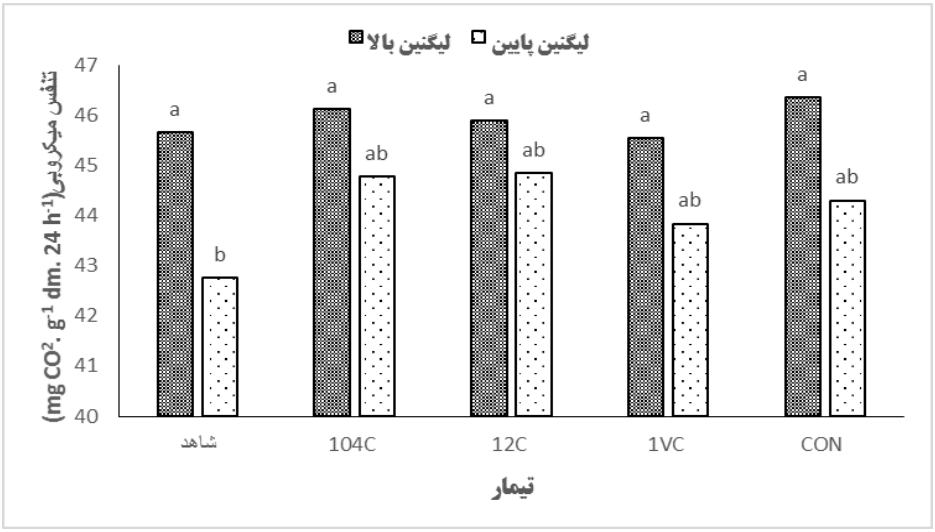
**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد *معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ns غیر معنی‌دار



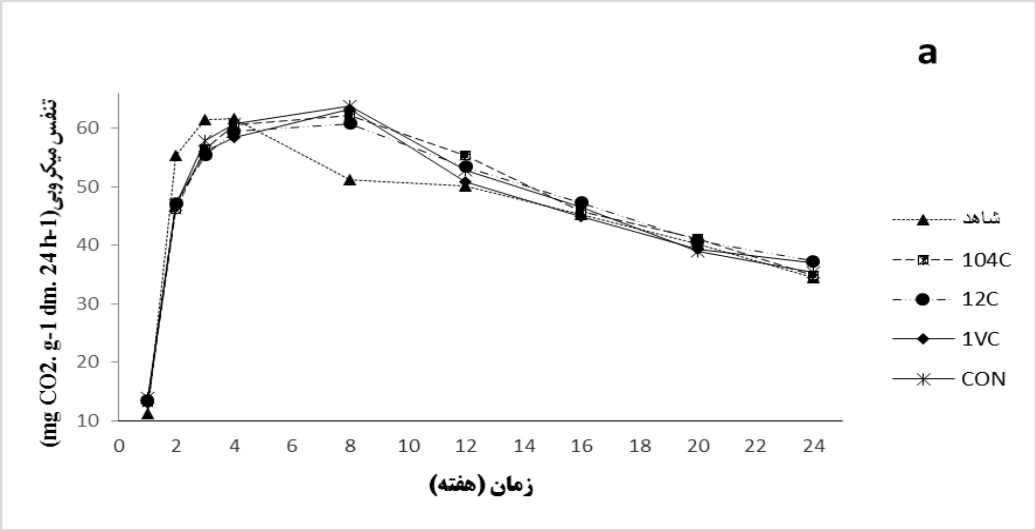
شکل۱- تاثیر زمان بر تنفس میکروبی در کمپوست

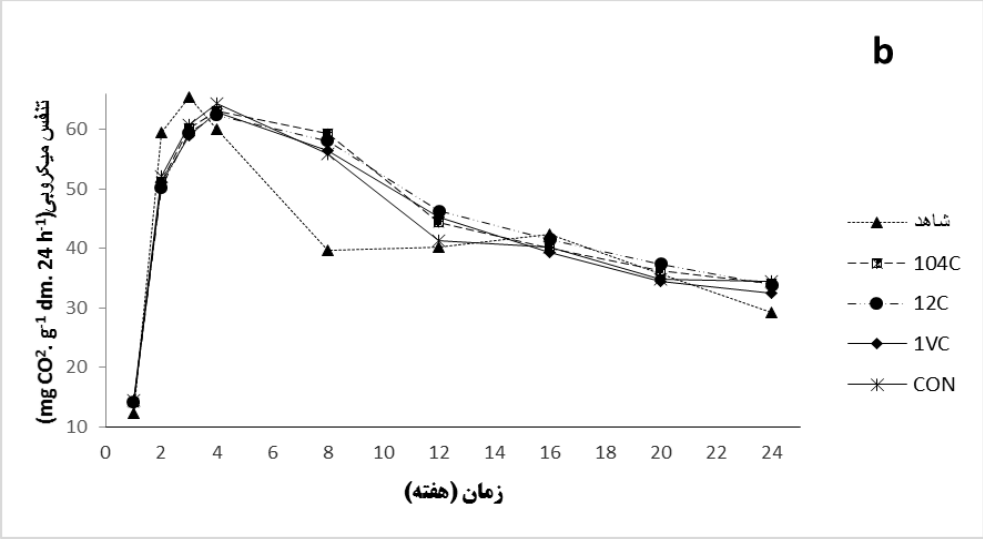


شکل۲- تاثیر میزان لیگنین اولیه بر تنفس میکروبی در کمپوست



شکل۳- تاثیر میزان لیگنین مواد اولیه و گونه باکتری بر تنفس میکروبی در کمپوست (شاهد بدون باکتری، جدایه 1VC: *Paenibacillus validus*، 12C: *Paenibacillus koreensis* و 104C: *Bacillus nealsonii*، CON: کنسرسیوم سه گونه باکتری)





شکل ۴- تغییرات تنفس میکروبی در طول کمپوست‌شدن در گونه‌های باکتریی مختلف (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

نتیجه‌گیری

با شروع فرآینده کمپوست شدن، تا هفته ۴ افزایش تنفس میکروبی مشاهده شد ولی بعد از هفته ۴ تنفس میکروبی کاهش یافت. در تیمارهای لیگنین پایین تنفس میکروبی بعد از هفته ۸ به شدت کاهش یافت درحالیکه در تیمارهای لیگنین بالا این کاهش بعد از هفته ۱۲ رخ داد. در کل تنفس میکروبی در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود که می‌تواند به دلیل تاخیر در تجزیه مواد لیگنینی و وجود مواد غذایی قابل تجزیه در این تیمارها باشد. تاثیر تیمارهای باکتریایی با توجه به نوع بستر لیگنینی متفاوت بود و در بستر لیگنین بالا 1VC و در بستر لیگنین پایین 104C بهتر از سایر گونه‌های باکتریایی عمل کردند. در هر نوع بستر لیگنینی تیمار کنسرسیوم باکتریایی موفق عمل نمود. در هر دو بستر تیمارهای باکتریایی در دوره ترموفیلی تنفس بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که نشان دهنده کارایی تیمارهای ترموفیلی باکتریایی در زنده مانی میکروبی بود.

منابع

علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روشهای آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. ترجمه. ۵۲۲ صفحه.

همتی، آ. ۱۳۹۷. جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست تجزیه‌کننده لیگنین برای تسریع تولید و بهبود کیفیت کمپوست. رساله دکتری تخصصی. مهندسی علوم خاک - بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک. دانشگاه تبریز.

Adl, S.M. 2003.The Ecology of Soil Decomposition. CAB International, Wallingford, UK.

Busato, J.G., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P. and Olivares, F.L. 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresour Technol. 110: 390–395.

Kaushik, P., Yadav, Y.K., Dilbaghi, N. and Garg, V.K. 2008. Enrichment of vermicomposts prepared from cow dung spiked solid textile mill sludge using nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. Environmentalist. 28:283–287.

Kluczek-Turpeinen, B., Tuomela, M., Hatakka, A. and Hofrichter, M. 2003. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete Paecilomyces inflatus. Appl Microbiol Biotechnol. 61:374–379

Tiwari, S.C. and Mishra, R.R. 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm cast and in uningested soil. Biol Fertil Soils. 16: 131–134.

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. and Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Manag. 30: 771-778.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of lignin and thermophilic bacterial species on microbial respiration during composting

Arash. Hemati *[1], Nasser Aliasgharzad [2], Reza Khakvar [3]

[1] Ph.D. of Tabriz University Soil Biology Biotechnology

[2] Professor of Department of Soil Sciences, University of Tabriz

[3] Assistant Professor of Department of Plant Pathology, University of Tabriz

Abstract

The typical process of composting requires a lot of time to decompose. This time can be faster by inoculating microorganisms that can decompose hard materials. One of these methods is the use of microbes that can break down lignin and cellulose. This research was carried out to evaluate the effect of different bacterial species (three isolates of 1VC (*P. validus*), 12C (*P. koreensis*) and 104C (*B. nealsonii*)) on Lignin decomposition in different percentages of lignin. For this purpose, microbial respiration rate was measured as the main criterion for biological activity. The results showed that the highest respiration in the first weeks was related to the control without bacteria, but with time, the control treatments had the most decreased respiration. Among the high and low lignin treatments, the highest respiration was observed in low lignin treatments on the four weeks, but after the first four weeks and almost to the end of the composting period, high lignin treatments had higher respiration compared to low lignin treatments. Among the bacterial species, the low lignin bed was 104C and the consortium had the highest and control treatment had the least respiration. Among the high lignin treatments, 1VC species and bacterial consortium were highest, and control treatment had the lowest respiration at peak respiration. In both lignin beds, bacterial treatments had a higher respiration rate in the thermophilic period than control treatment, indicating the effectiveness of bacterial thermophilic treatments in microbial survival.

Keywords: Compost, thermophile, respiration, bacteria, lignin.

* Corresponding author, Email: Hemati.arash@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر قارچ مایکوریزا بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و قند محلول گیاه دارویی مرزنجوش

بهناز آتش‌پز[۱*]، الهام فرخی[۲]، محسن برین[۳]، امیر رحیمی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گرگان

[۲] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۴] استادیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار از قارچ‌های همزیستی هستند که باعث ایجاد ارتباط بین خاک و ریشه گیاهان می‌شوند. رنگیزه‌های فتوسنتزی و قند محلول از مهمترین ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاهان می‌باشند. به منظور بررسی اثر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) و قند محلول مرزنجوش، آزمایشی بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و در سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل سه سویه قارچ میکوریز (Glomus fasciculatum، Glomus intraradices و Glomus etanicatum) و تیمار بدون تلقیح قارچ میکوریز (شاهد) بودند. نتایج نشان داد بیشترین محتوای کلروفیل a (۱۵/۹۳ میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل b (۴/۷۱ میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل کل (۲۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم) و قند محلول (۲/۹۸ میلی‌گرم بر گرم) در مرزنجوش تلقیح شده با مایکوریز G. fasciculatum و بیشترین مقدار کاروتنوئید (۳/۲۵ میلی‌گرم بر گرم)، در تیمار G. intraradices مشاهده شد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت سویه G. fasciculatum بیشترین تاثیر را بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و قند محلول گیاه دارویی مرزنجوش داشت.

کلمات کلیدی: کاروتنوئید، کلروفیل، گلوموس، مرزنجوش

مقدمه

همزیستی مایکوریزایی از مهمترین روابط همزیستی بین قارچ و ریشه گیاهان در کره زمین می‌باشد. آثار مفید و مثبت همزیستی مایکوریزایی بر رشد گیاهان مختلف به اثبات رسیده است. مایکوریز آربوسکولار مهمترین نوع قارچ مایکوریز است و بخش مهمی از منبع آلی در سیستم‌های کشاورزی را به خود اختصاص داده است (Tahat و همکاران، ۲۰۱۰). این قارچ با ایجاد رابطه همزیستی با ریشه اغلب گیاهان منجر به بهبود ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان و حفظ تعادل در تنوع زیستی خاک می‌شود. اغلب گیاهان زراعی قادر به برقراری رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزا می‌باشند. همزیستی که بین اغلب گیاهان آوندی با قارچ‌های مایکوریز موجود در خاک وجود دارد متعلق به سه کلاس Basidiomycetes، Ascomycetes و Zygomycetes است (Kristek و همکاران، ۲۰۰۵) که در نتیجه این همزیستی گیاه مواد کربنه را در اختیار قارچ قرار داده و قارچ، آب و مواد غذایی را به گیاه منتقل می‌کند.

گیاه دارویی مرزنجوش بخارایی با نام علمی (Origanum vulgare L. Subsp. gracile) از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعناعیان بوده و دارای ارتفاع ۳۰-۵۰ سانتی‌متر،گل‌های سفید یا بنفش و برگ‌های متقابل نوک تیز و دندانه‌ای است. این گیاه در ایران در نواحی شمال، شمال غرب، شرق و غرب استان‌های گیلان، مازندران، آذربایجان و کردستان پراکنش دارد (LaGow، ۲۰۰۴). مرزنجوش به عنوان دارویی مدر، ضد عفونی کننده و مسکن بوده و در درمان بیماری‌های روده و معده کاربرد دارد (Kordali و همکاران، ۲۰۰۸).

تحقیقات نشان داده است همزیستی قارچ مایکوریزا با ریشه نعناع از طریق افزایش جذب آب و عناصر غذایی، سبب افزایش فتوسنتز و عملکرد بیولوژیک گردید (Gupta و همکاران، ۲۰۰۲). تحقیقات زیادی در رابطه با تلقیح مایکوریز و تاثیر آن بر رنگیزه‌های فتوسنتزی (اصغری و همکاران، ۱۳۹۰) و کاروتنوئیدها (Fester و همکاران، ۲۰۰۲) انجام گرفته است. افزایش محتوای کلروفیل برگ در پاسخ به تلقیح با قارچ مایکوریزا در مطالعات پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Demir، ۲۰۰۴). Selvaraj و همکارن (۲۰۰۹) ، گزارش کردند محتوای کلروفیل a و b در گیاه Pogostemon patchouli آمیخته با قارچ مایکوریز نسبت به شاهد افزایش یافت. گزارش شده است گیاه کاهو تلقیح شده با مایکریز سویه fasiculatum سطوح بالایی از کاروتنوئیدها را دارا می‌باشد (Baslam و همکاران، ۲۰۱۱). Demir (۲۰۰۴) ، گزارش کرد محتوی قند محلول در گیاهان فلفل همزیست با

* ایمیل نویسنده مسئول: atashpazb@gmail.com

قارچ G. intraradices به طور معنی‌داری بالاتر از گیاهان شاهد غیر مایکوریزایی بود. با توجه به اینکه رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات محلول از مهمترین ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان می‌باشند، بنابرین هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر قارچ‌های مایکوریزا بر میزان قند محلول و محتوای کلروفیل و کارونتوئید گیاه دارویی مرزنجوش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه بر پایه طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل چهار سویه قارچ مایکوریزا (G. intraradices, G. fasciculatum, G. etanicatum) و تیمار شاهد (بدون مایکوریز) بودند. گلدان‌های سه کیلویی حاوی مخلوط ۱:۱ خاک و ماسه استریل شده برای کشت گیاهان به کار گرفته شد و برای هر گلدان ۶۰ گرم مایه تلقیح حاوی قارچ مایکوریزا در قسمت زیر ریشه گیاه مرزنجوش قرار داده شد. برای تیمار شاهد نیز از همان مقدار مایه تلقیح ولی به صورت استریل شده استفاده شد. سه ماه بعد از اعمال تیمارها و رسیدن گیاهان به رشد مطلوب، عمل برداشت صورت گرفت. محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و قند محلول در نمونه برگ‌تر گیاه اندازه‌گیری شد.

محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: ۰/۱گرم از برگ تازه به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی سائیده شده و عصاره حاصله به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. جذب فاز بالایی نمونه‌ها توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۶۲-۶۴۵-۶۴۷۰ نانومتر قرائت شد و سپس میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه محاسبه و بیان شد (Lichtenthder، ۱۹۸۷). میزان کلروفیل کل از مجموع کلروفیل a و b بدست آمد.

$$Chl\ a = 11.75 \times A662 - 2.360 \times A645 \quad (۱)$$

$$Chl\ b = 18.61 \times A645 - 3.960 \times A662 \quad (۲)$$

$$C\ x = 1000A470 - 2.270\ Chl\ a - 81.4\ Chl\ b / 227 \quad (۳)$$

$$ChlT = chla + chlb \quad (۴)$$

A_{662}، A_{645} و A_{470} به ترتیب نشان دهنده جذب در طول موج‌های ۶۶۲،۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر است.

Chl_a، Chl_b، Chl_T و C_x به ترتیب نشان دهنده مقدار کلروفیل a، کلروفیل b ،کلروفیل کل و کاروتنوئید هستند.

قند محلول: ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ به همراه ۵ میلی‌لیتر آب مقطر درون هاون چینی سائیده شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۱ میلی-لیتر از عصاره صاف شده ، ۱ میلی‌لیتر فنول ۵٪ ، و ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه شد و بعد از یک ساعت میزان جذب محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد (Dubois و همکاران، ۱۹۵۶). میزان قند محلول با منحنی استاندارد گلوکز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار costat و رسم نمودارها با Excel انجام گرفت. همچنین به منظور مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

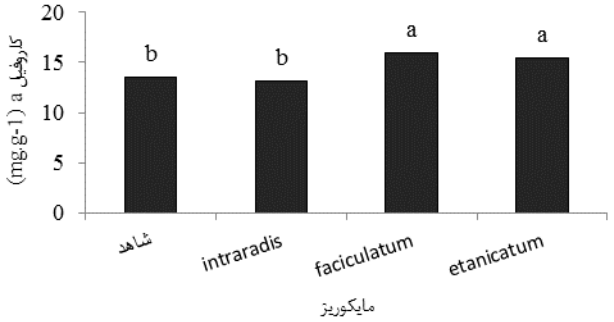
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تلقیح گیاه دارویی مرزنجوش با سویه‌های مختلف قارچ مایکوریز اثر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۰/۱ درصد و محتوای کلروفیل b و قند محلول در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول۱).

جدول۱. نتایج تجزیه واریانس تأثیر قارچ‌های مایکوریز بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و قند محلول مرزنجوش

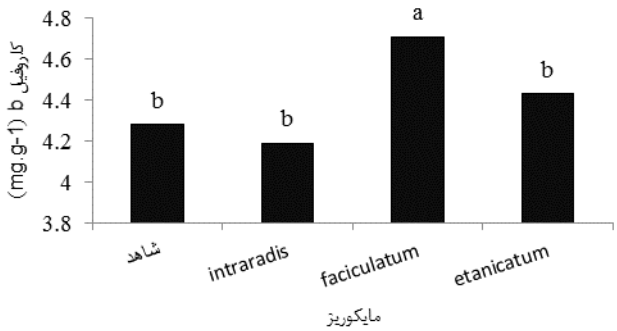
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کلروفیل a ($mg.\ g^{-1}$)	کلروفیل b ($mg.\ g^{-1}$)	کلروفیل کل ($mg.\ g^{-1}$)	کاروتنوئید ($mg.\ g^{-1}$)	قند محلول ($mg.\ g^{-1}$)
مایکوریز	۳	۵/۹***	۰/۱۵**	۷/۷۶***	۰/۷۶***	۰/۵۴**
اشتباه آزمایشی	۸	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۰۰۵	۰/۰۴
ضریب تغییرات(٪)	-	۲/۱	۳/۱	۱/۹	۲/۸	۷/۱

* * * و * * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۰/۱ و ۱ درصد

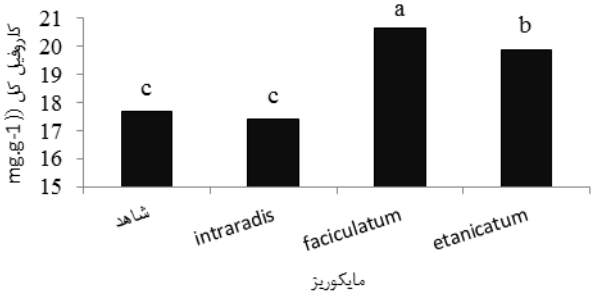
نتایج نشان داد، بیشترین محتوای کلروفیل a، b و کل در گیاه مرزنجوش تلقیح شده با مایکوریز سویه Glomus fasciculatum و کمترین مقادیر آنها در سویه Glomus intraradices مشاهده شد. با توجه به (شکل۱)، بین تیمارهای G. fasciculatum و G. etanicatum از لحاظ بیشترین محتوای کلروفیل a، و بین تیمارهای G. intraradices و شاهد از لحاظ کمترین مقدار آن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین مقدار کلروفیل b در تیمار G. fasciculatum بود و سایر تیمارها در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل۲). محتوی کلروفیل کل از بیشترین به کمترین به ترتیب مربوط به مرزنجوش تلقیح شده با سویه‌های G. fasciculatum، G. etanicatum، شاهد و G. intraradices بود (شکل۳). افزایش میزان کلروفیل برگ‌ها در اثر همزیستی مایکوریزایی می‌تواند به دلیل افزایش جذب فسفر از خاک و نقش آن به عنوان حامل انرژی در طی فتوسنتز توسط این قارچ باشد (Eissenstat و همکاران، ۱۹۹۳). همچنین گزارش شده است، قارچ مایکوریز به جذب منیزیم در گیاه کمک کرده و سنتز کلروفیل را افزایش می‌دهد (Joshee و همکاران، ۲۰۰۷). Selvaraj و همکارن (۲۰۰۹) ، گزارش کردند محتوای کلروفیل a و b در گیاه Pogostemon patchouli آمیخته با قارچ مایکوریز نسبت به شاهد افزایش یافت. گزارش شده است، میزان کلروفیل کل در برگ‌های گیاه Prosopis juliflora تلقیح شده با سویه قارچ مایکوریز G. fasciculatum افزایش یافت (Selvaraj و Chellappan ، ۲۰۰۶).



شکل۱. تاثیر گونه‌های مختلف قارچ مایکوریز بر محتوای کلروفیل a مرزنجوش

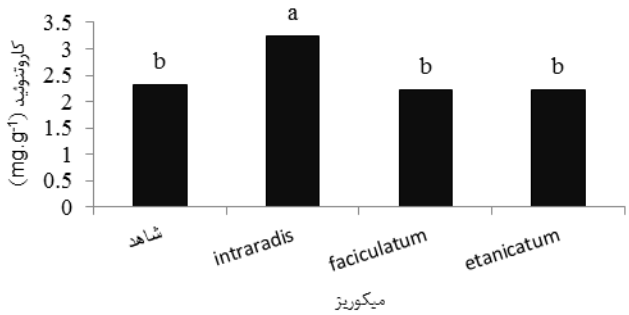


شکل۲. تاثیر گونه‌های مختلف قارچ مایکوریز بر محتوای کلروفیل b مرزنجوش



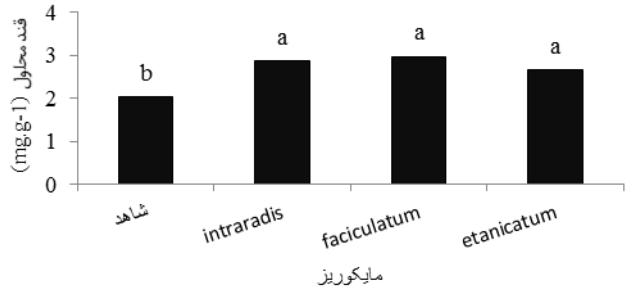
شکل۳. تاثیر گونه‌های مختلف قارچ مایکوریز بر محتوای کلروفیل کل مرزنجوش

با توجه به شکل۴ مشخص شد بیشترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار G. intraradices بود و سایر تیمارهای آزمایش در یک گروه آماری قرار گرفتندو تقریبا دارای مقدار کاروتنوئید مشابهی بودند. گزارش شده است سیب زمینی مایکوریزایی با سویه G. intraradices محتوای کاروتنوئید بیشتری نسبت به گیاه غیر مایکوریزایی داشت (Louche-Tessandier و همکاران، ۱۹۹۹).



شکل۴. تاثیر گونه‌های مختلف قارچ مایکوریز بر محتوای کاروتنوئید مرزنجوش

بیشترین مقدار قند محلول گیاه، در مرزنجوش تلقیح شده با قارچ مایکوریز G. fasciculatum مشاهده شد و با قارچ و G. etanicatum و G. intraradices در یک گروه آماری قرار گرفت و کمترین مقدار قند محلول در تیمار شاهد بدست آمد (شکل۵). احتمالا کاربرد قارچ مایکوریزا با افزایش جذب پتاسیم توسط گیاه، سبب افزایش تولید قندهای محلول نسبت به تیمار شاهد شده است. گزارش شده است دلیل افزایش قند محلول در گیاهان مایکوریزایی، افزایش سطح هورمون سایتوکینین و جیبرلین در گیاهان تلقیح شده می‌باشد که فعالیت این هورمون‌ها می‌تواند با انتقال یون‌های موثر در باز شدن روزنه‌ها و تنظیم سطح کلروفیل، موجب افزایش سرعت فتوسنتز وافزایش محتوی کربوهیدرات‌ها در گیاه شود(Selvaraj و Chellappan، ۲۰۰۶).



شکل۵. تاثیر گونه‌های مختلف قارچ مایکوریز بر محتوای قند محلول مرزنجوش

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، استفاده از قارچ‌های مایکوریز سبب افزایش میزان قند محلول و رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه دارویی مرزنجوش نسبت به شاهد شده است و بالاترین نتایج بدست آمده مربوط به تیمار G. fasciculatum در مقایسه با سایر سویه‌های قارچی بود. با انتخاب و ترکیب گیاه میزبان با قارچ همزیست مناسب می‌توان به نحو موثری از همزیستی در افزایش ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه و در نهایت تولید محصولات با کیفیت بهره جست.

منابع

اصغری، ح.ر.، عامریان، م.ر.، بهادری، ف.، رحیمی، م. و گلشن، م. ۱۳۹۰. اثر مایکوریزا و اسید هیومیک بر صفات کیفی و کیفی *Satureja hortensis* در سطوح مختلف اوره. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود.

Baslam, M., Garmendia, I. and Goicoechea, N. 2011. Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. Journal of agricultural and food chemistry. 59: 5504-5515.

Demir, S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology, 28: 85 - 90.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances Analytical Chemistry. 38(3):3.

Eissenstat, D.M., Graham, J.H., Syvertsen, J.P. and Drouillard, D.L.1993. Carbon economy of sour orange in relation to mycorrhizal colonization and phosphorus status. Annals of Botany, 71: 1 – 10.

Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M.H., Giuliano, G., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Hause, B. and Strack, D. 2002. Stimulation of carotenoid. Metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. Planta, 216(1): 148-154.

Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasiculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology, 81: 77–79.

Joshee, N., Mentreddy, S.R. and Yadav, K. 2007. Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated Scutellaria integrifolia plants. Industrial Crops and Products. 25: 169-177.

Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M. and Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish Origanum acutidens and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. Bioresource Technology, 99(18): 8788-8795.

Kristek, S., Kristek, A. and Pavlovic, H., 2005. The influence of mycorrhizal fungi (*Glomus* sp.) On field pea plant survival and growth in drought caused stress conditions. Plant, Soil and Environment, 51: 385-389.

LaGow, B. 2004. PDR for herbal Medicine. Third edition Thomson PDR, USA, pp609-808. -

Lichtenthder, H.K.1987.Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.

Louche-Tessandier, D., Samson, G., Hernandez-Sebastia, C., Chagvardieff, P. and Desjardins, Y. 1999. Importance of light and CO 2 on the effects of endomycorrizal colonization on growth and photosynthesis of potato plantlets (Solanum tuberosum) in an invitro tripartite system. New Phytologist. 142: 539-550.

Selvaraj, T. and Chellappan .P. 2006. Arbuscular mycorrhizae: A diverse personality. Central European Journal of Agronomy, 7: 349-358.

Selvaraj, T., Mathan,C. and Rajeshkumar, N.C. 2009. Effect of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi on some growth parameters and phytochemical constituents of Pogostemon patchouli Pellet. Maejo International Journal Science Technology, 3(10):222-234.

Tahat, M.M., Sijam, K. and Othman, R. 2010. The role of tomato and corn root exudates on Glomus mosseae spores germination and Ralstonia Solanacearum. Growth in vitro. International journal of plant pathology. 1: 1-12.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic pigments and soluble sugar of oregano herb

Atashpaz*[1], B., Farrokhi[2], E., Barin, M.[3] Rahimi, A. [4]

[1] PHD. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Gorgan, Iran
[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran
[3] Assistant Prof., Agronomy Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran

Abstract

Arbuscular mycorrhizae are the symbiotic fungi that cause the relationship between the soil and root of the plants. Photosynthetic pigments and soluble sugars are the most important physiological properties of plants. In order to investigate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids), and soluble sugar of oregano, a completely randomized design with four treatments and three replications was carried out. The treatments consisted of three species of mycorrhizal fungi (*Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus etanicatum*) and non-inoculated mycorrhizal fungus (control). The results showed that the highest content of chlorophyll a (15.93 mg .g^{-1}), chlorophyll b (4.71 mg .g^{-1}), total chlorophyll (20.64 mg .g^{-1}), and soluble sugar (98.2 mg .g^{-1}) in in *G. fasciculatum* treatment and the highest countent of carotenoids (3.25 mg . g^{-1}) was observed in *G. intraradices* treatment. Generally, it can be concluded that the *G. fasciculatum* mycorrhizal fungi had the greatest effect on the photosynthetic pigments and the soluble sugar of marijuana herb.

Keywords: carotenoid, chlorophyll, *Glomus*, oregano

* Corresponding author, Email: atashpazb@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر کودهای زیستی و نانو اکسید آهن و روی بر عملکرد و اجزای پر شدن دانه گندم در شرایط شوری خاک

رئوف سیدشریفی*[۱] علیرضا پیرزاد[۲]

[۱] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

[۲] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

به منظور بررسی تاثیر کودهای زیستی و نانو اکسید آهن و روی بر عملکرد و اجزای پر شدن دانه گندم در شرایط شوری خاک، آزمایش فاکتوریلی در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل شوری خاک در سه سطح (صفر به عنوان شاهد و اعمال شوری‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار در خاک به ترتیب معادل با ۲/۳ و ۴/۶ دسی‌زیمنس بر متر) با استفاده از آب آبیاری و از طریق نمک NaCl و تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد (عدم تلقیح، تلقیح بذر با ازتوباکترکروکوکوم استرین ۵، آزوسپریلیوم لیپوفروم استرین OFو سودوموناس پوتیدا استرین ۱۸۶) و محلول پاشی (بدون محلول پاشی، محلول پاشی با نانواکسید آهن، محلول پاشی با نانواکسید روی و محلول پاشی توام نانواکسید آهن و روی) بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش-ترین مولفه‌های پر شدن دانه (حداکثر وزن دانه، سرعت پر شدن دانه، طول دوره پر شدن دانه و دوره موثر پر شدن) و عملکرد (۲/۴۹ گرم در بوته) در عدم اعمال شوری، کاربرد باکتری سودوموناس و محلول پاشی توأم نانواکسید روی و آهن و کم‌ترین آنها و عملکرد (۱/۹۴گرم در بوته) در شوری ۵۰ میلی‌مولار، عدم کاربرد باکتری و عدم محلول پاشی بدست آمد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، عناصر ریز مغذی، گندم، تنش

مقدمه

شوری یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که منجر به کم آبی سلول همراه با تغییرات اسمزی می‌شود (Wang et al., 2009). از دست رفتن حاصلخیزی خاک در اثر شوری بیش از حد، یکی از مشکلات اساسی تولید محصولات کشاورزی است. اثر تنش شوری در مناطق خشک و نیمه خشکی که با محدودیت بارندگی و تبخیر و تعرق بالا همراه است بیشتر مشهود است (Azevedo Neto et al., 2006). مهمترین واکنش گیاه به شوری خاک یا آب، کاهش رشد است. اگر غلظت املاح به بیش از آستانه تحمل گیاه برسد، به موازات افزایش غلظت املاح محلول (شوری)، رشد گیاه کاهش می‌یابد، که البته آهنگ کاهش رشد در گیاهان مختلف متفاوت است (Mabood and Smith, 2005). این تنش با کاهش سطح فتوسنتزی در اثر تنش اسمزی ناشی از تنش شوری، ضمن کاهش طول دوره و افزایش سرعت پر شدن دانه (Pessarakli, 1999) موجب بر هم زدن تعادل تغذیه‌ای در گیاه می‌شود. با تکمیل مصرف عناصر غذایی کم مصرف از طریق محلول‌پاشی، می‌توان وضعیت رشد گیاه را در شرایط تنش بهبود بخشید. در این راستا استفاده از نانو ذرات به دلیل سرعت جذب، انتقال و تجمع بیشتر نانو ذرات در مقایسه با فرم معمولی بسیار موثر تر است. مظاهری‌نیا و همکاران (Mazaherinia et al 2010.) در مقایسه کارایی نانواکسید آهن و آهن معمولی گزارش کردند که نانواکسید آهن در مقایسه با آهن معمولی، از تأثیر معنی‌داری در افزایش آهن گیاه برخوردار بود. نتایج بررسی‌های جیانگ و همکاران (Jiang et al, 2013) نشان دادند که روی نقش مهمی در تجمع مواد فتوسنتزی در دانه‌ها در طی مرحله پر شدن دانه ایفا می‌کند و با افزایش طول دوره پر شدن دانه، موجب افزایش غلظت روی در دانه‌ها می‌شود. بررسی‌های تیمسینا (Timsina, 2013) نشان داد روی و آهن موجب افزایش فتوسنتز و طول دوره پر شدن دانه گندم گردید. یکی از استراتژی های مقابله با شوری پیش تیمار بذر با انواع مختلفی از باکتری‌ها محرک رشد است. این میکروارگانیسم‌ها توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیر قابل دسترس به فرم قابل دسترس طی فرایندهای بیولوژیکی داشته و منجر به توسعه سیستم ریشه‌ای و جوانه‌زنی بهتر بذور می‌گردند (Vessey, 2003).

اینکه آیا سازوکاری که توسط این باکتری‌ها انجام می‌شود تأثیر خاص گیاه است و یا نه، هنوز به طور کامل مشخص نشده است (Arshad and Frankenberger, 2002). باشان و همکاران (Bashan et al., 1989) گزارش کردند باکتری‌های متصل به ریشه‌ها در شرایط شوری، غلظت سدیم را در اندام هوایی گیاه محدود نموده و با نگه داشتن سطح پایین اتیلن تنشی از طریق فعالیت ACC دی‌آمیناز، رشد گیاه را تسریع می‌کنند. ساتوویچ (Saatovich, 2006) با بررسی تأثیر سویه‌های مختلف آزوسپیریلوم در افزایش مقاومت گندم به شوری نشان داد که عملکرد گیاه تا ۶۳/۴ درصد

* نویسنده مسئول raouf_ssharifi@yahoo.com

نسبت به شاهد افزایش یافت. گرامر و همکاران (Gramer et al., 1994) دلیل تعدیل اثر مخرب تنش شوری را در شرایط پیش تیمار بذر با باکتری های محرک رشد، به توانایی تولید هورمون‌های گیاهی و همچنین افزایش توان ریشه در جذب آب نسبت دادند. با توجه به کمبود عناصر ریز مغذی در بیشتر خاک‌های کشور و اهمیت محلول پاشی این عناصر در تعدیل بخشی از اثرات تنش و بررسی‌های محدود انجام شده در این راستا موجب شد تا اثر تلقیح بذر با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه و محلول‌پاشی با نانواکسید آهن و روی بر روند پر شدن و عملکرد دانه گندم در شرایط شوری خاک مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۳ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل شوری خاک در سه سطح (صفر به عنوان شاهد و اعمال شوری‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار در خاک به ترتیب معادل با ۲/۳ و ۴/۶ دسی‌زیمنس بر متر) با استفاده آب آبیاری و از طریق نمک NaCl و تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد (عدم تلقیح، تلقیح بذر با ازتوباکتر، آزوسپریلیوم و سودوموناس) و محلول پاشی در چهار سطح (بدون محلول پاشی، محلول پاشی با نانواکسید آهن، محلول پاشی با نانواکسید روی و محلول پاشی با نانواکسید آهن + روی) بودند. کودهای زیستی از موسسه خاک و آب تهران و نانواکسید آهن و روی تولید کشور چین بود که از موسسه تجهزات آزمایشگاهی و شیمیایی جهان کیمیای ارومیه تهیه شد. مقدار نمک مورد نیاز برای هر یک از سطوح شوری در خاک، با استفاده از نرم افزار Salt calc محاسبه و از طریق آب آبیاری اعمال شد. در این نرم افزار به استناد هدایت الکتریکی خاک و درصد عصاره اشباع، مقدار نمک مورد نیاز برای هر کیلوگرم خاک گلدان محاسبه شده و به گلدان در دو مرحله از دوره رشد (مرحله بعد از کاشت و مرحله ۴-۳ برگی همراه آب آبیاری) اعمال شد. بقیه آبیاری‌ها در دیگر مراحل رشدی گیاه، با آب معمولی انجام شد. برای حفظ شوری در طول دوره رشد در زیر هر گلدان زیر گلدانی قرار داده شد تا بعد از هر سه تا چهار نوبت آبیاری، نمک‌های احتمالی وارد شده به زیر گلدانی دوباره در آب حل شده و به داخل هر گلدان برگردد. برای تلقیح بذر با باکتری‌های مورد نظر، از مایه تلقیحی که هر گرم آن دارای 10^7 عدد باکتری زنده و فعال بود استفاده شد. سپس ۴۰ عدد بذر در هرگلدان برای اعمال تراکم ۴۰۰ بذر در متر مربع کشت شد. محلول‌پاشی در دو مرحله از دوره رشد رویشی (مرحله ۳ تا ۴ برگی و مرحله قبل از ظهور سنبله) انجام شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد با طول دوره روشنایی ۱۶-۱۵ ساعت (با استفاده از ترکیبی از لامپ های معمولی و مهتابی) نگهداری شدند. برای ارزیابی سرعت و طول دوره پرشدن دانه، نمونه‌برداری از ۲۱ روز بعد از خوشه‌دهی در فواصل زمانی هر ۵ روز یک بار و هر بار دو خوشه از هر گلدان انتخاب و بعد از انتقال به آزمایشگاه دانه‌ها و قرارگیری در آون، وزن خشک تک بذر از محاسبه وزن خشک کل به تعداد بذر برآورد شد. به منظور برآورد، تجزیه و تحلیل و تفسیر پارامترهای مربوط به پر شدن دانه از یک مدل رگرسیون خطی (دو تکه‌ای) از رابطه ۱ بر اساس رویه DUD دستورالعمل Proc NLIN نرم افزار SAS استفاده شد (رونانینی و همکاران، ۲۰۰۴).

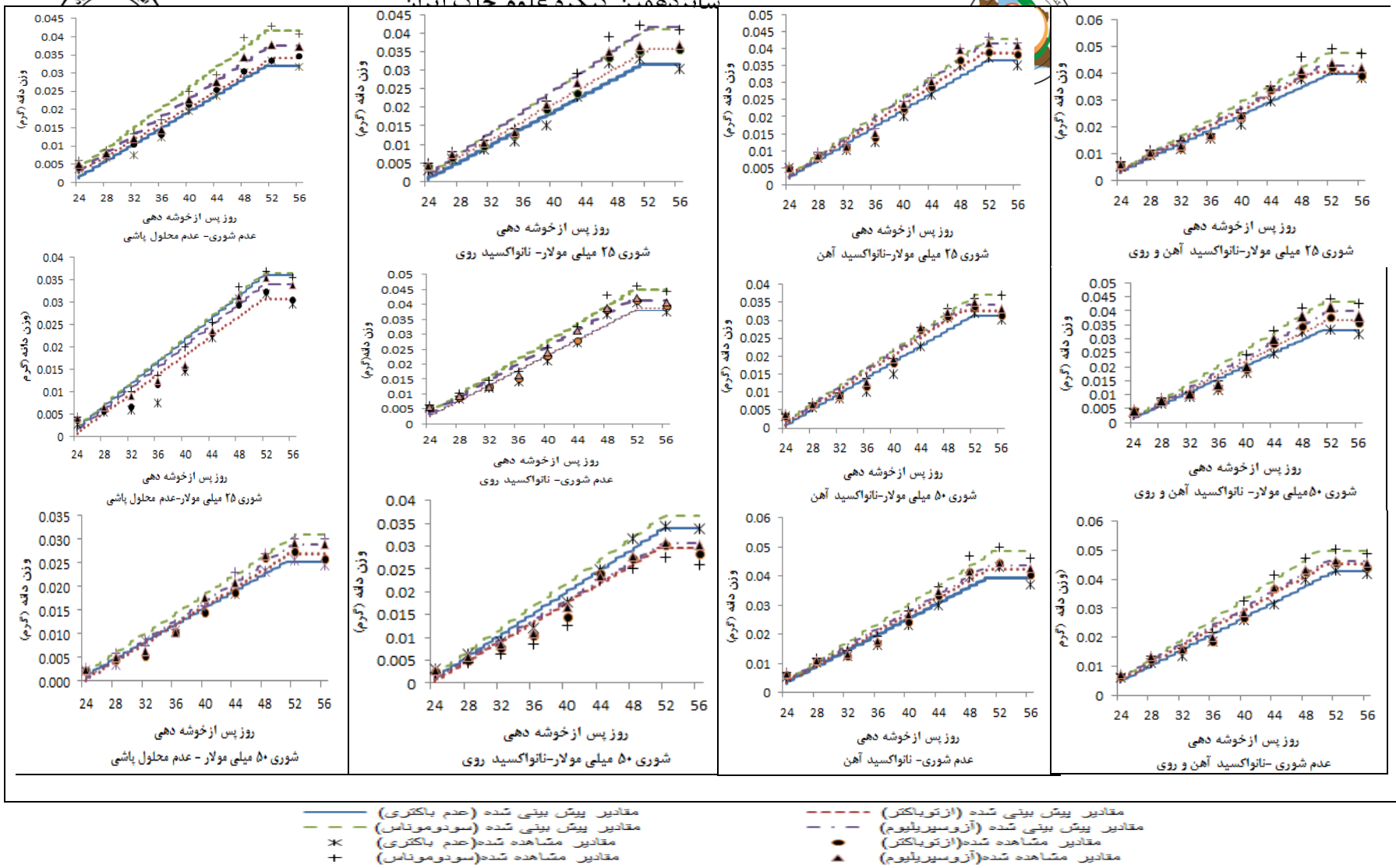
رابطه (۱)

$$Gw=\begin{vmatrix} a+bt_0 & t<t_0 \\ a+bt & t>t_0 \end{vmatrix}$$

در این رابطه GW وزن دانه، t زمان و b سرعت پرشدن دانه است، t_0 پایان دوره پرشدن دانه و a عرض از مبدأ است. این مدل تغییرات وزن دانه نسبت به زمان را به دو مرحله تفکیک می‌کند: مرحله اول که در حقیقت مرحله خطی پرشدن دانه است، وزن دانه تا رسیدن به حداکثر مقادیر خود در زمان t_0 که در حقیقت زمان رسیدگی وزنی است، به صورت خطی افزایش پیدا می‌کند. شیب خط رگرسیون در این مرحله ($t < t_0$) سرعت پرشدن دانه را نشان می‌دهد. با برازش این مدل بر کلیه داده‌ها ابتدا دو پارامتر مهم پر شدن دانه یعنی سرعت پرشدن دانه (b) و زمان رسیدگی وزنی (t_0) بدست آمده و سپس مقدار عددی t_0 در قسمت دوم رابطه (۱) قرار داده شد و GW که وزن دانه است محاسبه گردید. برای تعیین دوره موثر پرشدن دانه از رابطه EFP=MGW / GFR استفاده شد (الیس و پیتا، ۱۹۹۲). در این رابطه EFP دوره موثر پرشدن دانه، MGW حداکثر وزن دانه و GFR سرعت پرشدن دانه است. برای تخمین عملکرد دانه، در زمان رسیدگی ۱۰ بوته از هر گلدان از بین بوته‌های رقابت کننده برداشت و میانگین داده‌های حاصل به عنوان ارزش آن صفت در تجزیه و تحلیل داده‌ها به کار گرفته شد. تجزیه داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای SAS و Excel و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بررسی روند پرشدن دانه گندم در سطح ثابت از سطوح شوری و محلول‌پاشی و در حالات مختلف تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد، نشان داد الگوی نمو بذر در ابتدا در حالت عدم تلقیح و تلقیح بذر با کلیه‌ی باکتری‌ها مشابه است. بدین ترتیب که ابتدا وزن دانه به صورت خطی افزایش یافته و به حداکثر خود رسید (رسیدگی وزنی)، پس از این مرحله، وزن دانه از تغییراتی چندانی برخوردار نبود و به صورت یک خط افقی در آمد (شکل ۱). بین باکتری‌های محرک رشد، شوری و محلول‌پاشی، از نظر دوره‌ی مؤثر پر شدن، سرعت و طول دوره‌ی پرشدن دانه تفاوت‌هایی وجود دارد. به عبارتی شیب خط برازش شده یا سرعت پرشدن دانه در تلقیح بذر با باکتری‌ها یکسان نبود، به طوریکه حداکثر شیب در تلقیح با سودوموناس و حداقل آن در شرایط عدم تلقیح به دست آمد که حاکی از تفاوت در سرعت پرشدن دانه در تیمارهای مختلف محلول‌پاشی و شوری بود. روند پرشدن دانه به وسیله یک منحنی سیگموئیدی توجیه می‌شود و در این منحنی سه مرحله رشد بطئی، رشد خطی و رسیدگی فیزیولوژیک قابل تمایز است (حق بهاری و سیدشریفی، ۱۳۹۱). در مرحله رشد بطئی، اگرچه فقط ۵ درصد وزن دانه تشکیل می‌شود، ولی نقش کلیدی در وزن نهایی دانه دارد. وزن نهایی دانه یکی از اجزای تعیین کننده عملکرد دانه و طول دوره پرشدن دانه نیز یک جزء تعیین کننده زمان رسیدگی است که از ویژگی‌های مهم در اصلاح غلات می‌باشند. علاوه بر این، اندازه دانه به طول دوره پر شدن دانه بستگی دارد و وزن نهایی دانه‌ها را سرعت و طول دوره پرشدن دانه تعیین می‌کنند. میزان مواد فتوسنتزی که به دانه‌ها می‌رسند به سرعت و طول دوره پر شدن دانه بستگی دارد (آلوارو و همکاران، ۲۰۰۸). محلول پاشی هر یک از عناصر ریزمغذی موجب افزایش طول دوره و دوره موثر پرشدن دانه نسبت به تیمار شاهد شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که حداکثر وزن تک بذر (۰/۰۴۹ گرم)، سرعت پرشدن دانه (۰/۰۰۱۷۲ گرم در روز) در ترکیب تیماری حاصل از عدم شوری، تلقیح بذر با سودوموناس و محلول‌پاشی توأم نانواکسید آهن و روی و کمترین مقادیر این صفات (به ترتیب ۰/۰۳۶ گرم و ۰/۰۰۱۰۶ گرم در روز) در شوری ۵۰ میلی مولار، عدم کاربرد باکتری و عدم محلول‌پاشی به دست آمد (جدول ۱). بوئر و همکاران (۱۹۸۵) در ارزیابی مولفه‌های موثر بر وزن دانه بیان داشتند که سرعت انباشت مواد در دانه نسبت به طول دوره و دوره موثر پرشدن دانه اثر بیشتری دارد. تیمسینا (۲۰۱۳) اظهار داشتند که روی و آهن می‌تواند از طریق طولانی کردن دوره پر شدن دانه به افزایش وزن دانه کمک نماید. کوماری و والارمسی (۱۹۹۸) اظهار داشتند که دانه‌های با وزن بالاتر، از سرعت پرشدن بالاتری نسبت به دانه‌های با وزن کمتر برخوردار می‌باشند و به نظر می‌رسد بالا بودن سرعت پرشدن دانه در شرایط عدم شوری، تلقیح بذر با سودوموناس و محلول‌پاشی توأم نانواکسید آهن و روی می‌تواند توجیه کننده بخشی از افزایش وزن دانه و به تبع از آن عملکرد دانه باشد. بعد از تثبیت دانه در مرحله گرده افشانی، وزن دانه مهم‌ترین عامل در تعیین میزان عملکرد گندم محسوب می‌شود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول دوره (۵۲/۸۵ روز) و دوره موثر پرشدن دانه (۳۹/۱۸ روز) در ترکیب تیماری حاصل از عدم شوری، تلقیح بذر با سودوموناس و محلول‌پاشی توأم نانواکسید آهن و روی و کمترین طول دوره (۵۰/۳۲ روز) و دوره موثر پرشدن دانه (۲۴/۴۸ روز) در شوری ۵۰ میلی مولار، عدم کاربرد باکتری و عدم محلول‌پاشی به دست آمد (جدول ۱). بیش‌ترین عملکرد (۲/۴۹ گرم در بوته) به ترتیب در عدم اعمال شوری، کاربرد باکتری سودوموناس و محلول‌پاشی توأم نانواکسید روی و آهن به دست آمد. کم‌ترین عملکرد (۱/۹۴گرم در بوته)، در شوری ۵۰ میلی‌مولار، عدم کاربرد باکتری و عدم محلول پاشی مشاهده گردید. سید شریفی و حق بهاری (۱۳۹۱) افزایش ۱۰/۵ درصدی عملکرد دانه را بر اثر تلقیح بذر با آزوسپریلیوم گزارش کردند. این افزایش احتمالاً ناشی از وجود جمعیت‌های میکروبی در خاک یا ریزوسفر بر اثر تلقیح بذر با باکتری‌های افزاینده رشد است که به وسیله ایجاد چرخه مواد غذایی و قابل دسترس ساختن آن‌ها، افزایش حفظ سلامتی ریشه در طول دوره رشد در رقابت با پاتوژن‌های ریشه و افزایش جذب عناصر غذایی باعث رشد گیاه شوند (روئستی و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین بخشی از روند تغییرات عملکرد دانه را می‌توان به سرعت و طول دوره پر شدن دانه نسبت داد. بدین صورت که در حالت عدم اعمال شوری سرعت و طول دوره پر شدن دانه افزایش یافت و این امر موجب گردید که مواد بیشتری در دانه‌ها ذخیره شده و از این طریق موجب افزایش وزن دانه و عملکرد دانه شود.



شکل۱ - تأثیر نانواکسید روی و آهن، باکتری‌های محرک رشد و شوری بر روند پرشدن دانه گندم

جدول ۱ . مقایسه میانگین اثر نانو اکسید روی و آهن، باکتری‌های محرک رشد و شوری بر مولفه های پر شدن دانه گندم

تیمار		حداکثر وزن دانه (گرم)				سرعت پر شدن دانه (گرم در روز)			
		N_1	N_2	N_3	N_4	N_1	N_2	N_3	N_4
S_1	F_1	۰/۰۴۵ cd	۰/۰۴۶ b	۰/۰۴۳ f-h	۰/۰۴۸ b	۰/۰۰۱۱۲ r-u	۰/۰۰۱۲۷ k-m	۰/۰۰۱۳۶ j-l	۰/۰۰۱۳۷ jk
	F_2	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۴۰ jk	۰/۰۴۳ ef	۰/۰۴۴ de	۰/۰۰۱۱۱ r-u	۰/۰۰۱۲ k-m	۰/۰۰۱۴۵ d-i	۰/۰۰۱۵۰ c-g
	F_3	۰/۰۴۱ hi	۰/۰۴۵ cd	۰/۰۴۸ ab	۰/۰۴۶ c	۰/۰۰۱۲۳ m-p	۰/۰۰۱۳۹ i-k	۰/۰۰۱۴۸ d-g	۰/۰۰۱۵۱ c-f
	F_4	۰/۰۴۱ ij	۰/۰۴۰ ij	۰/۰۴۳ ef	۰/۰۴۹۱ a	۰/۰۰۱۳۸ i-k	۰/۰۰۱۴۸ d-g	۰/۰۰۱۶۲ b	۰/۰۰۱۷۲ a
S_2	F_1	۰/۰۳۷ m	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۴۰ jk	۰/۰۴۳ f-h	۰/۰۰۱۲۳ m-p	۰/۰۰۱۱۳ q-u	۰/۰۰۱۲۳ k-l	۰/۰۰۱۳۲ k-m
	F_2	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۳۷ m	۰/۰۳۹ kl	۰/۰۴۱ i	۰/۰۰۱۰۸ tu	۰/۰۰۱۲۰ n-q	۰/۰۰۱۳۲ e-j	۰/۰۰۱۴۴ d-g
	F_3	۰/۰۳۷ m	۰/۰۴۱ ij	۰/۰۴۲ g-i	۰/۰۴۸ b	۰/۰۰۱۲۰ m-p	۰/۰۰۱۴۱ h-k	۰/۰۰۱۴۳ f-j	۰/۰۰۱۵۹ bc
	F_4	۰/۰۳۷ m	۰/۰۳۸lm	۰/۰۴۱ hi	۰/۰۴۳ fg	۰/۰۰۱۱۷ o-t	۰/۰۰۱۴۱ h-k	۰/۰۰۱۴۳ jk	۰/۰۰۱۴۷ d-i
S_3	F_1	۰/۰۳۶ n	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۳۹ kl	۰/۰۳۷ m	۰/۰۰۱۰۶ u	۰/۰۰۱۲۵ m-p	۰/۰۰۱۱۰ s-u	۰/۰۰۱۱۷o-t
	F_2	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۴۱ ij	۰/۰۴۲ gi	۰/۰۳۸ lm	۰/۰۰۱۵۴ b-d	۰/۰۰۱۰۶ tu	۰/۰۰۱۲۰ n-r	۰/۰۰۲۱۶ m-o
	F_3	۰/۰۳۸ lm	۰/۴۵ cd	۰/۰۴۱ ij	۰/۰۴۳ fg	۰/۰۰۱۴۷ d-i	۰/۰۰۱۱۸ n-s	۰/۰۰۱۲۴ m-p	۰/۰۰۱۵۳ b-e
	F_4	۰/۰۳۹ kl	۰/۰۳۷ m	۰/۰۴۲ g-i	۰/۰۴۶ c	۰/۰۰۱۴۷ d-i	۰/۰۰۱۲۲ n-q	۰/۰۰۱۲۳ m-p	۰/۰۰۱۳۸ i-k
$LSD_{0.05}$		۰/۰۰۱۲				۰/۰۰۰۲			

میانگین‌های با حروف مشابه در هر صفت اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند

ادامه جدول ۱

تیمار		طول دوره پرشدن دانه (روز)				دوره موثر پر شدن دانه (روز)			
		N_1	N_2	N_3	N_4	N_1	N_2	N_3	N_4
S_1	F_1	۵۱/۹۰ b-d	۵۲/۲۰ b	۵۱/۰۵ gh	۵۱/۹۳ b-d	۳۰/۱۲ j-p	۳۶/۲۲ bc	۳۱/۶۲ g-l	۳۵/۰۴ c-e
	F_2	۵۱/۹۳ bc	۵۲/۲۰ b	۵۱/۲۰ f-h	۵۰/۴۸ ij	۳۴/۲۳ c-f	۳۲/۵۸e-i	۳۰/۰۰ k-p	۲۹/۶۹ k-p
	F_3	۵۲/۲۰ b	۵۱/۷۳ c-e	۵۱/۰۳ gh	۵۱/۱۸ f-h	۳۰/۲۶j-o	۳۰/۵۱ j-n	۳۰/۱۲ j-p	۳۴/۷۴ c-f
	F_4	۵۲/۰۵ b	۵۲/۲۰ b	۵۱/۴۱ e-j	۵۲/۸۵ a	۳۴/۸۹ c-f	۲۹/۴۸ k-p	۲۹/۴۶k-p	۳۹/۱۸ a
S_2	F_1	۵۲/۲۰ b	۵۱/۷۲ c-e	۵۲/۰۲bc	۵۲/۲۰ b	۳۰/۰۸j-p	۳۳/۶۳d-g	۳۲/۵۲ f-j	۳۲/۵۴ e-i
	F_2	۵۲/۲۰ b	۵۲/۷۵ a	۵۱/۸۶ b-d	۵۰/۴۸ ij	۳۵/۱۹cd	۳۰/۸۲ h-m	۲۹/۵۲ l-p	۲۸/۸۶ m-r
	F_3	۵۲/۲۰ b	۵۲/۲۰ b	۵۱/۹۳ b-d	۵۲/۲۰ b	۳۰/۰۸ j-p	۲۹/۱۸ l-q	۲۹/۴۲k-p	۳۰/۲۸j-o
	F_4	۵۲/۲۸ b	۵۰/۲۰ b	۵۱/۷۵ c-e	۵۱/۰۵ gh	۳۱/۶۲ g-l	۲۶/۹۵ q-t	۲۹/۲۵k-q	۲۹/۳۲ k-p
S_3	F_1	۵۰/۳۲ j	۵۲/۰۲bc	۵۱/۰۳ bc	۵۰/۹۶ h	۲۴/۶۸ t	۳۰/۴۰ j-n	۳۵/۴۵cd	۳۱/۶۲ g-l
	F_2	۵۲/۲۰ b	۵۱/۵۲ d-f	۵۰/۸۰ hi	۵۱/۵۲ d-f	۲۷/۸۹ o-s	۳۸/۶۸ ab	۳۵/۰۰ c-e	۲۹/۷۰ k-p
	F_3	۵۰/۴۸ ij	۵۲/۲۰ b	۵۲/۸۳ a	۵۱/۷۰ c-e	۲۵/۸۰ st	۳۸/۱۴ ab	۳۳/۰۶d-h	۲۸/۲۴ n-s
	F_4	۵۲/۸۰ a	۵۱/۹۹ cb	۵۱/۰۸ g-h	۵۲/۰۸ b-c	۲۶/۵۳ r-t	۳۱/۶۶ g-j	۳۴/۱۵ c-f	۲۷/۶۶ p-s
$LSD_{0.05}$		۱/۰۱				۲/۴۶۵			

میانگین‌های با حروف مشابه در هر صفت اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند

(S3) شوری ۵۰ میلی مولار ,(S2) شوری ۲۵ میلی مولار (S1) بدون اعمال شوری

محلول پاشی با (N1), بدون محلول پاشی] محلول پاشی [(F4) سودوموناس ,(F3) ازوسپریلیوم ,(F2) ازتوباکتر ,(F1) بدون کود زیستی)] کودهای زیستی

(N4) محلول پاشی با نانواکسیدآهن و روی (N3) محلول پاشی با نانواکسید آهن ,(N2) نانواکسید روی

نتیجه‌گیری

کاربرد کودهای زیستی به همراه عناصر آهن و روی منجر به بهبود عملکرد و مولفه های پر شدن دانه گندم در شرایط تنش شوری شد. از این رو به نظر می‌رسد به منظور بهبود عملکرد گندم در شرایط شوری خاک، استفاده از کودهای زیستی و محلول‌پاشی نانواکسید روی و آهن عاملی مناسب باشد.

منابع

حق بهاری، م و ر، سید شریفی. ۱۳۹۱. تأثیر باکتری‌های افزآینده رشد گیاه (PGPR) بر عملکرد، سرعت و طول دوره پر شدن دانه گندم در سطوح مختلف شوری خاک. مجله تنش‌های محیطی در علوم کشاورزی. جلد ۶ ، شماره اول، صفحات ۶۵-۷۵.

Alvaro, F., Isidro, J., Villegas, D., Corcia del mora, LF., Royo, C. 2008. Breeding effects on grain filling, biomass partitioning, and remobilization in Mediterranean durum wheat., Agron J, 100: 361-370.

Arshad, M., Frankenberger, W.T., 2002. Ethylene Agricultural Sources and Application. Kluwer Academic Publishers. New York.

Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Eneas-Filho, J., Abreu, C.E.B., Filho, E.G. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany. 56, 87-94.

Bashan, Y., Ivanony, Y.H., Saad, A., 1989. Non specific response in plant growth, yield and root colonization of non-cereal crop plant to inoculation with Azospirilum brasilense. Canadian Journal of Botany. 67,1317-1324.

Buyer, JS., Kratzke, MG., Sikora, LJ. 1993. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth promoting pseudomonas strain, in the barley rhizosphere. Appl Environ Microbiol, 59:677–681.

Gramer, G.R., Alberico, G.J., Schmidt, C., 1994. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. Australian Journal of Plant Physiology. 21(5), 675-682.

Jiang, L., Zhang, D., Song, F., Zhang, X., Shao, Y., Li, C. 2013. Effects of Zinc on Growth and Physiological Characters of Flag Leaf and Grains of Winter Wheat after Anthesis. Adv J. Food Sci &Tech, 5(5): 571-577.

Karimi, M.M., K.H.M. Siddique. 1991. Crop growth and relative growth rates of old and modern wheat cultivers. Australian Journal of Agricultural Research, 42:13-20.

Mabood, F., Smith, D.L., 2005. Pre-incubation of Bradyrhizobium japonicum with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (Glycine max L.) at optimal and suboptimal root zone temperatures. Journal of Plant Physiology. 125: 311-323.

Mazaherinia, S., Astaraei, A. R., Fotovat, A., Monshi, A. 2010. Nano iron oxide particles efficiency on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. World Appl. Sci. J. 7(1): 36- 40.

Pessarakli, M., 1999. Hand book of plant and crop stress. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Roesti. D., Gaur, R., Johariz, B. N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawalieet, K., Aragno, M. 2006. Plant growth stage, fertilizer management promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat field. Soil.Biol. Biochem, 38:1111-1120.

Ronanini, D.R., Savin, R., Hall, A.J. 2004. Dynamic of fruit growth and oil quality of sunflower (Helianthus annus L.) exposed to brif interval of high temperature during grain filling. Field Crop Rers, 83: 79-90.

Timsina, Y.N. 2013. Effect of nitrogen fertilization on zinc and iron uptake and yield components of wheat. Department of Plant and Environmental Sciences, (IPM). Norwegian University of Life Sciences (UMB), Pp 94.

Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. Plant and Soil. 225, 571-586.

Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., Kwak, S.S., 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Plant Physiology and Biochemistry. 47, 570-577.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effects of bio fertilizers and nano Zn- Fe oxide on grain yield and grain filling components of wheat under soil salinity

Seyed sharifi[*1], R., Pirzad[2], A.R.,

[1] Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

[2] Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

In order to evaluate the effects of nano Zn-Fe oxide and bio fertilizers on yield and grain filling components of wheat (*Triticum aestivum* L.) under soil salinity, a factorial experiment was conducted based on randomized complete block design with three replications at research green house of faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili in 2015. Treatments were included soil salinity in three levels [no-salt or control, salinity 25, and 50 mM equal with 2.3 and 4.6 ds/m as NaCl], seed inoculation by plant growth promoting rhizobacteria [(no inoculation, seed inoculation by Azotobacter chrocoocum strain 5, Azosperilium lipoferum strain OF, Pseudomonas putida strain 186] and foliar application in four levels [without foliar application, foliar application of nano Zn oxide, nano Fe oxide and nano Fe-Zn oxide]. Means comparison showed that maximum grain filling components (maximum of grain weight, grain filling rate, grain filling period and effective grain filling period) and grain yield (2.49 g per plant) were obtained in no salinity and application of Pseudomonas and nano Zn-Fe oxide and the least grain yield (1.94 g per plant) and grain filling components were obtained in 50 Mm salinity and no application of PGPR and nano Zn-Fe oxide.

Keywords: plant growth promoting rhizobacteria, microelement, wheat, stress

[*] Corresponding author, Email: raouf_ssharifi@yahoo.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر نوع محیط کشت و زمان بر حلالیت کانی سیلیسی در حضور سویه‌های مختلف باکتری

ریحانه نژاد اسدی[۱*]، عیسی اسفندیارپور بروجنی[۲]، محسن حمیدپور[۲]، پیمان عباس‌زاده دهجی[۳]، سید جواد حسینی‌فرد[۴]

[۱] دانشجوی دکترای گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

[۲] دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

[۳] استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

[۴] استادیار پژوهشکده پسته ایران، رفسنجان

چکیده

شناخت و مطالعه کانی‌های رسی برای اطلاع از ساختار خاک و بررسی فرآیندهای هوادیدگی که منجر به تشکیل خاک می‌شوند، ضروری است. پژوهش حاضر با هدف بررسی کارایی باکتری‌های ریزوسفری در آزادسازی عناصر از کانی سپیولیت در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سویه باکتری شامل *Pseudomonas* sp. (D1)، *Bacillus* sp. (K1)، *Pseudomonas* sp. (K2) و *P.fluorescens* (A11) و شاهد (بدون تلقیح باکتری) در دو دوره زمانی (۷ و ۱۴ روز) در سه تکرار انجام شد. نتایج پژوهش حاضر، نشان‌دهنده معنی‌داری اثر متقابل باکتری، محیط کشت و زمان بر آزادسازی عناصر از کانی سپیولیت بود. در هر دو زمان میزان قابل توجهی منیزیم از کانی سپیولیت آزاد شد که این آزادسازی، تحت تأثیر نوع محیط کشت (غنی و فقیر) و زمان نبود. بیشترین میزان آزادسازی منیزیم به سویه‌های A11 و D1 (به‌ترتیب ۱۲۰ و ۱۱۰ میلی‌گرم در لیتر) اختصاص داشت. بیشترین مقدار سیلسیم رهاشده از کانی نیز در حضور سویه K1 بود. برخلاف آزادسازی مقدار قابل توجه عناصر از کانی سپیولیت، سویه‌های باکتری قادر به تغییر ساختار کانی در مدت زمان ۱۴ روز نبودند. به‌نظر می‌رسد که مدت زمان بیشتری برای برهمکنش کانی و باکتری در راستای تغییر ساختار کانی سپیولیت، مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، پراش پرتو ایکس، کانی‌های رسی رشته‌ای، هوادیدگی

مقدمه

شناخت و مطالعه کانی‌های رسی برای اطلاع از ساختار خاک، مکانیسم آزاد شدن و تبادل عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان در خاک و نیز بررسی فرآیندهای هوادیدگی که منجر به تشکیل خاک می‌شود، ضروری است (Velde, 1992). سپیولیت از جمله کانی‌های سیلیکاتی تری‌اکتاهدرل و آب‌دار محسوب می‌شود که هر واحد ساختمانی آن از دو صفحه چهاروجهی در اطراف و یک صفحه هشت‌وجهی غنی از منیزیم در مرکز تشکیل شده است (Galan, 1996). باکتری‌ها از طریق هوادیدگی کانی‌های سیلیکاتی در خاک، بر چرخه عناصر موجود در پوسته زمین اثرگذار هستند. تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با مکانیسم‌هایی چون تولید اسید آلی (Bigham و همکاران ۲۰۰۱، Uroz و همکاران ۲۰۰۹)، تراوش عوامل کلات‌کننده (Brunstad , Adeyemi and Gadd, 2005 و همکاران ۲۰۰۸)، جذب یون‌های حل‌شده توسط دیواره‌های سلولی باکتری (Cuadros و همکاران، ۲۰۱۳) و اکسیداسیون و احیای عناصر (Bigham و همکاران، ۲۰۰۱؛ Hopf و همکاران، ۲۰۰۹)، حلالیت کانی‌ها را افزایش دهند (Cuadros, 2017) و آزادسازی عناصر از کانی‌ها را در شرایط هوازی تسریع کنند (Singh, 2010، Dai و همکاران ۲۰۱۴، Ren و همکاران Parmar و همکاران ۲۰۱۶). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1]گروهی از باکتری‌ها هستند که با تولید هورمون‌های گیاهی، سیدروفور، اسیدهای آلی و سیانید هیدروژن باعث انحلال ترکیبات کم‌محلول و فراهمی عناصر غذایی از جمله فسفر، روی و آهن در خاک می‌شوند و از طرف دیگر با تولید آنزیم ACC-دآمیناز، مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌دهند (Karlidag et al., 2007). اگرچه در رابطه با رهاسازی عناصر از کانی‌های رشته‌ای (فیبری)، پژوهش‌هایی انجام شده است؛ لیکن تغییر و تحول کانی سپیولیت در ارتباط با باکتری‌های محرک رشد، کمتر مورد پژوهش قرار گرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر ترکیب محیط کشت و زمان تعامل کانی و باکتری بر حلالیت کانی سپیولیت و آزادسازی عناصر از آن انجام گرفت.

* ایمیل نویسنده مسئول: r_nejadasadi@yahoo.com

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

مواد و روش‌ها

کانی سپیولیت استفاده‌شده در این پژوهش از معدن سپیولیت یزد تهیه شد و قبل از انجام مطالعات مورد نظر به‌منظور اطمینان از خالص‌بودن آن، آنالیز تجزیه عنصری (XRF)[2]بر روی آن انجام گرفت و خالص‌سازی کانی به روش Kittrik and Hope (۱۹۶۳) انجام شد. به این‌صورت که در مرحله اول برای حذف املاح محلول، ۵۰ گرم از کانی مورد نظر در سیلندرهای یک لیتری ریخته شد و با آب مقطر در چند مرحله شست‌و شو گردید. در مرحله دوم به‌منظور جدا کردن کربنات‌ها از کانی مورد نظر، از بافر استات سدیم با pH ۵ استفاده شد. به‌دلیل اینکه این بافر، یک اسید ضعیف است؛ حذف کامل کربنات‌ها به‌کندی صورت گرفته و این مرحله، چندین بار تکرار شد. برای حذف اکسیدهای آهن احتمالی نیز از محلول بافر سیترات سدیم با pH ۷/۳ در حضور دی‌تیونات سدیم استفاده شد.

در این پژوهش از چهار سویه باکتری دارای توانایی حل‌کنندگی ترکیبات کم‌محلول فسفر و روی موجود در بانک باکتری گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان استفاده شد. اطلاعات مربوط به سویه‌های استفاده شده در این پژوهش و برخی از خصوصیات محرک رشدی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. به‌منظور شناسایی سویه برتر باکتری از بین سویه‌های مورد نظر در انحلال و آزادسازی عناصر از کانی سپیولیت، یک مطالعه آزمایشگاهی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. برای این منظور، دو محیط کشت الکساندروف غنی و فقیر تهیه شد. ترکیب محیط کشت غنی شامل گلوکز ۶ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۳ گرم بر لیتر، پپتون ۱۰ گرم بر لیتر و کلرید سدیم ۵ گرم بر لیتر بود و pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد (Dai و همکاران، ۲۰۱۴). محیط کشت فقیر نیز با ترکیب سوکروز ۱۰ گرم بر لیتر، فسفات سدیم ۱ گرم بر لیتر، سولفات آمونیوم ۰/۵ گرم بر لیتر و عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر تهیه شد (Liu و همکاران ۲۰۰۶). ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت و یک گرم کانی سپیولیت، پس از تلقیح با باکتری‌های مورد نظر، به‌مدت ۷ و ۱۴ روز در دمای ۲۶ درجه سیلسیوس بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان مزبور، ارلن‌ها از روی شیکر برداشته و در عصاره رویی، میزان pH با استفاده از دستگاه pH متر (Richards, 1954)، میزان کلسیم و منیزیم به روش کمپلکسومتری (Klute, 1986) و میزان عناصر آهن، آلومینیم و سیلیسیم آزادشده از کانی با دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta) اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی تأثیر فعالیت باکتری بر تغییر و تبدیل کانی، بعد از گذشت مدت زمان معین، کانی را از محیط کشت با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ جدا نموده و باکتری‌های باقی‌مانده در نمونه با استفاده از آب‌اکسیژنه از بین برده شدند و سپس تیمارهای اشباع با منیزیم با استفاده از محلول کلرید منیزیم نرمال و اشباع با پتاسیم با استفاده از محلول کلرید پتاسیم نرمال بر روی آن‌ها اعمال و بعد از تهیه سوسپانسیون، پراش‌نگار پرتو ایکس آن‌ها توسط دستگاه پراش‌سنج پرتو ایکس فیلیپس مدل PW1840 در محدوده زوایای پراش (۲θ) ۳ تا ۶۰ درجه با ولتاژ ۴۰ کیلوولت و آمپراژ ۴۰ میلی‌آمپر توسط لامپ پرتوی ایکس با فلز هدف مس تهیه گردید.

جدول ۱. برخی خصوصیات محرک رشدی سویه‌های باکتری استفاده‌شده در پژوهش حاضر

سویه باکتری	حل‌کنندگی فسفر	حل‌کنندگی روی		سیدروفور	حل‌کنندگی فسفر	حل‌کنندگی روی	
		$ZnCO_3$	ZnO			$ZnCO_3$	ZnO
	میلی‌گرم در لیتر			قطر هاله به قطر کلونی			
Pseudomonas sp. D1	۶۵۰	۰/۰۰	۵/۷۱	۲/۱۸	۱/۶۲	۰/۰۰	۱/۷۸
Bacillus sp. K1	۷۰۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۸۵	۰/۰۰	۰/۰۰
Pseudomonas sp. k2	۶۶۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۷۲	۰/۰۰	۰/۰۰
Pseudomonas fluorescens A11	۶۰۰	۳۰/۵	۶۵/۰	۱/۲۰	۰/۰۰	۱/۷۰	۱/۴۰

نتایج و بحث

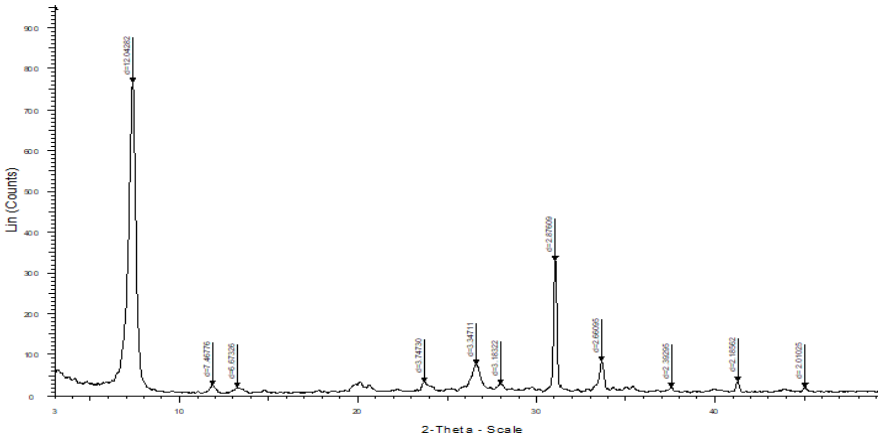
نتایج مربوط به ترکیب عنصری کانی مورد مطالعه در جدول ۲ ارائه گردیده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بر پایه ترکیب عنصری این کانی میزان آلومینیم، سدیم، پتاسیم و تیتانیم در این نمونه کانی ناچیز است، حال آنکه مقادیر قابل توجهی سیلیسیم و منیزیم در این کانی دیده

[2] X-ray fluorescence

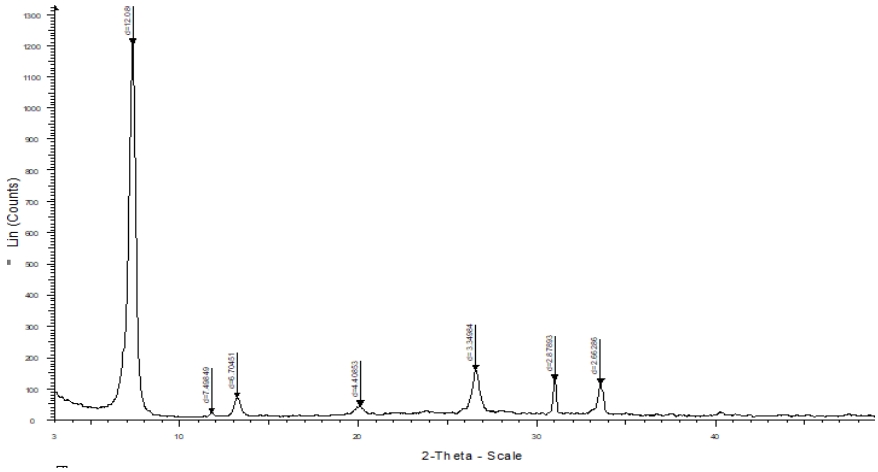
می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه پراش پرتو ایکس، بخشی از کلسیم نمونه به‌واسطه وجود کانی دولومیت همراه با کانی سپیولیت است و از آنجا که کانی سپیولیت به‌طور عمده در محیط‌های شور و قلیایی و فعالیت زیاد سیلیسیم ولی فعالیت بسیار کم آلومینیم تشکیل می‌شود (Singer, 1989)؛ بنابراین با مقایسه نتایج XRF و XRD این کانی در دو حالت خالص و ناخالص (جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲)، به‌نظر می‌رسد که کانی دولومیت به‌عنوان کانی همراه سپیولیت حضور داشته و با روش معمول حذف ناخالصی‌ها از بین نرفته است. کریمی و همکاران (۱۳۹۶) نیز به نتیجه مشابهی در این ارتباط دست یافتند.

جدول ۲. نتایج **XRF** کانی سپیولیت قبل و بعد از خالص‌سازی

اکسید عناصر (درصد)	Fe_2O_3	MnO	TiO_2	CaO	K_2O	P_2O_5	SiO_2	Al_2O_3	MgO	Na_2O
سپیولیت ناخالص	۰/۲۳	۰/۰۱	۰/۰۱	۳۰/۲	۰/۰۳	۰/۰۱	۳۵/۸	۰/۱۵	۳۳/۶	۰/۰۱
سپیولیت خالص‌سازی شده	۰/۲۶	۰/۰۱	۰/۰۱	۲۴/۱	۰/۰۳	۰/۰۱	۴۲/۰	۰/۰۱۴	۳۳/۴	۰/۰۴



شکل ۱. پراش‌نگار پرتو ایکس نمونه کانی سپیولیت قبل از خالص‌سازی



شکل ۲. پراش‌نگار پرتو ایکس نمونه کانی سپیولیت بعد از خالص‌سازی

خلاصه آماری برخی از ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده در محیط کشت غنی و فقیر در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است. همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در محیط غنی، میزان آزادسازی منیزیم و سیلیسیم از کانی سپیولیت با گذشت زمان به‌ترتیب ۱۹ و ۱۷ درصد نسبت به مدت زمان ۷ روز افزایش یافته است؛ در صورتی که این آزادسازی در مورد عناصر آهن، کلسیم و آلومینیم روند کاهشی داشته است. در محیط کشت فقیر نیز میزان آزادسازی منیزیم و کلسیم از کانی سپیولیت با گذشت زمان به‌ترتیب ۲۰ و ۱۶ درصد نسبت به مدت زمان ۷ روز افزایش یافته است؛ اما میزان آزادسازی

سیلسیم و آهن، کاهش ۵۰ درصدی را با گذشت زمان نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از اثر معنی‌دار سویه‌های باکتری بر همه ویژگی‌های تعیین‌شده می‌باشد. اثر متقابل باکتری، نوع محیط کشت و زمان نیز به‌جزء عنصر منیزیم بر سایر ویژگی‌ها معنی‌دار بوده است. در محیط غنی به‌دلیل تجزیه پروتئین‌های موجود در محیط (از جمله، پپتون، pH محیط افزایش یافته است؛ در صورتی که در محیط فقیر به‌دلیل آزاد شدن اسیدهای آلی ناشی از تجزیه قندها، کاهش pH مشاهده می‌شود. همچنین، با گذشت زمان در محیط فقیر، pH تغییر معنی‌داری نداشته است اما در محیط غنی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۳). Cheng و همکاران (۲۰۱۷) نیز در پژوهشی تولید اسیدهای آلی در محیط فقیر توسط باکتری و کاهش معنی‌دار pH و حل‌شدن کانی بیوتیت را گزارش نموده‌اند.

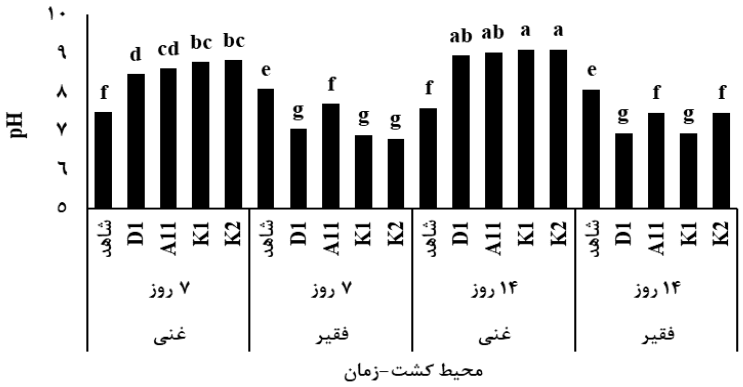
جدول ۳. خلاصه آماری برخی ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده در محیط کشت غنی بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز

پارامترها	مینیمم	ماکزیمم	میانگین	انحراف معیار	واریانس	چولگی	افراشتگی
۷ روز							
pH	۷/۴۵	۸/۸۹	۸/۴۲	۰/۵۲	۰/۲۷	-۱/۳۲	۰/۲۱
منیزیم ($mg\ L^{-1}$)	۵۰	۱۱۶	۷۲	۱۸/۵	۳۴۲	۱/۰۵	۰/۸۹
کلسیم ($mg\ L^{-1}$)	۴۰	۱۵۰	۸۱/۳	۲۹/۵	۸۶۹	۰/۵۶	۱/۰۹
آهن ($mg\ L^{-1}$)	۱/۲۱	۲/۴۵	۱/۵۳	۰/۳۳	۰/۱۱	۱/۸۲	۱/۷۰
آلومینیم ($mg\ L^{-1}$)	۰/۰۵	۰/۲۶	۰/۱۶	۰/۰۷	۰/۰۱	-۰/۲۶	-۰/۹۴
سیلیسیم ($mg\ L^{-1}$)	۵/۴۳	۳۲/۸	۱۶	۸/۹	۷۹/۱	۰/۴۱	-۱/۱۷
۱۴ روز							
pH	۷/۵۸	۹/۱	۸/۷۴	۰/۶	۰/۳۶	-۱/۶۲	۰/۸۱
منیزیم ($mg\ L^{-1}$)	۵۶	۱۴۰	۸۸/۸	۲۵/۱	۶۳۱	۰/۶۴	-۰/۴۵
کلسیم ($mg\ L^{-1}$)	۵۰	۹۰	۷۳/۳	۱۱/۷	۱۳۸	-۰/۴۵	-۰/۵۶
آهن ($mg\ L^{-1}$)	۰/۴۶	۲/۴۹	۱/۳۲	۰/۵۹	۰/۳۵	۰/۶۷	-۰/۱۳
آلومینیم ($mg\ L^{-1}$)	۰/۰۹	۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۱۵	-۰/۱۲
سیلیسیم ($mg\ L^{-1}$)	۱۱/۳	۳۵/۷	۱۹/۳	۶/۳۹	۴۰/۹	۱/۰۸	۱/۸۴

جدول ۴. خلاصه آماری برخی ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده در محیط کشت فقیر بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز

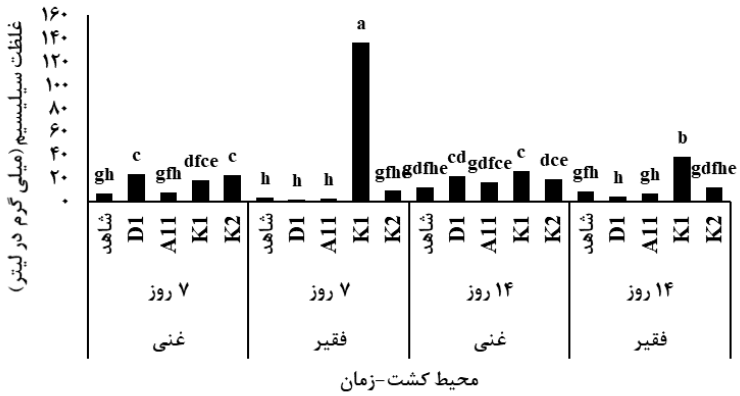
پارامترها	مینیمم	ماکزیمم	میانگین	انحراف معیار	واریانس	چولگی	افراشتگی
۷ روز							
pH	۶/۷۵	۸/۱۲	۷/۳۰	۰/۵۱	۰/۲۶	۰/۵۶	-۱/۵۱
منیزیم ($mg\ L^{-1}$)	۲۶	۱۱۶	۶۶	۲۵/۶	۶۵۶	۰/۰۹	-۰/۷۲
کلسیم ($mg\ L^{-1}$)	۵۰	۱۴۰	۱۰۰	۲۳/۴	۵۴۹	-۰/۳۶	۰/۱۰
آهن ($mg\ L^{-1}$)	۰/۰۵	۱/۲۰	۰/۳۴	۰/۳۸	۰/۱۵	۱/۴۹	۰/۸۶
آلومینیم ($mg\ L^{-1}$)	۰/۱۳	۰/۷۴	۰/۳۴	۰/۲۲	۰/۰۵	۰/۹۳	-۰/۷۵
سیلیسیم ($mg\ L^{-1}$)	۱/۱۶	۱۵۵	۳۰/۷	۵۵	۳۰۲۹	۱/۷۲	۱/۲۴
۱۴ روز							
pH	۶/۷۹	۸/۱۲	۷/۳۷	۰/۴۹	۰/۲۴	۰/۳۰	-۱/۵۷
منیزیم ($mg\ L^{-1}$)	۳۸	۱۴۰	۸۲/۴	۲۸/۴	۸۰۶	۰/۲۲	-۰/۳۸
کلسیم ($mg\ L^{-1}$)	۷۰	۱۸۰	۱۱۹	۴۲/۵	۱۸۰۷	-۰/۰۴	-۱/۹۶
آهن ($mg\ L^{-1}$)	۰/۰۲	۰/۳۳	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۰۲	۰/۴۸	-۱/۸۷
آلومینیم ($mg\ L^{-1}$)	۰/۱۴	۱/۱۱	۰/۴۲	۰/۳۵	۰/۱۳	۱/۰۲	-۰/۳۸
سیلیسیم ($mg\ L^{-1}$)	۴/۶۱	۴۰/۴	۱۴/۳	۱۳/۰۱	۱۶۹/۲	۱/۴۹	۰/۵۸

نتایج نشان داد که میزان آزادسازی منیزیم در هر دو محیط کشت با گذشت زمان، افزایش یافته است و این آزادسازی به سویه باکتری، ترکیب محیط کشت و زمان وابسته نبوده است. انحلال ترجیحی منیزیم در کانی سپیولیت نسبت به سایر فیلوسیلیکات‌ها ممکن است به‌دلیل ورقه‌های هشت‌وجهی غیرممتد موجود در ساختار این کانی باشد. به دیگر سخن، در سایر فیلوسیلیکات‌ها انحلال و آزادسازی منیزیم توسط ورقه چهاروجهی که به ورقه هشت‌وجهی متصل است، محدود شده است؛ این در حالی است که کانال‌های داخل سپیولیت، این ورقه‌های هشت‌وجهی را در معرض قرار داده و بدون نیاز به انحلال ورقه چهاروجهی، منیزیم از ساختار کانی آزاد می‌شود. علاوه بر این، باکتری‌ها با سازوکارهای مختلفی از جمله تراوش عوامل کلات‌کننده (مانند اگزالیک اسید، سیتریک اسید و سیدورفور) و اتصال آن‌ها به فلزات (به‌طور عمده، آهن و آلومینیم) حلالیت کانی‌ها را افزایش می‌دهند (Cuadros, 2017). همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است تمامی سویه‌ها توانایی حل‌کنندگی ترکیبات کم‌محلول فسفر را داشته‌اند که از بین آن‌ها بیشترین حل‌کنندگی مربوط به سویه K1 و کمترین آن مربوط به سویه A11 بوده است. در مورد حل‌کنندگی روی نیز فقط سویه‌های D1 و A11 قادر به حل‌کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی بوده‌اند و سایر جدایه‌ها این توانایی را دارا نمی‌باشند. توان انحلال فسفر و روی توسط باکتری‌های محرک رشد عمدتا در ارتباط با تولید اسیدهای آلی توسط این سویه‌ها و کاهش pH محیط می‌باشد. همچنین تمامی سویه‌ها توانایی بالایی در تولید سیدروفور داشته‌اند که یکی از ترکیبات مهم در مورد هوادیدگی کانی‌های آهن‌دار است. این لیگاند با تشکیل کمپلکس‌های محلول سیدروفور و آهن، منجر به حلالیت کانی و افزایش غلظت آهن قابل دسترس میکروارگانیسم‌ها و گیاهان می‌شود. به‌طور کلی، تأثیر سیدورفورها بر هوادیدگی کانی‌ها مؤثرتر از اسیدهای آلی است؛ زیرا کمپلکس ایجادشده بین سیدروفور و آهن پایدارتر می‌باشد (Ahmed and Holmstrom, 2014). Shirvani and Nourbakhsh (۲۰۱۰) نیز افزایش آزادسازی آهن از کانی‌های سپیولیت و پالیگورسکیت را با افزایش غلظت سیدروفور دسفرال گزارش نمودند.



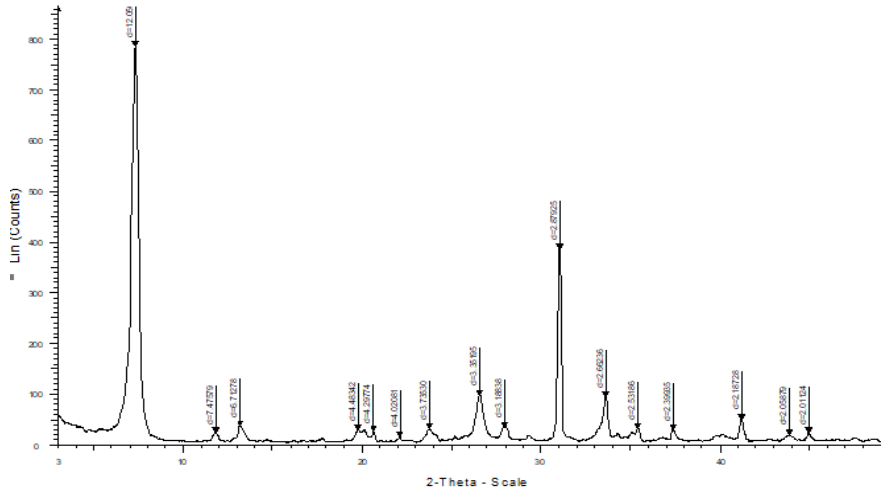
شکل ۳. مقایسه میانگین پی‌اچ در محیط کشت باکتری

سویه باکتری K1 بیشترین آزادسازی سیلیسیم از سپیولیت را در محیط فقیر بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز (به‌ترتیب ۱۳۶ و ۳۸ میلی‌گرم بر لیتر) داشته است و این آزادسازی در ۷ روز اول، به میزان ۷۰ درصد، بیشتر از ۱۴ روز بوده و با گذشت زمان، باکتری سیلیسیم آزادشده از کانی را مصرف نموده است (شکل ۴). این سویه از نوع باسیلوس بوده که در منابع مختلف به‌عنوان باکتری حل‌کننده سیلیس شناخته شده و نقش آن در آزادسازی سیلیسیم از کانی به اثبات رسیده است (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۷؛ Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۱؛ Parmar و همکاران، ۲۰۱۳)



شکل ۴. مقایسه میانگین غلظت سیلیسیم در محیط کشت باکتری

با مقایسه پراش‌نگارهای پرتو ایکس کانی سپیولیت، قبل و بعد از قرار گرفتن در محیط کشت باکتری، تغییر خاص و بارزی در آن‌ها مشاهده نشد (شکل‌های ۲ و ۵). به‌عبارت دیگر، نتایج حاکی از آن بود که برخلاف آزادسازی عناصر و کاهش pH محیط، ساختار کانی سپیولیت تغییر چندانی نکرده و باکتری قادر به تغییر ساختار این کانی در مدت زمان ۱۴ روز نبوده و برای این تغییر، نیازمند مدت زمان بیشتر و یا کاهش بیشتر pH می‌باشد.



شکل ۵. پراش‌نگار پرتو ایکس نمونه سپیولیت حاوی باکتری K1 در محیط فقیر بعد از ۱۴ روز

نتیجه‌گیری

هرچند چهار سویه باکتری ریزوسفری مورد استفاده در پژوهش حاضر، قادر به رهاسازی عناصر از کانی سپیولیت در شرایط آزمایشگاهی بودند؛ لیکن پتانسیل آزادسازی این عناصر بین باکتری‌های مورد آزمایش، متفاوت بود. همچنین ترکیب محیط کشت باکتری با تأثیر مستقیمی که بر تغییر pH می‌گذارد یک عامل مهم در تعیین مسیر انحلال کانی محسوب می‌شود. در بین سویه‌های مورد آزمایش، سویه .Bacillus sp در رهاسازی عناصر مختلف از کانی سپیولیت کارآمدتر بوده و می‌توان از آن در کارهای پژوهشی آتی استفاده کرد. البته برخلاف آزادسازی عناصر از کانی سپیولیت، باکتری به‌تنهایی قادر به انحلال کامل و یا تبدیل کانی در بازه زمانی ۱۴ روز نبوده است و برای این تغییر، نیازمند محیطی با شرایط مناسب‌تر (مانند ریزوسفر گیاه) و یا مدت زمان بیشتر برای برهمکنش باکتری و کانی می‌باشد.

منابع

کریمی، ع.، مومن، م.، حلاج‌نیا، ا. و میرحسینی موسوی، پ. ۱۳۹۶. یک روش ساده فیزیکی خالص‌سازی سپیولیت. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد ۳۱ (شماره ۵): ۱۴۵۵-۱۴۴۷.

Ahmed, E. and Holmstrom, S. J. M. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology,7(3): 196–208.

Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., Shahsavarpour, KH. 2017. Lendeh Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. Ecological Engineering, 103: 164–169.

Bakhshandeh, S.H., Khormali, F., Dordipour, E., Olamaei, M. and Kehl, M. 2011. Comparing the weathering of soil and sedimentary palygorskite in the rhizosphere zone. Applied Clay Science, 54: 235–241.

Cheng, Ch., Qi, W., Linyan, H. and Xiafang, Sh. 2017. Change in mineral weathering behaviors of a bacterium *Chitinophaga jiangningensis* JN53 under different nutrition conditions. Journal of Basic Microbiology, 57 (4): 293-301.

Cuadros, J. 2017. Clay minerals interaction with microorganisms: a review. Clay Minerals, 52: 235–261.

Dai, Q., Zhao, Y., Dong, F., Wang, B. and Huang, Y. 2014. Interaction between bentonite and Bacillus litoralis strain SWU9. Applied Clay Science, 100: 88–94.

Galan, E. 1996. Properties and applications of palygorskite – sepiolite clays. Clay Minerals, 31: 443-453.

Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M. and Sahin, F. 2007. Effects of root inoculation of plantgrowth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient elements contents ofleaves of apple. Scientia Horticulturae, 114: 16-20.

Kittrick, J. A. and Hope, E. W. 1963. A procedure for the particle size separation of soils for X-ray diffraction analysis. Soil Science, 96: 312–325.

Klute, A. 1986. *Methodes of Soils Analysis*. Part 1, Physical and mineralogical methods. Soil Science Society of America Book Series Number 5, Madison, WI.

Liu, W., Xu, X., Wu, X., Yang, Q., Luo, Y. and Christie, P. 2006. Decomposition of silicate minerals by Bacillus mucilaginosus in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health, 28: 133–140.

Parmar, K. B., Mehta, B. P. and Kunt, M. D. 2016. Isolation, characterization and identification of potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil of maize (Zea mays). International Journal of Science, Environment and Technology, 5 (5): 3030–3037.

Parmar, P. and Sindhu, S. S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. Journal of Microbiology Research, 3: 25-31.

Ren, X., Li, F., Cai, Y., Li, Y., Jin, J., Li, X. and Chen, J. 2016. *Paenibacillus sp.* strain SB-6 induces weathering of Ca-montmorillonite: illitization and formation of calcite. Geomicrobiology Journal, 34 (1): 524-529.

Richards, L. A. 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. Agriculture Handbook. No. 60. United States Department of Agriculture, Washington.

Shirvani, M. and Nourbakhsh, f. 2010. Desferrioxamine-B adsorption to and iron dissolution from palygorskite and sepiolite. Applied Clay Science, 48: 393–397.

Singer, A., 1989. Palygorskite and sepiolite group minerals. in: Dixon, J. B. & Weed, S. B. (eds.) Minerals in Soil Environments. Soil Science Society of America, Madison, WI, PP. 829–872.

Singh, G., Biswas, D. R. and Marwah, T. S. 2010. Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea Mays*) and wheat (*Triticum Aestivum* L.). Journal of Plant Nutrition, 33: 1236-1251.

Velde, B. 1992. *Introduction to Clay Minerals. Chemistry, Origins, Uses and Environmental Significance*. Chapman and Hall, New York, Melbourne, 198 pp.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of culture medium and time on solubility of sepiolite in presence of different strains of bacteria

Nejadasadi*[1], R., Esfandiarpour Boroujeni, I.[2], Hamidpour, M.[2], Abbaszadeh-dahaji, P.[3], Hosseinifard, S. J.[4]

[1] PhD Student, Soil Science Department, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
[2] Associate Prof., Soil Science Department, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
[4] Assistant Prof., Pistachio Research Center, Rafsanjan, Iran

Abstract

The study of clay minerals is essential for notice of soil structure and investigating the processes that lead to soil formation. This research was carried out to dissolve elements from sepiolite mineral by rhizospheric bacteria. The experiment was done as factorial with completely randomized design. Treatments with four strains of bacteria include *P.seudomonas sp*. (D1), *Bacillus sp.* (K1), *Pseudomonas sp.* (k2) and *P.fluorescens* (A11) and the control (without inoculation) during two time periods (7 and 14 days). The results showed significant interaction effects of strains, culture medium and time on elements release from sepiolite. At both 7 and 14 days, a significant amount of Mg was released from sepiolite that was not affected by the type of culture medium (rich and poor) and time and the highest amount was dedicated to A11 and D1 strains (120 and 110 mg L^{-1}, respectively). The highest release of Si from sepiolite was related to the presence of K1 strains. Contrary to the release of a considerable amount of elements from sepiolite, the bacteria can not change the mineral structure within 14 days. It seems that more time is needed for the interaction of mineral and bacteria in order to change the structure of sepiolite.

Keywords: Plant growth promoting rhizobacteria, X-ray diffraction, Fibrous clay minerals, Weathering

* Corresponding author, Email: r_nejadasadi@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر ماده آلی بر ترمیم‌پذیری خاک تیمار شده با قارچ‌کش کاربندازیم و دما

مریم السادات حسینی*[1]، امیر لکزیان[2]، علیرضا آستارایی[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[2] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[3] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

ترمیم‌پذیری از ویژگی‌های مهم خاک‌های زراعی بوده که عوامل محیطی زیادی می‌تواند این ویژگی ذاتی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. به منظور بررسی تأثیر قارچ‌کش و دما در طی زمان بر ترمیم‌پذیری خاک در حضور و عدم حضور ماده آلی،۴ آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. در دو آزمایش اول تأثیر قارچ‌کش و دما بر مقدار ترمیم‌پذیری خاک (با اندازه‌گیری کربن بیومس) بررسی شد و سپس مؤثرترین تیمارهای انتخابی این دو آزمایش بر مقدار ترمیم‌پذیری خاک در حضور ماده آلی (۱/۵ درصد) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر قارچ‌کش و دما بر میزان ترمیم‌پذیری خاک معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). با افزایش غلظت قارچ‌کش و بالا بردن دما، ترمیم‌پذیری خاک کاهش یافت. غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر قارچ‌کش و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین کاهش را در میزان ترمیم‌پذیری خاک نشان دادند؛ اما با گذشت زمان این ویژگی ذاتی خاک افزایش یافت. ماده آلی نیز تأثیر مثبتی بر ترمیم‌پذیری خاک مورد آزمایش داشت. به‌طورکلی به نظر می‌رسد که حضور ماده آلی به دلیل تأثیر مثبت بر فعالیت ریز جانداران باعث بهبود هر چه سریع‌تر میزان ترمیم‌پذیری خاک پس از اعمال تنش می‌شود.

کلمات کلیدی: تنش، مدیریت خاک، کشاورزی پایدار

مقدمه

خاک یک مجموعه پویا و زنده است که در صورت عدم مدیریت مناسب، کارکرد خود را در برابر فرآیندهای تخریبی (مانند فرسایش خاک، تخلیه عناصر غذایی، متراکم شدن و آلودگی) از دست می‌دهد (Tenywa و همکاران ۲۰۰۱). درصورتی‌که تنش ایجاد شده به خاک طی مدت زمان طولانی و شدید نباشد، خاک توانایی ذاتی برای بازگشت به شرایط قبل تنش را دارد (Lal، ۱۹۹۴). توانایی ذاتی خاک برای مقاومت و ترمیم ویژگی‌های خود به حالت قبل از تنش را ترمیم‌پذیری خاک گویند (Lal و همکاران، ۲۰۰۸). ترمیم‌پذیری «بازگشت به حالت اصلی خود یا شرایط اولیه قبل از تنش» را بیان می‌کند ولی به این معنی نیست که سیستم دقیقاً به حالت یکسان قبل از تنش برگردد بلکه بیان می‌کند که سیستم به حالتی بازگردد که در آن کارکردش تفاوت چندانی با قبل ندارد. به‌طورکلی، تعادلی که بین فرآیندهای تخریبی و ترمیم‌پذیری خاک وجود دارد به نوعی منعکس‌کننده فعالیت‌ها و مدیریت‌های انسانی می‌تواند باشد (Ali و Abdel kawy، ۲۰۱۲). با این حال میزان تخریب و مدت زمان لازم برای بازیابی کارکرد اولیه خاک زیر تأثیر ویژگی‌های متفاوتی می‌باشد. زمانی که خاک‌ها تحت تنش‌های پی در پی قرار می‌گیرند، ترمیم‌پذیری آن‌ها افزایش می‌یابد زیرا به مرور زمان جوامع میکروبی غیر مقاوم از بین می‌روند و جوامع مقاوم باقی می‌مانند که این امر سبب ایجاد مقاومت و ترمیم‌پذیری بالاتر خاک می‌شود (Lal، ۱۹۹۷). به‌طورکلی مطالعات نشان داده که عوامل مؤثر بر افزایش یا کاهش فعالیت‌های بیولوژیکی که موجب تغییر در مقادیر ماده آلی خاک می‌شوند بر میزان ترمیم‌پذیری خاک تأثیر زیادی دارند. اصلاح‌کننده‌های آلی برای بهبود ترمیم‌پذیری خاک بعد از تنش پیشنهاد شده است (Griffiths و همکاران ۲۰۰۴). ترمیم‌پذیری هر خاک بستگی به خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک آن خاک و شرایط قبل تنش دارد. خاکی که به‌خوبی سازمان‌یافته است، عمیق و محتوای ماده آلی آن بالا باشد ترمیم‌پذیری در آن بالا است. ترکیبی از خصوصیات بافتی و ساختمانی خاک عوامل کنترل‌کننده درونی ترمیم‌پذیری هستند. پوشش گیاهی متراکم و بقایای باقی‌مانده آن‌ها بر روی زمین یک همراه حیاتی برای حفظ ترمیم‌پذیری خاک است. خاک‌های رسی نسبت به خاک‌های شنی دارای ترمیم‌پذیری و مقاومت بالاتری هستند. پارامترهای مؤثر بر ترمیم‌پذیری خاک ۵ عامل خاک ساز (مواد مادر، زمان، اقلیم، توپوگرافی، موجودات زنده) هستند. عوامل محیطی، توپوگرافی، کاربری زمین، نوع خاک و مدیریت زمین تأثیر مستقیمی بر قابلیت ترمیم‌پذیری خاک دارند (Szabolcs،۱۹۹۴).

[1]maryamhocini@gmail.com

با توجه به اهمیت موضوع ترمیم‌پذیری خاک و هم‌چنین با توجه به این‌که هیچ تحقیقی دراین‌باره در ایران انجام نشده است و اهمیتی به این مسئله داده نشده است لازم دیده شد که درباره‌ی موضوع فوق تحقیقی صورت گیرد تا تأثیر قارچ‌کش و دما در حضور و عدم حضور ماده آلی بر این ویژگی ذاتی خاک بررسی شود.

مواد و روش‌ها

خاک مورد مطالعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری منطقه مهر مادر با مختصات جغرافیایی ۳۶/۳۵۵۲۳۸۱ طول شرقی و ۵۹/۶۳۸۵۹۵۹ عرض شمالی در سال ۹۸-۱۳۹۷ نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها سپس به آزمایشگاه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد برای انجام آزمایشات منتقل شد. ۱۳۵ نمونه ۲۰۰ گرمی درون ظرف‌های مخصوص تقسیم‌بندی شدند. به‌منظور مطالعه تأثیر قارچ‌کش و دما بر ترمیم‌پذیری خاک، ۴ آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام شد. فاکتور آزمایش اول شامل سه سطح دما (دمای ۲۵(T25)، ۳۵ (T35)و ۴۵ (T45)درجه سانتی‌گراد) و فاکتور آزمایش دوم شامل سه سطح قارچ‌کش کاربندازیم (بدون قارچ‌کش (FG0)، غلظت ۱۵۰۰ (FG1)و ۳۰۰۰ (FG2)میلی‌گرم در لیتر) بودند که در هر دو آزمایش فاکتور زمان شامل ۵ سطح (۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز) بود. در این دو آزمایش مقدار کربن بیومس در هر زمان اندازه‌گیری شده و پس از تجزیه آماری، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (آزمایش سوم) و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربندازیم (آزمایش چهارم) انتخاب شدند و این بار تأثیر حضور (۱/۵ درصد ماده آلی) و عدم حضور ماده آلی در زمان‌های ۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز بر میزان کربن بیومس خاک (روش اندازه‌گیری Sparling و West، ۱۹۸۸) بررسی شد.

در هر آزمایش به منظور برآورد ترمیم‌پذیری خاک از رابطه‌های Griffith و همکاران (۲۰۰۴) و با استفاده از کربن بیومس استفاده شد. بعد از اعمال تنش کربن بیومس اندازه‌گیری شد و از رابطه ۱ مقاومت خاک اندازه‌گیری شد. رابطه ۲ برای محاسبه شاخص مقاومت استفاده شد. با کسرکردن رابطه ۱ از شاخص مقاومت (رابطه ۲) ترمیم‌پذیری خاک محاسبه شد (رابطه ۳).

$$\text{resistance}(R_0) = -100\left[\frac{C_0 - P_0}{C_0}\right] \qquad \text{رابطه-۱}$$

C_0: مقدار کربن بیومس در نمونه شاهد P_0: مقدار کربن بیومس در نمونه تحت تنش R_0: مقامت خاک در اولین زمان بعد از تنش

$$\text{resistance index} = R_x = -100\left[\frac{C_x - P_x}{C_x}\right] \qquad \text{رابطه-۲}$$

$$\text{resilience index} = R_I = -(R_0 - R_x) \qquad \text{رابطه-۳}$$

C_X: مقدار کربن بیومس در نمونه شاهد P_X: مقدار کربن بیومس در نمونه تحت تنش R_X: مقامت خاک در طی زمان R_I: ترمیم‌پذیری خاک

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری JMP 8 استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی انجام شد.

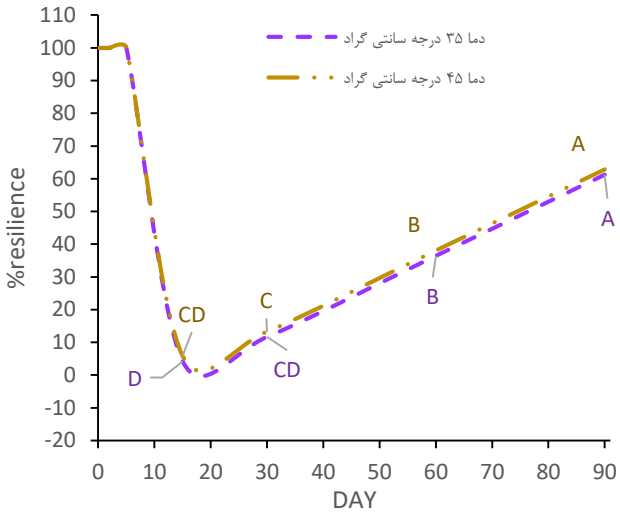
نتایج و بحث

نتایج دو آزمایش اول نشان داد که دما و قارچ‌کش بر میزان ترمیم‌پذیری خاک در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همبستگی معنی‌داری بین مقاومت و ترمیم‌پذیری نسبت به تغییرات دما و شاخص‌های تنوع میکروبی وجود دارد (Kuan و همکاران، ۲۰۰۷). البته در دو آزمایش دیگر نیز تأثیر ماده آلی بر میزان ترمیم‌پذیری نمونه‌های خاک تحت تیمار دمای بالا و قارچ‌کش نیز تأثیر معنی‌داری در سطح آماری یک درصد داشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱ و ۲) نشان داد که با اعمال تیمار دمایی، مقدار ترمیم‌پذیری خاک به شدت کاهش یافت و این کاهش تا ۱۵ روز پس از اعمال تنش ادامه داشت سپس بعد از ۱۵ روز ترمیم‌پذیری خاک افزایش یافت. نتایج نشان داد که اعمال دمای ۳۵ و ۴۵ درجه بر توانایی ترمیم‌پذیری خاک از نظر آماری معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد گستره دو دمای اعمال شده بر خاک به اندازه‌ای نبوده است که بر ترمیم‌پذیری تأثیر قابل توجهی داشته باشد. بررسی‌ها نشان داده که دما از عوامل مهم تأثیرگذار بر رشد گیاهان و فعالیت ریزجانداران (که شاخص‌های حساس ترمیم‌پذیری هستند)

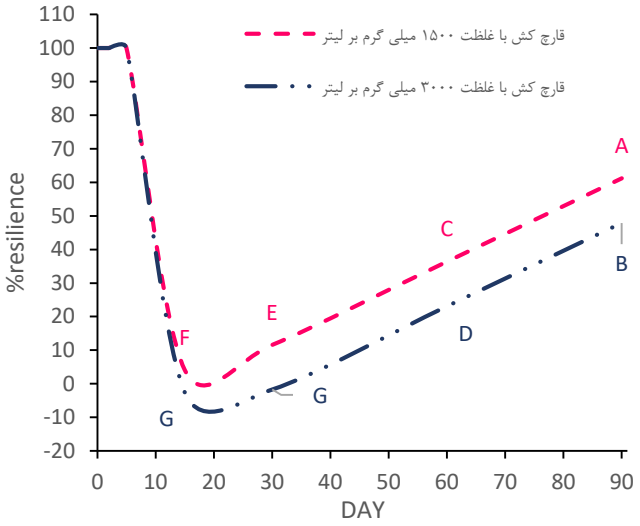
می‌باشد. نرخ واکنش‌های شیمیایی خاک برای افزایش هر ۱۰ درجه ۲ برابراست. آب‌وهوا مهم‌ترین عامل خاک است که روی مجموعه فعالیت‌های زنده (رشد گیاهان و حیوانات خاک) مؤثر است (Lal و همکاران، ۲۰۰۸). اعمال تیمار قارچ‌کش ترمیم‌پذیری خاک را با شدت بالاتری از تیمار دما کاهش داده بود و روند تغییراتی یکسانی با زمان در مقایسه با دما داشت. نتایج نشان داد که اعمال سطوح ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قارچ‌کش بر توانایی ترمیم‌پذیری خاک از نظر آماری معنی‌دار ($p<0.01$) بود. تأثیر حضور ماده آلی بر میزان ترمیم‌پذیری خاک در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (شکل ۳) و سطح ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربندازیم (شکل ۴) نشان داد که ترمیم‌پذیری خاک در حضور ماده آلی افزایش یافت. مطالعات نشان داده که استفاده مداوم از قارچ‌کش‌ها سبب تغییر در خصوصیاتی مانند جمعیت ریز جانداران می‌شود (Mansourzadeh و Raiesi، ۲۰۱۲). Eisenhauer و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده کردند که کاربرد سموم با توجه به غلظت و زمان استفاده؛ ممکن است اثرات افزایشی یا کاهشی بر روی شاخص‌های زیستی داشته باشند. نتایج این آزمایش نشان داد که به مرور زمان، مقدار ترمیم‌پذیری خاک افزایش یافت در این زمینه Baath و Diaz-Ravina (۱۹۹۶) گزارش کردند که علت این افزایش در میزان ترمیم‌پذیری احتمالاً به دلیل مقاوم‌تر شدن و سازگاری ریز جانداران خاک با شرایط محیطی جدید و به تبع آن افزایش فعالیت آن‌ها می‌باشد. همچنین در مورد میزان نهایی ترمیم‌پذیری اندازه‌گیری شده در این آزمایش (روز ۹۰) نتایج نشان از عدم بازیابی کامل خاک داشت که در این مورد گزارش شده است که احتمالاً علت این امر از بین رفتن گونه‌های مفید خاک در طی تنش بوده و گونه‌های باقی‌مانده نتوانسته‌اند وظایف کارکردی مربوط به کل ریز جانداران خاک را انجام دهند (Almås و همکاران ۱۹۹۹). برخی از مطالعات نشان می‌دهند که افزایش متوسط درجه حرارت خاک، افزایش رشد گیاهی و فعالیت‌های بیولوژیکی که موجب افزایش ماده آلی خاک می‌شود سبب افزایش ترمیم‌پذیری شده همچنین رویدادهای شدید مانند طوفان‌ها، باران‌های شدید، جاری شدن سیل و خشک‌سالی ممکن است به‌شدت سبب کاهش توانایی بهبود یک خاک گردند. در مورد تأثیر افزودن ماده آلی بر میزان ترمیم‌پذیری خاک مطالعات نشان داده که حضور ماده الی باعث افزایش میزان فعالیت ریز جانداران و به تبع آن افزایش میزان ترمیم‌پذیری خاک می‌شود (Lal و همکاران ۲۰۰۸).

جدول (۱) نتایج تجزیه واریانس چهار آزمایش انجام شده

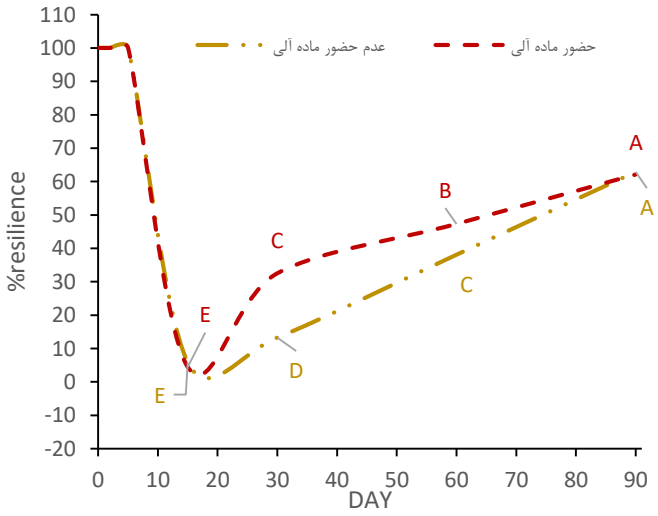
	منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	P
آزمایش تأثیر دما بر ترمیم‌پذیری خاک	دما	۲	۸۱۳۷۵/۴۱۵	<۰/۰۱**
	زمان	۴	۳۸۱۴۱/۱۵۳	<۰/۰۱**
	زمان×دما	۸	۱۹۲۳۰/۶۲۸	<۰/۰۱**
	خطای آزمایشی	۳۰	۲۶۹/۳۵	-
آزمایش تأثیر قارچ‌کش بر ترمیم‌پذیری خاک	قارچ‌کش	۲	۹۹۹۱۱/۹۴۰	<۰/۰۱**
	زمان	۴	۴۶۲۱۷/۹۵۷	<۰/۰۱**
	زمان×قارچ‌کش	۸	۲۳۱۷۲/۱۸۸	<۰/۰۱**
	خطای آزمایشی	۳۰	۹۱/۵۶	-
آزمایش تأثیر ماده آلی بر ترمیم‌پذیری خاک تحت تیمار دمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد	ماده آلی	۱	۱۰۶/۳۸۴	۰/۰۰۷**
	زمان	۴	۶۸۹۴۰/۷۲۰	<۰/۰۱**
	زمان×ماده آلی	۴	۶۶۸/۰۸۸	<۰/۰۱**
	خطای آزمایشی	۲۰	۱۳۲/۷۱۸	
آزمایش تأثیر ماده آلی بر ترمیم‌پذیری خاک تحت تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر قارچ‌کش	ماده آلی	۱	۲۵/۰۷۱	۰/۰۰۹۹**
	زمان	۴	۶۷۶۵۳/۸۳۹	<۰/۰۱**
	زمان×ماده آلی	۴	۳۵۴/۵۶۰	<۰/۰۱**
	خطای آزمایشی	۲۰	۶۱/۷۹۱	



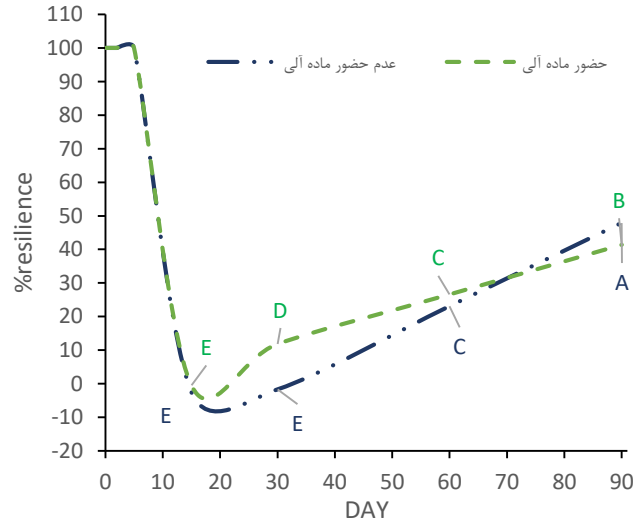
شکل۱- تأثیر دما بر ترمیم‌پذیری خاک در طی زمان



شکل۲- تأثیر قارچ‌کش بر ترمیم‌پذیری خاک در طی زمان



شکل۳- تأثیر ماده آلی بر ترمیم‌پذیری خاک تحت تنش دما با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در طی زمان



شکل۴- تأثیر ماده آلی بر ترمیم‌پذیری خاک تحت تنش قارچ‌کش با غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در طی زمان

نتیجه‌گیری

سطوح بالای قارچ‌کش و دما سبب کاهش ترمیم‌پذیری خاک شدند که تأثیر منفی قارچ‌کش نسبت به دما بر ترمیم‌پذیری بیشتر بود. کاهش به وجود آمده بر ترمیم‌پذیری احتمالاً به دلیل از بین رفتن جامعه میکروبی خاک بود که سبب کاهش کربن بیومس خاک شد. میزان ترمیم‌پذیری خاک مورد مطالعه در طی زمان به مرور افزایش یافت و نزدیک به ۶۰ درصد مقدار اولیه خود رسید. همچنین در این تحقیق حضور مقدار ۱/۵ درصد ماده آلی تأثیر مثبتی بر افزایش ترمیم‌پذیری خاک داشت.

منابع

Abdel Kawy, W. A. M. and Ali. R.R. 2012. “Assessment of Soil Degradation and Resilience at Northeast Nile Delta, Egypt: The Impact on Soil Productivity.” The Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Science 15(1):19–30.

Almås, Å., Lars, R., Bakken, R. and Mulder, J. 2004. “Changes in Tolerance of Soil Microbial Communities in Zn and Cd Contaminated Soils.” Soil Biology and Biochemistry 36(5):805–13.

Blanco-Canqui, H., and Lal, R. 2008. Principles of soil conservation and management. Springer Science & Business Media.

Diaz-Ravina, M. and Baath. E. 1996. “Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial Communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels.” Applied and Environmental Microbiology 62(8):2970.

Eisenhauer, N., Klier, M., Partsch, S., Sabais, A., Scherber, C., Weisser, W. and Scheu. S. 2009. “No Interactive Effects of Pesticides and Plant Diversity on Soil Microbial Biomass and Respiration.” Applied Soil Ecology 42(1):31–36.

Griffiths, B. S., Kuan, H.L., Ritz, K.,Glover, L.A., McCaig, A.E. and Fenwick. C. 2004. “The Relationship between Microbial Community Structure and Functional Stability, Tested Experimentally in an Upland Pasture Soil.” Microbial Ecology 47(1):104–13.

Kuan, H. L., Hallett, P. D., Griffiths, B. S., Gregory, A. S., Watts, C. W., and Whitmore, A. P. 2007. The biological and physical stability and resilience of a selection of Scottish soils to stresses. European journal of soil science, 58(3), 811-821.

Lal, R. 1997. “Degradation and Resilience of Soils.” Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 352(1356):997–1010.

Lal, R. (Department of Agronomy, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 (USA)). 1994. “Sustainable Land Use Systems and Soil Resilience.”

Mansourzadeh, M.and Raiesi, F. 2012. “The Effect of Eradican (EPTC) on Microbial Biomass C and N, and Urease and Arylsulphatase Activities in a Calcareous Soil under Field Conditions.” JWSS - Isfahan University of Technology 16(59):153–67.

Sparling, G.P. and West. A. W. 1988. “A Direct Extraction Method to Estimate Soil Microbial C: Calibration in Situ Using Microbial Respiration and 14C Labelled Cells.” Soil Biology and Biochemistry 20(3):337–43.

Szabolcs, I. 1994.The Concept of Soil Resilience.

Tenywa, MM, R. Lal, … MJG Majaliwa-Sustaining the Global, and Undefined 1999. n.d. “Characterization of the Stages of Soil Resilience to Degradative Stresses: Erosion. Walkley, A., and Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science, 37(1): 29 -38.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Bio-fertilizer

Effect of organic matter on soil resilience of treated soil trough temperature and Karbendazim fungicide

Hosseini*[1], M.S., Lakzian[2], A., Astaraei[3], A. R.

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[2] Professor.Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[3] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Resilience is one of the important characteristics of arable soils that many environmental factors can affect this intrinsic property of the soil. Four experiments were carried out in a completely randomized design with factorial arrangement with three replications in order to investigate the effect of fungicide and temperature over time on soil resilience in the presence and absence of organic matter. In the first two experiments, the effect of fungicide and temperature on the amount of soil resilience (measured by carbon biomass) was investigated and then the most effective selective treatments of these two experiments were studied on the amount of soil resilience in the presence of organic matter (1.5%). The results showed that the effect of fungicide and temperature on soil resilience was significant ($p < 0.01$). By increasing fungicide concentration and raising the temperature, soil resilience decreased. The concentration of 3000 mg /L of fungicide and temperature of 45 ℃ showed the most reduction in soil resilience. But over time, this inherent property of the soil increased. The organic matter also had a positive effect on treated soil resilience. In general, seems to the presence of organic matter due to the positive effect on microorganism activity cause improvement of soil resilience after stress as soon as possible.

Keywords: Stress, Soil management, Sustainable agriculture

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در انحلال فسفات نامحلول در محیط جامد و مایع در دمای ثابت و متغیر

علیرضا فلاح نصرت آباد[۱]، آزاده صداقت[۲*]

[۱] دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۲] دانشجوی دکترای گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

باکتری‌های حل‌کننده فسفات قادرند فسفات‌های معدنی نامحلول را در محیط جامد و مایع حل کرده و مقادیری فسفر آزاد نمایند. این باکتری‌ها توانایی متفاوتی در دماهای مختلف دارند. هدف از انجام این تحقیق بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری‌ها در محیط جامد و مایع در دماهای مختلف می‌باشد. در این تحقیق تیمارها شامل ۱۱ باکتری (P43-1، P39، P9، P56-2، P60-2، P21-1، P3، P72-2، P55-2، P55-1 و P5) می‌باشند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر ساده باکتری، روز و اثرات متقابل باکتری و روز در تمام خصوصیات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در محیط جامد و مایع و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار است. در دمای ۴۰ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رشدی مشاهده نشد، بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات نسبت به افزایش دما حساس هستند و در دمای بالاتر رشدی نخواهند داشت و با گذشت زمان مقدار آزادسازی فسفر از محیط بیشتر و عملکرد باکترها در تولید هاله شفاف و کلنی افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، محیطجامد، براث، منطقه هاله

مقدمه

دو روش کیفی و کمی برای بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات ریزجانداران وجود دارد. در بررسی کیفی، ایجاد هاله شفاف و یا نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی در کشت جامد شاخص توانایی حل فسفات باکتری‌هاست (Liu و همکاران، ۲۰۱۵). در بررسی کمی که درکشت آبی و درون شیشه انجام می‌شود، مقدار فسفر محلول ، اندازه‌گیری و میزان آن به‌عنوان توانایی در حل فسفات معدنی گزارش می‌شود (Sinha and Paul، ۲۰۱۳). پژوهش‌گران نیز کاهش اسیدیته کشت مایع باکتری حل‌کننده فسفات را گزارش کردند (Spagnoletti و همکاران، ۲۰۱۷). Rashid و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که گاهی در زیستگاه دارای اسیدیته زیاد نیز حل کانی‌های فسفری رخ می‌دهد و این به کلاته شدن اسیدهای‌آلی با یون کلسیم در تری کلسیم فسفات وابسته است. Behera و همکاران (۲۰۱۷) هم‌بستگی مثبتی میان حل شدن فسفات و اسیدیته گزارش کردند. تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها قابلیت حل و معدنی کردن فسفر دارند. باکتری‌های خاکی که که می‌توانند فسفر غیرقابل حل را از طریق حلالیت و معدنی کردن به‌صورت قابل دسترس گیاه تبدیل می‌کنند، شامل Pseudomonas spp، Agrobacteriumspp و Bacillus circulans (Babalola and Glick, 2012b)، Azotobacter (Kumar و همکاران، ۲۰۱۴)، Burkholderia (Istina و همکاران، ۲۰۱۵) و غیره می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری‌ها در محیط جامد و مایع می‌باشد.

مواد و روش

آزمون فعالیت حل‌کنندگی فسفات با حضور ۱۱ گونه باکتری حل‌کننـده فـسفات در آزمایشگاه بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب روی محیط کشت اسپربر جامد (Sperber agar) انجام شد (اسپربر، ۱۹۵۸). هر باکتری روی پتری حاوی محیط کشت اسپربر به‌صورت لکه‌ای کشت داده شد و در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد به مدت چهارده روز در گرمخانه قرار داده شد و قطر کلنی و قطر هاله ظاهر شده در اطراف کلنی در طی ۱۴ روز و در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دهم و چهاردهم اندازه‌گیری شد. در مرحله‌ی بعدی قدرت ایجاد هاله ۱۱ باکتری فعال در سه دمای ۲۸، ۴۰، ۶۰ درجه‌ی

* ایمیل نویسنده مسئول: azadehsedaghat65@gmail.com

سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. آزمون فعالیت حل‌کنندگی فسفات معدنی تمامی جدایه‌ها روی محیط کشت اسپربر مایع (Sperber agar) هم انجام شد (اسپربر، ۱۹۵۸). pH و فسفر محلول (روش زرد مولیبدات وانادات) در روزهای اول، سوم، دهم و چهاردهم، با استفاده از روش طیف سنجی در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (اسپربر، ۱۹۵۸). محاسبات آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار آماری SAS (SAS Institute, 2000) انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید (استل، ۱۹۶۰).

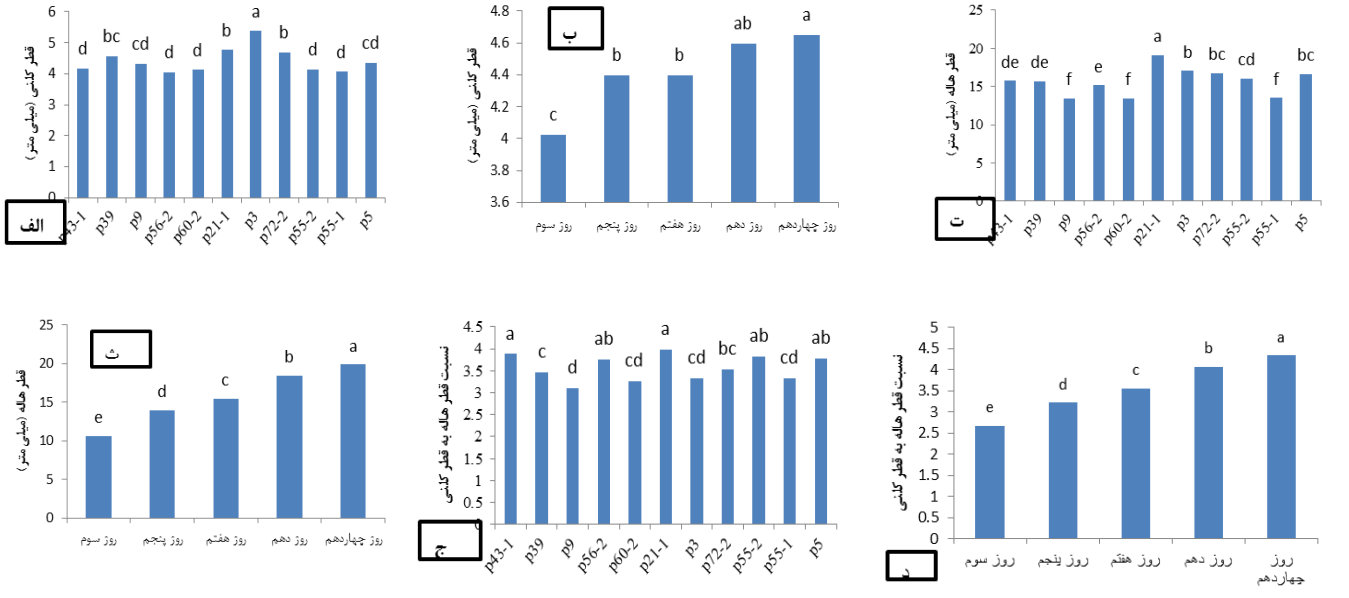
بحث و نتایج

الف- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان حل فسفات معدنی در محیط جامد

تمام باکتری‌های استفاده شده گرم منفی و به شکل باسیل (میله‌ای) بودند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده باکتری و روز در تمام صفات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار و اثر دوگانه باکتری و روز فقط بر قطر هاله (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار بوده است (نتایج نشان داده نشده است).

الف-۱-مقایسه اثر باکتری و روز بر قطر هاله، قطر کلنی و قطر هاله به قطر کلنی

مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و اثر اصلی روز را بر قطر کلنی در شکل ۱ (الف و ب) نشان داده شده است. در شکل ۱-الف ، مشاهده می‌شود باکتری p43-1، p56-2، p60-1، p55-2 و p55-2 اثر یکسان و مشابه و باکتری‌هایp39، p21-1 و p72-2 اثر یکسان و مشابه بر روی قطر کلنی اثر گذاشتند، ولی اختلاف معنی‌داری باهم ندارند. در بین این باکتری‌ها، باکتری p3 بیشترین اثر معنی‌داری بر قطر کلنی نشان داد. شکل (۱-ب) میانگین اثر اصلی روز را نشان می‌دهد که حداکثر قطر کلنی در روز چهاردهم می‌باشد. مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری، روز را بر قطر هاله در شکل ۱ (ت و ث) مشاهده می‌شود. نمودار مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله (شکل ۱-ت)، نشان داد که باکتری P_{21-1} بزرگترین قطر هاله را دارد. شکل ۱-ث، مشاهده می‌شود که در روز چهاردهم بزرگترین قطر هاله را داشتند. شکل۱ ج و د، به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر باکتری و روز را بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۱-ج، تیمار P_{21-1} بیشترین تاثیر را بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی داشته و در مورد اثر روز بر این صفت بیش‌ترین قطر هاله نسبت به قطر کلنی در روز چهاردهم مشاهده شد.



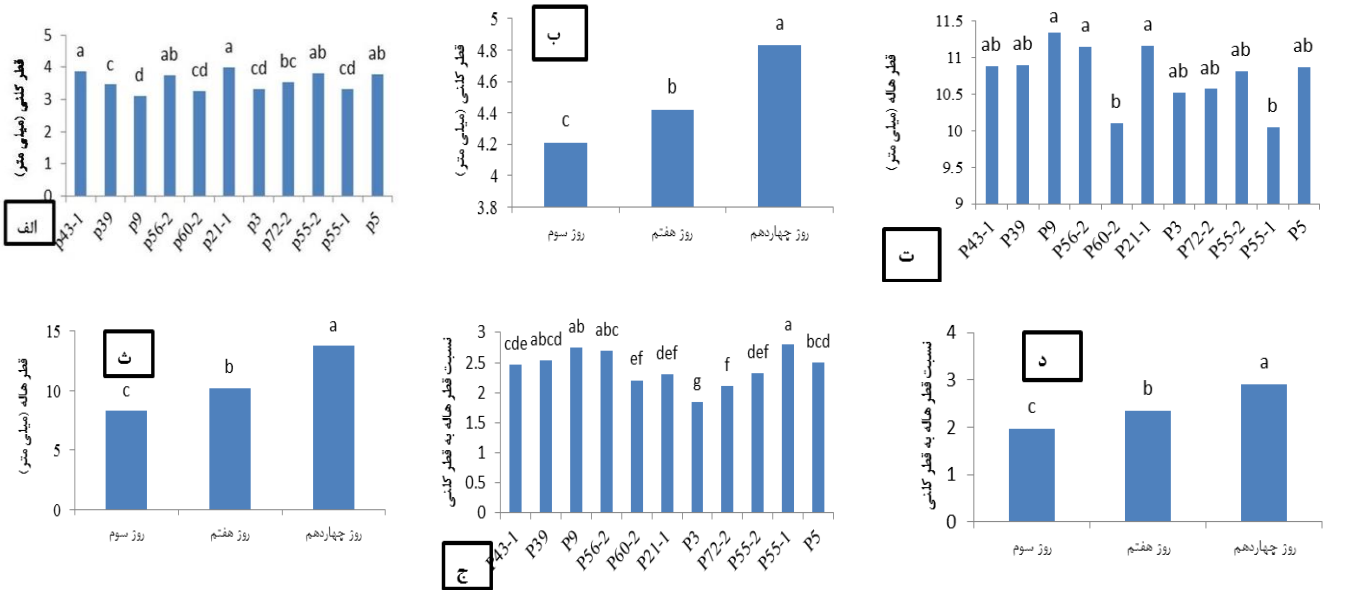
شکل ۱- الف) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر کلنی ب) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر کلنی ت) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر هاله ث) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر هاله ج) مقایسه اثر اصلی باکتری بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی د) مقایسه اثر اصلی روز بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی

الف-۲- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان حل فسفات معدنی در محیط جامد در درجه حرارت‌های مختلف

نتایج تجزیه واریانس نشان داد (نتایج نشان داده نشده است) اثر ساده باکتری، روز و اثرات متقابل باکتری و روز در تمام خصوصیات قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار است. در دمای ۴۰ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رشدی مشاهده نشد. به‌وجود آمدن منطقه روشن اطراف کلنی میکروارگانیسم‌ها در پلیت نشان‌دهنده وجود میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است (فلاح، ۱۳۸۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود در مورد تاثیر روز، بالاترین قطر کلنی در روز چهاردهم بود و کمترین در روز سوم مشاهده شد و گذشت زمان اثر مثبتی بر بزرگ‌تر شدن قطر کلنی داشته است (شکل ۲-ب). بعضی گونه‌های باکتریایی توانایی معدنی کردن و حل کردن را به‌ترتیب برای فسفرآلی و غیرآلی دارند (Khiari and Parent, 2005). بیشترین تاثیر را باکتری P_{21-1} در روز چهاردهم و کمترین تاثیر را باکتری P_{55-1} در روز سوم بر قطر هاله داشته است. شکل ۲- ت و ث، به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر باکتری و روز بر قطر هاله نشان می‌دهند. بیشترین تاثیر را باکتری P_9 وکمترین تاثیر را باکتری P_{55-1} بر قطر هاله داشته است. و مشابه اثر روز بر قطر کلنی در اینجا هم قطر هاله در روز چهاردهم بیشترین مقدار و در روز سوم کمترین مقدار را نشان داده است. شکل ۲ (ج و د) به ترتیب اثر باکتری بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی و مقایسه اثر روز بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی در محیط جامد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد را نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۲-ج به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را باکتری‌های P_{55-1} و P_3 نشان دادند. در روز چهاردهم بیشترین و روز سوم کمترین تاثیر بر نسبت قطر هاله به قطر کلنی مشاهده شد به‌طور کلی افزایش تعداد و تنوع میکروارگانیسم‌ها و اثرات متقابل جوامع میکروبی باعث افزایش تعداد و تنوع اسیدهای آلی موثر در فرایند انحلال فسفات‌های نامحلول می‌شود (Sharma, 2002).

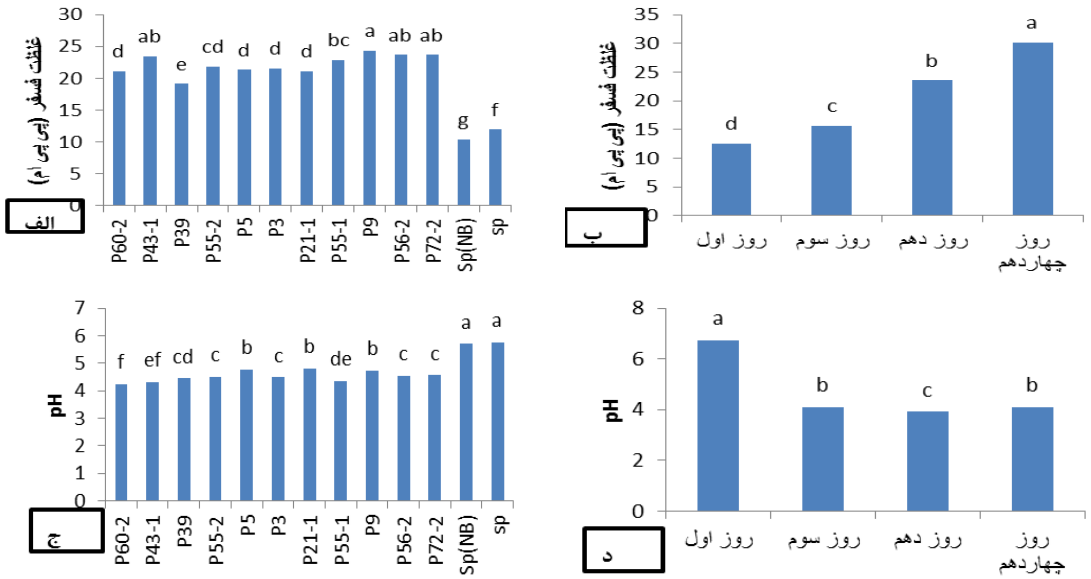
ب- مقایسه باکتری‌ها از نظر توان آزادسازی فسفر در محیط مایع

نتایج تجزیه واریانس (نتایج نشان داده نشده است) اثر باکتری، روز و اثر متقابل باکتری و روز بر غلظت فسفر و pH معنی‌دار (در سطح احتمال یک درصد) شدند.



شکل ۲- الف) مقایسه اثر اصلی باکتری بر قطر کلنی، ب) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر کلنی، ت)مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله، ث) مقایسه اثر اصلی روز بر قطر هاله، ج) مقایسه اثر باکتری بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی، د) مقایسه اثر روز بر قطر هاله نسبت به قطر کلنی

شکل ۳ (الف و ب) به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و روز را بر غلظت فسفر نشان می‌دهند. باکتری P_9 بیش‌ترین تاثیر را بر غلظت فسفر داشت و کمترین تاثیر را باکتری sp(NB) نشان داد. در مورد زمان روز چهاردهم بالاترین اثر و روز اول کمترین اثر را داشته است. در واقع از روز سوم تا روز چهاردهم غلظت فسفر به آرامی افزایش یافته است. کشت‌های مخلوط میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات (باسیلوس، استرپتومایسس، پسودوموناس و غیره) در معدنی کردن فسفات آلی بسیار موثر هستند (Molla و همکاران، ۱۹۸۴). شکل ۳ (ج و د) به‌ترتیب مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و روز را بر pH نشان می‌دهند. بالاترین و کمترین pH را به‌ترتیب باکتری‌های sp و p_{60-2} نشان دادند. در مورد اثرات روز بالاترین pH در روز اول و پایین‌ترین در روز دهم می‌باشد. مقدار فسفر محلول و pH آن در طی ۱۴ روز از کشت باکتری‌ها در محیط حاوی تری‌کلسیم‌فسفات اندازه‌گیری شد که فسفات محلول در طی ۱۰ روز، افزایش و سپس کاهش داشت و با افزایش فسفر pH کاهش یافت(Taha et al, 1969). ارتباط مشخصی بین کاهش در مقدار pH، افزایش فعالیت فسفاتاز و فسفر قابل‌دسترس در محیط کشت مایع پیکووسکایا وجود دارد (Schoebitz و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به شکل ۳-د pH در روز دهم کاهش و در روز چهاردهم دوباره افزایش یافته است و با pH در روز سوم در یک سطح قرار گرفته‌اند. کیوسی (۱۹۸۳) در پژوهش خود دریافت که چهار جدایه باکتریایی که توانایی حل کردن فسفات را در PDYA داشتند توانایی بسیار کمتری در محلول حاوی سنگ فسفات از خود نشان دادند. pH محیط در تمام موارد کاهش داشته ولی هیچ رابطه‌ای بین کاهش pH و افزایش فسفر آزاد شده وجود نداشت .بین میزان فسفر انحلال یافته و pH محیط همبستگی منفی وجود دارد (r^2=۰/۸۲)، به طوری که با افزایش میزان انحلال، pH محیط بیشتر کاهش می‌یابد (مراد خانلو و همکاران، ۱۳۹۰).



شکل ۳- الف) مقایسه اثر باکتری بر غلظت فسفر ب) مقایسه اثر روز بر غلظت فسفر ج) مقایسه اثر باکتری های حل کننده فسفات بر pH د) مقایسه اثر روز بر مقدار pH

نتیجه گیری

در بررسی قدرت باکتری‌ها درانحلال فسفات در محیط جامد مشخص شد که در روز چهاردهم قطر کلنی، قطر هاله و نسبت قطر هاله به قطر کلنی بالاتر است. بررسی توانایی انحلال فسفات توسط باکتری‌های حل کننده فسفات در محیط جامد در دماهای ۲۸ و ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد نیز بررسی شد که در دماهای ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیچ رشدی مشاهده نگردید و این ممکن است به‌دلیل از بین رفتن این باکتری‌ها در درجه حرارت‌های بالاتر باشد. در محیط مایع مشخص شد که در روز چهاردهم بیشترین غلظت فسفر را داشتیم و در محیط مایع شاهد یعنی محیط مایع

اسپربر بدون باکتری و محیط مایع اسپربر همراه با محیط مایع نوترینت براث بدون تلقیح باکتری بالاترین pH مشاهده شد. تیمار P_{56-2} در روز چهاردهم تاثیر زیادی بر غلظت فسفر در محیط مایع داشته و تیمار P_{21-1} در روز اول بیشترین pH را نشان داده است.

منابع

فلاح نصرت آباد، ع.ر. ۱۳۸۲. بررسی پراکنش میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های استان گیلان و اثربخشی آن‌ها در عملکرد گندم و برنج. پایان نامه دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۴ ص.

مرادخانلو، د.س.، علیخانی، ح.ع. و علی عبادی نهاری، ع.۱۳۹۰. ارزیابی توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی توسط باکتری های ریزوبیومی. اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه.

Babalola, O.O. and. Glick, B.R. 2012. Indigenous African agriculture and plant associated microbes: current practice and future transgenic prospects." Scientific Research and Essays, 28, 2431-2439.

Behera, BC., Yadav, H., Singh, SK., Mishra, RR., Sethi, BK. and Dutta, SK. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of Serratia SP. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15, 169-178.

Istina, I.N., Widiastuti, H., Benny, J. and Antralina, M. 2015. Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake." Procedia Food Science, 3, 426-435.

Khiari, L. Parent, L., E. 2005. Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry swin e manure can. J. soil sci. 85: 75-87.

Kumar, K., Chitralekha, N.D. and Debabrata, D. 2014. Cell growth kinetics of Chlorella sorokiniana and nutritional values of its biomass." Bioresource technology, 167, 358-366.

Liu, Z., Li, YC., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, JS., Zhang, M. 2015. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Applied Soil Ecology, 96, 217-224.

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

Paul, D. and Sinha, SN. 2013. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. Advances in Applied Science Research, 4, 409-412.

Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F.2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan of Jurnal Biological Science, 7, 187-196.

Sharma, A. K. 2002. Bio-fertilizers for sustainable agriculture. Agrobios Indian publications. 456 pp.

Spagnoletti, FN., Tobar, NE., Fernandez, Di., Pardo, A., Chioccchio, VM. and Lavado, RS. 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium iron and aluminum phosphates. Applied Soil Ecology, 111, 25-32.

Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res,9, 778-781

Steel, R.D. and Tore, J.H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw-Hill, Toronto, 481 pp.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Investigation of the Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Solubility of Insoluble Phosphate in a Solid and Liquid Culture medium at different temperatures

Alireza Fallah Nosratabad[1], Azadeh Sedaghat [*2]

[1] Associate Professor of Soil Biology Research, Soil and Water Research Institute, Research, Education and Agricultural Extension Organization, Karaj, Iran

[2] Ph.D Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Due to the high pH of soils in Iran, the absorption of nutrients by plants, especially the absorption of phosphorus is difficult. The purpose of this study was to investigate the solubility of phosphate by bacteria in solid and liquid Culture media at different temperatures. In this research, the treatments included 11 bacteria (P43-1, P39, P9, P56-2, P60-2, P21-1, P3, P72-2, P55-2, P55-1 and P5). The results of analysis of variance showed the simple effect of bacteria, day and the interaction between bacteria and day on all characteristics of colony diameter, halo diameter and halo diameter to colony diameter in solid and liquid medium at 28 ° C (at a probability level of 1%) is significant. Growth was not observed at 40 ° C and 60 ° C. Therefore, the results of this study showed that phosphate solubilizing bacteria are sensitive to temperature increase and do not grow at higher temperatures and the results of this study showed that the amount of phosphorus release from the medium increased over time and the bacterial function increased in the production of transparent halo and colony

Keywords: Phosphate Solubilizing Bacteria, Solid, Broth, Halo zone

[*] Corresponding author, Email: Azadehsedaghat65@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در رشد و اجزاء عملکرد گیاه ذرت در شرایط گلخانه‌ای

علیرضا فلاح نصرت آباد[۱]، آزاده صداقت[۲*]

[۱]دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۲]دانشجوی دکترای گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

به‌دلیل بالا بودن pH خاک‌های کشور و آهکی بودن خاک‌ها حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد کودهای شیمیایی فسفره مورد استفاده در خاک از طریق تولید ترکیبات نامحلول در خاک‌های آهکی و اسیدی توسط یون‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیم باعث خارج شدن فسفر از دسترس گیاهان می‌شوند، لذا استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند مفید باشد. این تحقیق طی یک طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی در شرایط گلخانه‌ای در موسسه تحقیقات خاک و آب (کرج) انجام شد و هدف این تحقیق بررسی تاثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفر بر رشد و عملکرد گیاه ذرت (رقم ۷۰۴) بود. تیمارها که شامل ۸ باکتری (B_0، B_1، B_2، B_3، B_4، B_5، B_6، B_7) و ۴ سطح کود سوپرفسفات تریپل (۰، ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ ٪) با ۳ تکرار در گلدان اجرا شد. نتایج حاکی از این بود که اثرات متقابل باکتری و کود در بیش‌تر صفات تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد داشته است. در کل نتایج این آزمایش بیانگر این است که کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات نقش مفیدی در بهبود عملکرد و رشد گیاه ذرت دارند، بنابراین می‌توان به استفاده‌ی آن‌ها به‌عنوان مکمل کود سوپرفسفات تریپل امیدوار بود.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده فسفات، فسفر، کود سوپر فسفات تریپل، ذرت

مقدمه

ذرت با نام علمی Zea mays L. پس از گندم و برنج مهم‌ترین ماده غذایی را در دنیا تشکیل می‌دهد (Poehlman, 1995). فسفر از عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاه محسوب می‌شود. کمبود این عناصر خسارت قابل ملاحظه‌ای را به محصولات کشاورزی وارد می‌کند، و با توجه به pH بالا و آهکی بودن خاک ایران (Nael و همکاران، ۲۰۱۴)، این عنصر در اثر ترکیب کلسیم، آلومینیوم و آهن در خاک به‌صورت رسوب در می‌آید و از دسترس گیاه خارج می‌شود (Kacar and Katkat, 2010) که این مسئله از ضرورت انجام این تحقیق می‌باشد. فسفر به دو فرم فسفات آلی و معدنی در خاک وجود دارد (Sankaralingam و همکاران، ۲۰۱۴). Zarabi و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای نشان دادند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات با افزایش رشد ذرت و جذب فسفر، منجر به افزایش تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش کم‌آبی شدند. نتایج پژوهش‌های چودهاری و همکاران (۲۰۱۷) بر گندم نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌دلیل شرایط مناسب محیطی و در اختیار قرار دادن آب و عناصر غذایی برای گیاه موجب زیاد شدن شاخص سطح برگ، سرعت رشد محصول، سرعت جذب خالص و سرعت رشد نسبی می‌شود. پژوهش‌های سایر محققین نشان داده است که تلقیح گندم با باکتری‌های فزاینده رشد و قارچ میکوریزا از طریق دسترسی گیاه به آب و موادغذایی موجب افزایش رشد گیاه گردید (Shahhosseini و همکاران، ۲۰۱۲). هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر اجزاء عملکرد ذرت و کاهش مصرف کود شیمیایی فسفاته آن می‌باشد.

مواد و روش

در این تحقیق تاثیر باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفر در گلخانه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در خاک استریل بر اجزاء عملکرد کمی و کیفی ذرت بررسی شد. تیمارها شامل ۸ باکتری (B0، B1، B2، B3، B4، B5، B6، B7) و ۴ سطح کود سوپر فسفات تریپل (۰، ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) با ۳ تکرار در گلدان اجرا شد. ضمنا یک تیمار PX بدون باکتری (B0 PX) با دو برابر مقدار فسفر توصیه شده و ۳ تکرار نیز مورد بررسی قرار گرفت. تیمار P0 بدون کود، P40 مقدار ۰/۲۲ گرم کود، P70 مقدار ۰/۳۹ گرم کود، P100 مقدار ۰/۵۵ گرم کود و PX مقدار ۱/۲۵ گرم کود سوپر فسفات تریپل در گلدان می‌باشد. رقم بذر مورد کشت ۷۰۴ بود. در زمان کاشت، بذور با باکتری‌های مشخص تلقیح شدند (یک میلی‌لیتر به هر

* ایمیل نویسنده مسئول: Azadehsedaghat65@gmail.com

بذر تلقیح شد). بعد از سه ماه اندام هوایی گیاه را از بالای بند اول جدا کرده و وزن تر و خشک آن اندازه گرفته شد. محاسبات آماری داده‌ها به‌وسیله نرم افزار آماری SAS (SAS Institute, 2000) انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید (استل، ۱۹۶۰).

بحث و نتایج

تاثیر تیمارها در عملکرد و اجزا عملکرد:

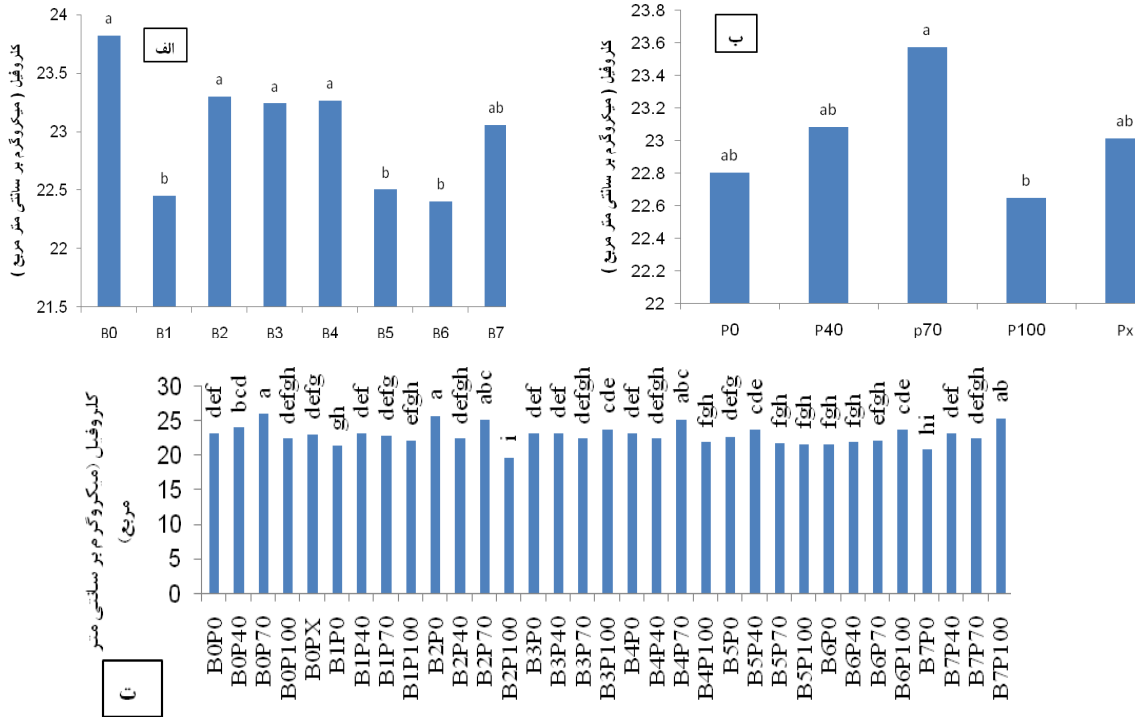
نتایج تجزیه واریانس (نتایج نشان داده نشده است) نشان داد که اثر اصلی باکتری، کود و اثرات متقابل آن‌ها بر ارتفاع گیاه تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان ندادند، اما بر باقی صفات در سطح ۱٪ معنی‌دار شدند.

۱) کلروفیل

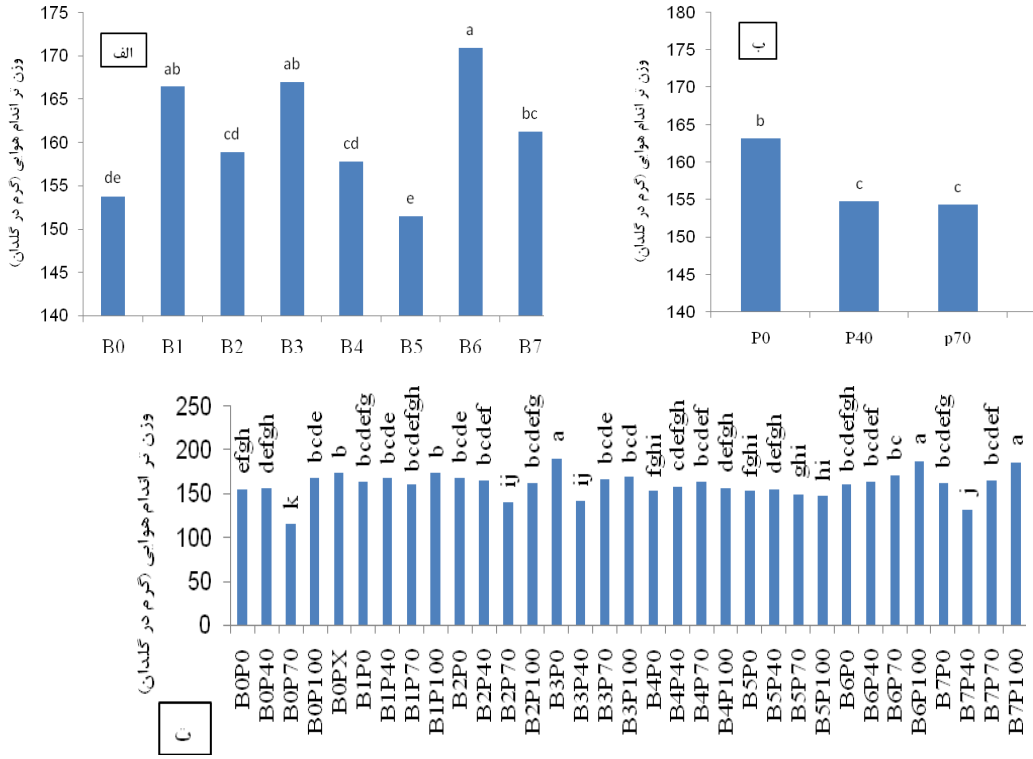
تاثیر اصلی باکتری، کود و اثرات متقابل آن‌ها بر کلروفیل نشان داد (شکل ۱) که بالاترین تاثیر بر کلروفیل را تیمار شاهد (B0) داشته که با باکتری‌های B2، B3 و B4 در یک سطح قرار می‌گیرد و کمترین تاثیر را تیمار B6 نشان داد. در غیاب کود شیمیایی فسفر، میکروارگانیسم‌های حل-کننده‌ی فسفات به‌طور قابل توجهی قادر به افزایش مقدار کلروفیل برگ بودند (Mehrvarz و همکاران، ۲۰۰۸).

۲) وزن تر اندام هوایی

شکل ۲ مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری و اثر اصلی سطوح مختلف کود و تاثیر متقابل آنها را بر وزن تر اندام هوایی نشان می‌دهند. بیشترین تاثیر را بر وزن تر باکتری B6 و کمترین تاثیر را باکتری B5 نشان دادند. PX بیشترین تاثیر و P70 کمترین تاثیر را نسبت به شاهد بر وزن تر داشتند. و در مورد اثرات متقابل باکتری و کود سوپرفسفات تریپل، تیمار B3P0 و تیمار B0P70 به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر وزن تر اندام هوایی دارند. شکل ۲-ت نشان داد که افزایش سطح کود سوپر فسفات تریپل بر وزن تر اندام هوایی تاثیر مثبتی گذاشته است.



شکل ۱. مقایسه اثر: الف) اصلی باکتری بر کلروفیل برگ، ب) اصلی کود سوپرفسفات تریپل بر مقدار کلروفیل برگ، ت) متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر مقدار کلروفیل برگ



شکل ۲. مقایسه اثر: الف) اصلی باکتری بر وزن تر اندام هوایی، ب) اصلی کود سوپرفسفات تریپل بر وزن تر اندام هوایی ، ت) متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر وزن تر اندام هوایی

۳)وزن خشک اندام هوایی

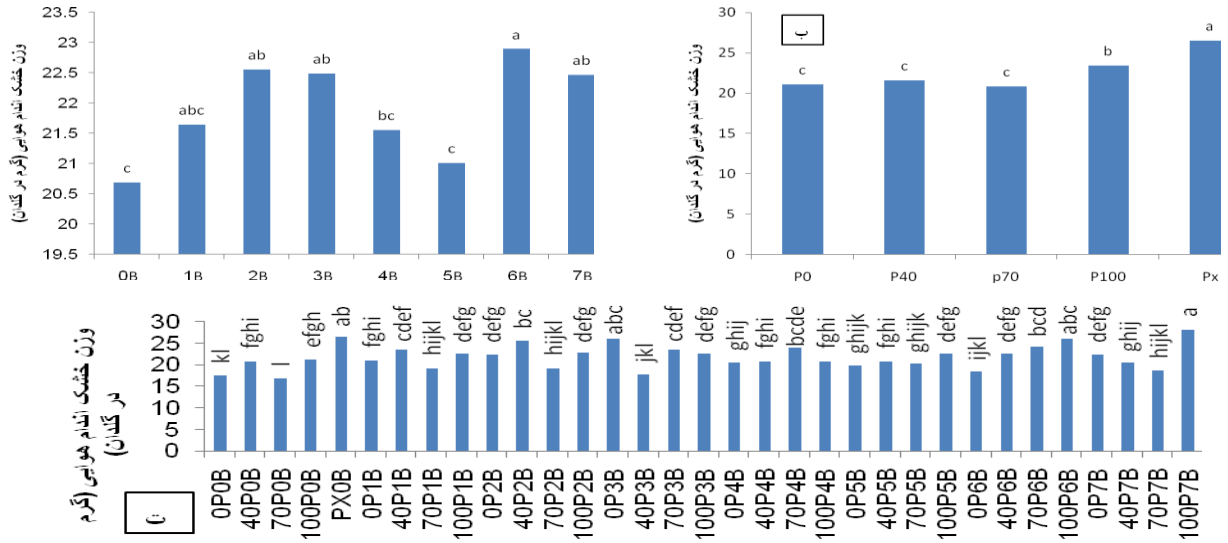
شکل ۳ میانگین اثر اصلی باکتری، کود سوپر فسفات تریپل و اثرات متقابل آن‌ها را بر وزن خشک اندام هوایی نشان می‌دهند. باکتری B6 بیشترین و باکتری شاهد (B0) کمترین تاثیر را بر وزن خشک نشان دادند. PX و P70 به ترتیب بیش-ترین و کمترین تاثیر را نسبت به شاهد بر وزن خشک دارند. و در مورد اثرات متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر وزن خشک اندام هوایی، تیمار B7P100 بیش ترین و تیمار B0P70 کمترین تاثیر را بر وزن خشک نشان دادند.

۴) وزن تر ریشه

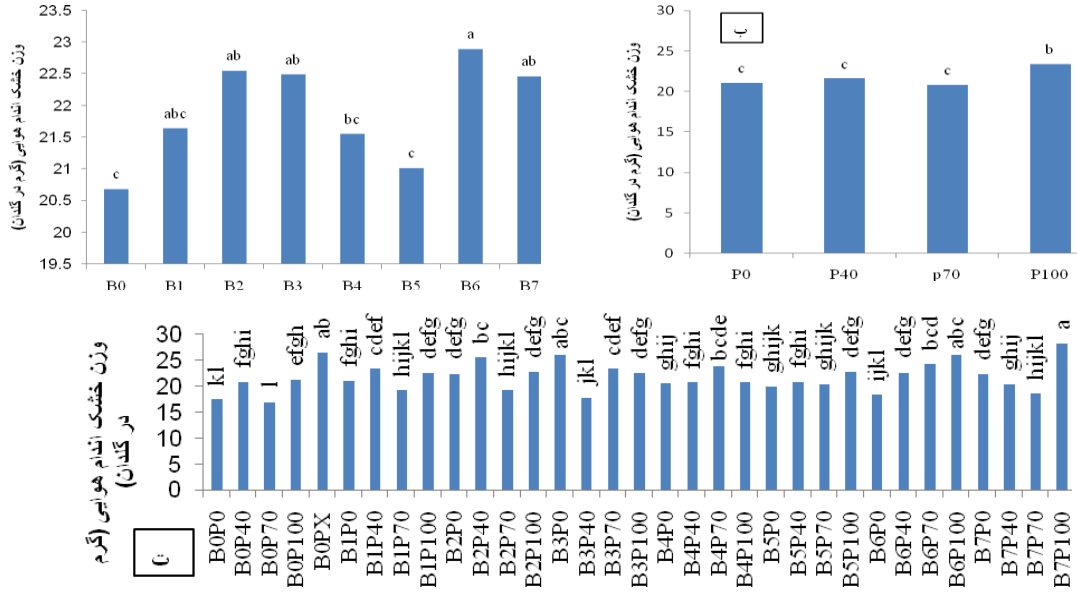
شکل ۴ اثر اصلی باکتری، کود سوپر فسفات تریپل و اثرات متقابل آن‌ها را بر وزن تر ریشه نشان می‌دهند. باکتری B_6 و B_4 به ترتیب نسبت به شاهد بیش‌ترین افزایش و کاهش را داشتند. سطح کود P_X نسبت به شاهد افزایش و سطح کود P_{40} نسبت به شاهد بیش‌ترین کاهش را داشت. در مورد اثرات متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل تیمار B_6P_{100} بیشترین و تیمار B_0P_{70} کمترین تاثیر را بر وزن تر ریشه نشان دادند.

۵) وزن خشک ریشه

با توجه به شکل ۴ باکتری B_7 و باکتری B_5 به ترتیب نسبت به شاهد بیشترین افزایش وکاهش راداشته اند. کود P_X بیشترین و کود P_{70} کمترین تاثیر را بر وزن خشک ریشه نشان دادند. در مورد تاثیر متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل تیمار B_1P_{40} و تیمار B_0P_{70} به ترتیب نسبت به شاهد افزایش و کاهش نشان دادند.



شکل ۳. مقایسه اثر: الف) اصلی باکتری بر وزن خشک اندام هوایی، ب) اصلی کود سوپرفسفات تریپل بر وزن خشک اندام هوایی ، ت) متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر وزن خشک اندام هوایی

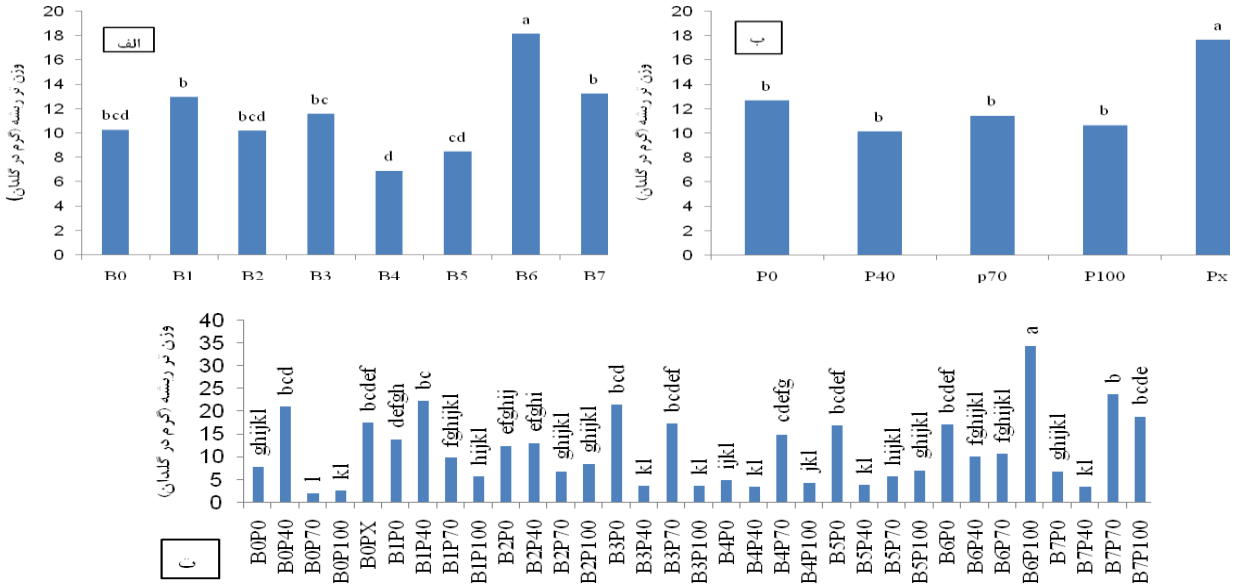


شکل ۴. مقایسه اثر: الف) اصلی باکتری بر وزن تر ریشه، ب) اصلی کود سوپرفسفات تریپل بر وزن تر ریشه، ت) متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر وزن تر ریشه

نتیجه‌گیری

میکروارگانیسم‌ها، مخصوصا کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) به‌عنوان مایه تلقیح جذب فسفر را توسط گیاهان افزایش می‌دهند بنابراین می‌توانند به‌عنوان کودهای زیستی استفاده شوند. با توجه به نتایج گلخانه‌ای در حالت کلی می‌توان گفت که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر روی اکثر صفات تاثیر معنی‌داری داشته و باعث افزایش اجزاء عملکرد و وزن تر و خشک گیاه شده است. بدین ترتیب با کاربرد باکتری‌های

حل‌کننده فسفات علاوه بر بهره‌مندی از سایر اثرات مفید این باکتری‌ها که نتیجه آن افزایش رشد و عملکرد گیاه در مقایسه با کود شیمیایی است، با افزایش قابل توجه کارایی کود فسفره، کاهش مصرف آن تا ۵۰ درصد امکان پذیر می‌باشد. تفسیر نتایج آزمایشات با تیمارهای حاوی باکتری‌های حل-کننده فسفات و کود سوپرفسفات تریپل نیازمند به توجه خاص و دقیق است.



شکل ۴. مقایسه اثر: الف) اصلی باکتری بر وزن تر ریشه، ب) اصلی کود سوپرفسفات تریپل بر وزن تر ریشه، ت) متقابل باکتری و کود سوپر فسفات تریپل بر وزن تر ریشه

منابع

Choudhary, R.R., Yadav, H.L., Choudhary, S.L., Prajapat., A.L. and Choudhary, R. 2017. Effect of integrated nutrient management on growth of wheat (Triticum aestivum) cultivars. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6, 2369-2374.

Kacar B. and Katkat, V.2010. Bitki besleme,4.Baski.Nobel Yaymevi,Ankara, pp. 217-289.

Mehrvarz, S., Chaichi, M.R. and Alikhani, H.A. 2008. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barley (hordeum vulgare l.). american-eurasia j. agric. & environ.sci, 3, 822-828.

Nael, M., Khademi, H., Jalalian, A. and Sotohian, F. 2014. Soil-parent material relationship in forest ecosystems of western Alborz: Clay mineralogy. Journal of Water and Soil Conservation. Gorganunivercity of agricultural sciences and natural resources, 21, 101- 122.

Poehlman, J.M. 1995. Breeding field crops. Henry holt company, inc. new York, 427 p.

Sankaralingam S., Harinathan B., Shankar, T., Prabhu, D. and Peer, M.2014. Effect of Phosphate solublizing bacteria on growth and development of *Sesbania grandiflora* and *Moringa oleifera*. Sci Agric; 3, 88-96.

Shahhosseini, Z., Gholami, A. and Asghari, H. 2012. Effect of arbuscular mycorrhizae and humic acid on water use efficiency and physiological growth indices of maize under water deficit condition. *Arid Biome Scientific and Research Journal*, 2, 39-57. (In Persian).

Steel, R.D., and Tore, J.H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw-Hill, Toronto, 481 pp.

Zarabi, M., Alhadi, I. and Akbari Gh.A. 2011. A study on the effects of different biofertilizer combinations on yield, its components and growth indices of corn (Zea mays L.) under drought stress condition. African journal of agricultural research, 6, 681-685.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The Study of Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria n growth and yield of Corn in Greenhouse Condition

Alireza Fallah Nosratabad[1], Azadeh Sedaghat[2*]

[1] Associate Professor of Soil Biology Research, Soil and Water Research Institute, Research, Education and Agricultural Extension Organization, Karaj, Iran

[2] Ph.D Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Due to high pH of country soils and its calcareous, uptake of nutrients specially phosphorus uptake by plants is difficult. In addition about 80 to 90 percent of phosphorus fertilizers used in soil cause to out of reach of P from plants through production of insoluble compounds in calcareous and acid soils by Ca, Mg, Fe, Al ions, so use of phosphate solubilizing bacteria can be useful. This study, during a factorial design in completely randomized design in greenhouse conditions at the Soil and Water Research Institute (Karaj) was performed. The purpose of this study was to investigate the effect of phosphorus solubilizing bacteria on growth and yield of maize (cultivar 704). Treatments containing 8 (B0, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7) and 4 levels of triple super phosphate fertilizer (0, 40, 70 and 100% critical amount of phosphorous soil) with 3 replications in the pot. The results indicated that the interaction of bacteria and fertilizers in the most traits had a positive effect (at 1% level). In general, the results of this experiment indicate that the use of phosphate solubilizing bacteria has a beneficial role in improving the yield and growth of corn, so that they could be used as a supplement to triple super phosphate fertilizer.

Key word: Phosphate Solubilizing Bacteria, Phosphorus, Triple Super Phosphate Fertilizer, Maize

* Corresponding author, Email: Azadehsedaghat65@gmail.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی جدایه‌های Anabaena و اندازه‌گیری فاکتورهای محرک رشد آن‌ها

صاحب سودایی مشایی[۱*]، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، ندا سلطانی[۳]

[۱] دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، محقق بخش خاک و آب، موسسه تحقیقات برنج کشور در مازندران

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استاد پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

سیانوباکتری‌ها، ساده‌ترین و یکی از بارزترین موجودات فتوسنتزی هستند که در فسیل‌های مربوط به دو میلیارد سال پیش حضور داشته‌اند. این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی جنس *آنابنا* بومی مزارع شالیزری استان گیلان و بررسی پتانسیل‌های محرک رشد آنها اجرا گردید. پس از خالص‌سازی، ۱۰ جدایه انتخاب و توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیاء استیلن به اتیلن، توانایی تولید اکسین، انحلال فسفر معدنی و توانایی تولید سیدروفور با محیط Cas-Agar مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از نظر توانایی تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات، تولید اکسین و سیدروفور تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در جدایه GGuCy-42 (۳۸/۵۶ نانومول اتیلن برساعت) و کمترین میزان آن در جدایهGGuCy-21 (۱۰/۵۲ نانومول اتیلن برساعت) مشاهده شد. بیشترین میزان تولید اکسین برای تیمار ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان در جدایه GGuCy-42 برابر ۱۰/۸۳، ۱۵/۸۱ و ۹/۲۱ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a بود، همچنین بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفر در جدایهGGuCy-42 (۶۴۱ میلی‌گرم فسفر برلیتر) و کمترین میزان آن در جدایه GGuCy-41 (۴۵/۶ میلی‌گرم فسفر برلیتر) و از لحاظ تولید سیدروفور جدایه GGuCy-21 حداکثر (۶/۶۹ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) و در جدایه GGuCy-49 حداقل (۲/۵۶ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ایندول استیک اسید، تثبیت نیتروژن اتمسفری، سیانوباکتری، سیدروفور، PGPR

مقدمه

پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که تولید جهانی محصولات اصلی بایستی تا حدود ۷۰۰ میلیون تن افزایش یابند. سرعت چنین تغییرات جمعیتی با توجه به پیامدهای این تقاضا، اجازه حفظ و نگهداری قابلیت تولید خاک را نمی‌دهد (Denison و همکاران، ۲۰۱۱). به منظور بهبود عملکرد محصولات کشاورزی کودهای شیمیایی در سالهای گذشته بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. اگرچه استفاده از کودهای شیمیایی عملکرد محصول را افزایش می‌دهد، بطور همزمان کیفیت خاک را تخریب کرده، ساختار طبیعی جامعه میکروبی خاک و چرخه طبیعی عناصر غذایی را بهم ریخته و مفهوم تولید پایدار را مختل کرده است. این مسائل ایجاب می‌نماید تا شیوه‌های جدیدی جهت افزایش تولید با توجه به توانایی بیوسفر ارائه شوند تا منابع تجدیدپذیر احیا و از طبیعت بطور بهینه استفاده گردد (Sharma و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات مختلف محققین نشان می‌دهد که میکروب‌ها از جمله سیانوباکتری‌ها نقش ارزشمندی در تغذیه گیاه به‌واسطه تثبیت نیتروژن، حل‌کنندگی فسفات و سولفات، تولید هورمون‌های محرک رشد، افزایش

مقاومت به تنش‌ها، تولید ویتامین‌ها و مواد بیوکنترل بیماری‌زای گیاهی ایفا می‌کنند (Prakash و همکاران، ۲۰۱۵). سیانوباکتری‌ها با نام‌های جلبک-های سبز-آبی، سیانوفایتا و میکسوفایت شناخته می‌شوند. آنها فاقد کلروپلاست سازمان‌یافته بوده دارای دانه‌های کروماتوفور می‌باشند. طبقه‌بندی تاکسونومیک سیانوباکتری‌ها بسیار پیچیده است. سیانوباکتری‌ها در گذشته تنها بر اساس صفات ریخت شناسی طبقه بندی می‌شدند (Casamatta و همکاران، ۲۰۰۵)، از سوی دیگر سیانوباکتری‌ها براساس کدهای بین‌المللی نام‌گذاری پروکاریوتی نیز طبقه‌بندی شده‌اند. امروزه این طبقه‌بندی بر اساس روشهای مولکولی و ویژگی‌های فنوتیپی، شموتیپی و ژنوتیپی یک کشت خالص از سیانوباکتری‌هاست که به اصطلاح روش پلی‌فازیک نامیده می‌شود (Mishra و همکاران، ۲۰۱۳). سیانوباکتری‌ها می‌توانند نیتروژن هوا را تثبیت کنند و فراوانی آنها در برنجزارها اهمیت بسیاری دارد (Prassana و همکاران ۲۰۱۲).

* ایمیل نویسنده مسئول: ssoodaie78@gmail.com

اثبات شده که نزدیک ۴۰ درصد نیتروژن تثبیت شده سیانوباکتری‌ها توسط گیاه برنج مصرف می‌شود (Vaishampayan و همکاران ۱۹۹۸). نقش سیانوباکتری‌ها در حفظ نیتروژن خاک از طریق تثبیت نیتروژن (Hendrayanti و همکاران، ۲۰۱۸) و افزایش فعالیت فسفاتازی که فسفر نامحلول را به فرم محلول متحرک کرده (Mishra و همکاران، ۲۰۰۵)، بخوبی اثبات شده است.

یکی از راه های تأثیر باکتری ها بر رشد و نمو گیاهان سنتز فیتوهورمون ایندولی (IAA) است. این هورمون باعث توسعهٔ سیستم جذب توسط ریشهٔ گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی به وسیلهٔ گیاه می شود (Sergeeva و همکاران، ۲۰۰۲). سیانوباکترها نیز کلات‌کننده‌های ویژه آهن با وزن مولکولی کم ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ دالتون را تحت شرایط محدودیت آهن تولید میکنند. اسچیزوکینن یک سیدروفور مشتق شده از سیترات است که نخستین بار از سیانوباکتری Anabaena PCC 7120 گزارش شده است (Rastogi وSinha، ۲۰۰۹). متابولیسم نیتروژن و تولید سیدروفور بطور متقابل فرآیندهای منحصربفردی در سیانوباکتری‌ها هستند. در واقع رشد Anabaena variabilis در غیاب منبع نیتروژن نسبت به رشد در محیط حاوی نیترات سبب تولید میزان بیشتری از سیدروفور می‌شود (Sahu و همکاران، ۲۰۱۲). با نگاه به نقش بسیار مهم سیانوباکتری‌ها در تثبیت و فراهم آوردن نیتروژن مولکولی و سایر خصوصیات محرک رشد گیاه، در این پژوهش تلاش شد تا ضمن جداسازی و شناسایی جدایه‌های سیانوباکتری بومی شالیزارهای استان گیلان، خصوصیات تحریک کنندگی رشد گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

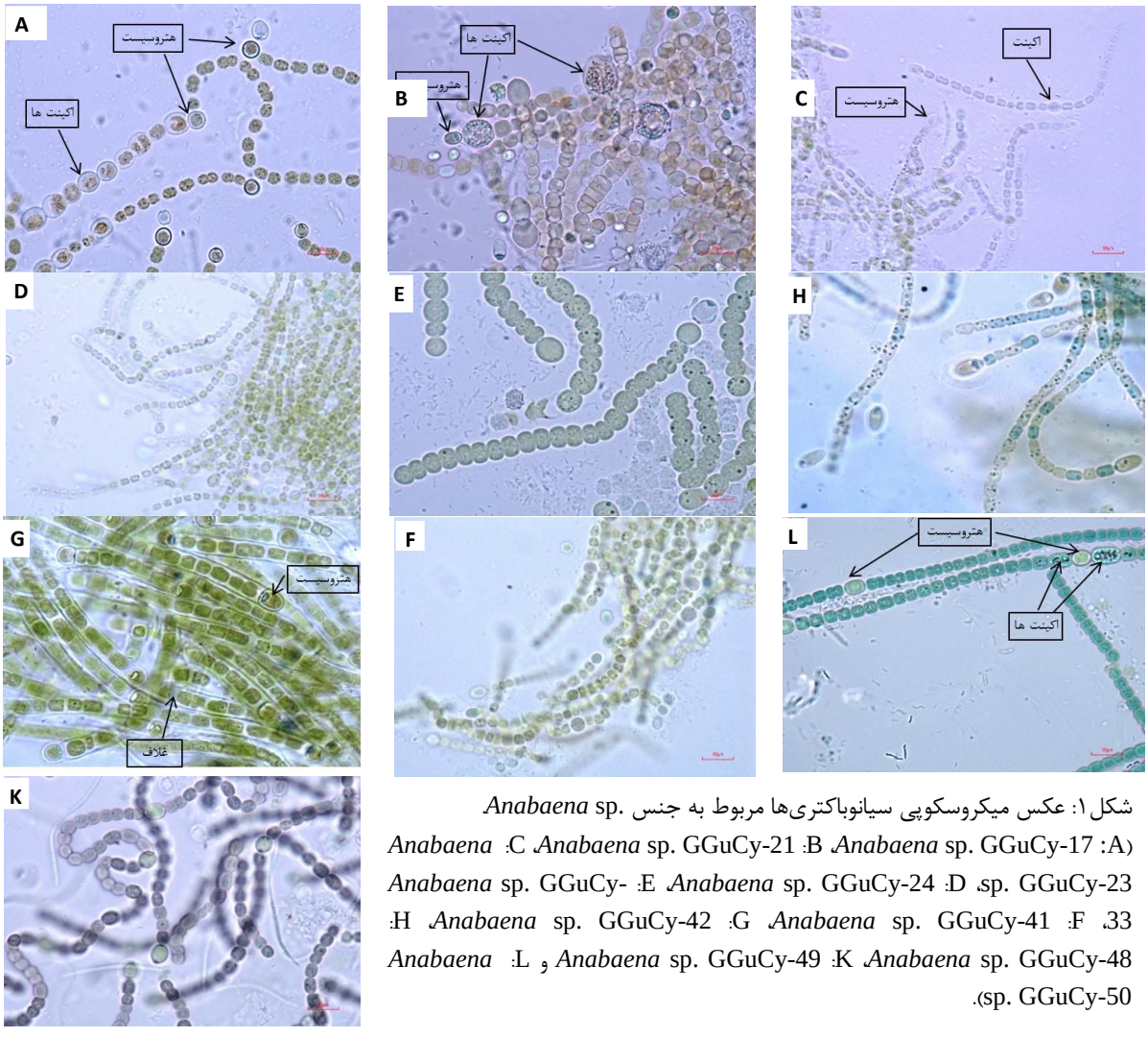
در پژوهش حاضر جداسازی سیانوباکتری‌ها از نمونه‌های خاک بر اساس روش کوشیک (۱۹۸۷) با محیط کشت BG11 (با نیتروژن) و BG110 (بدون نیتروژن) انجام گرفت. بعد از ظهور کلنی‌های سیانوباکتری بر روی سطح خاک حاوی محیط کشت، با انجام واکشت‌های مکرر در محیط کشت جامد نمونه‌های سیانوباکتری خالص شدند. برای شناسایی جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با تهیه لام نیمه دائمی از کلنی‌ها و با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها، مشخصات میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک نمونه‌های مورد نظر شناسایی و تعیین شدند (Desikhachary، ۱۹۵۹; John و همکاران، ۲۰۰۳). توان تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیا استیلن به اتیلن (ARA) با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) اندازه‌گیری شد (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۶). فعالیت حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های سیانوباکتری‌ها، ابتدا محیط کشت مایع سیانوباکتریایی (BG11 و BG110) فاقد فسفر تهیه شده و بعد از کشت سیانوباکتری‌ها، به مدت دو هفته در اتاقک رشد نگهداری شد. سپس محیط کشت مایع (BG11 و BG110) جدید حاوی تری‌کلسیم فسفات (۰/۳ درصد) تهیه شده (Yandigeri و همکاران، ۲۰۱۱) و در هر ارلن مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شده و با ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتری تلقیح گردید. سوسپانسیون سیانوباکتری با تراکم جمعیتی OD750=0.5 بکار رفت. در آنها تلقیح شدند. پس از ۱۵ و ۳۰ روز نگهداری این محیط‌های کشت در اتاقک رشد، سوسپانسیون سیانوباکتری در دور ۶۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار فسفر معدنی محلول در مایع روشناور به روش اسید اسکوربیک (علی‌اصغرزاد، ۱۳۸۹) اندازه-گیری شدند. برای اندازه‌گیری کمی تولید IAA، محیط‌های کشت مایع سیانوباکتری‌ها (BG11 و BG110) آماده و به آنها اسیدآمینه ال‌تریپتوفان سترون شده با فیلتر (با غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید، سپس مقدار مشخصی از سیانوباکتری‌ها (OD750=0.5) به ارلن‌های حاوی محیط کشت افزوده شده و در شرایط کشت قرار داده شدند. پس از ۱۵ روز از زمان کشت، مقداری از محیط کشت را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و یک میلی‌لیتر از محیط کشت سانتریفوژ شده با دو میلی‌لیتر از محلول سالکووفسکی (شامل ۱ میلی-لیتر از FeCl3 نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر از پرکلریک اسید (HClO4) ۳۵ درصد مخلوط شدند. این ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. و در نهایت با ایجاد رنگ صورتی تا قرمز و قرائت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج ۵۳۰ نانومتر) و رسم منحنی استاندارد، غلظت IAA در نمونه‌های سیانوباکتری بصورت کمی و بر حسب میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a [µg IAA/(µg.Chla)] برآورد شده است. میزان کلروفیل a معیاری از مقدار زیست‌توده سیانوباکتری در سوسپاسیون است (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۰). اندازه‌گیری تولید سیدروفور با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گردید. به این منظور، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از محلول CAS را با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کرده و ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول رقیق شده را به لوله‌های آزمایش اسیدواش اضافه کرده و به آن ۲ میلی‌لیتر مایع شفاف رویی محیط کشت سیانوباکتری اضافه گردید. سپس بعد از گذشت یک ساعت در جذب ۶۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استانداردسازی با DTPA حاوی ۰ ، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰

[1]Acetylene Reduction Assay

میکرومول DTPA بر لیتر به نسبت یک به پنج با محلول CAS مخلوط شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب قرائت گردید (Aliasgharzad و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج و بحث

به منظور شناسایی جدایه‌ها، مهمترین صفات رویشی و زایشی که در شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت، شکل و رنگ کلنی؛ شکل و رنگ و اندازه تالس؛ طول و عرض تریکم‌ها؛ شکل و اندازه و رنگ سلول‌های رویشی، هتروسیست و اکینت‌ها؛ بافت و تزئینات دیواره‌های سلول اکینت؛ موقعیت اکینت نسبت به هتروسیست؛ شکل سلول‌های رأسی، وجود یا عدم وجود غلاف موسیلاژی بودند. اعضای جنس Anabaena، سیانوباکتری‌های رشته‌ای هستند. اغلب بصورت دسته‌ای بوده برخی در توده‌های ژلاتینی بی‌شکل واقع‌اند. تعداد کمی از گونه‌ها نیز بصورت منفرد و پلانکتونیک (بصورت شناور) هستند، اغلب ایجاد لایه ژلاتینی توسعه یافته‌ای بر سطح بستره مرطوب می‌نمایند. تریکم‌ها تک ردیفه و در غالب موارد دانه تسبیحی بوده، مستقیم، خمیده یا بصورت مارپیچ هستند که ممکن است بصورت غلافدار یا فاقد غلاف مشاهده گردند. سلول‌ها اندکی متورم و در تعدادی از گونه‌ها استوانه‌ای شکل‌اند. اکینت‌ها پاراهتروسیتیک بوده، مدور، تخم مرغی یا استوانه‌ای و در پاره‌ای از موارد به شکل بیضی کشیده‌اند و در مجاورت هتروسیست یا بصورت فاصله‌دار واقع شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱: عکس میکروسکوپی سیانوباکتری‌ها مربوط به جنس *Anabaena* sp. (A: *Anabaena* sp. GGuCy-17، B: *Anabaena* sp. GGuCy-21، C: *Anabaena* sp. GGuCy-23، D: *Anabaena* sp. GGuCy-24، E: *Anabaena* sp. GGuCy-33، F: *Anabaena* sp. GGuCy-41، G: *Anabaena* sp. GGuCy-42، H: *Anabaena* sp. GGuCy-48، K: *Anabaena* sp. GGuCy-49 و L: *Anabaena* sp. GGuCy-50).

چهار خصوصیات محرک رشدی شامل فعالیت نیتروژنازی، حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین و سیدروفور در این تحقیق درنظر گرفته شده است. در بین ۱۰ جدایه آنابنا مورد بررسی ۴۰ درصد جدایه‌ها توان تثبیت نیتروژن مولکولی بهتری از خود نشان دادند. بیش‌ترین مقدار فعالیت نیتروژنازی یا احیاء استیلن به اتیلن در جدایه GGuCy-42 و به میزان ۳۸/۵۶ نانومول اتیلن بر ساعت و کمترین آن در جدایه GGuCy-21 و به میزان ۱۰/۵۲ نانومول اتیلن بر ساعت مشاهده شد. Rana و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که جنس Anabaena و Calothrix روی کیفیت تغذیه‌ای دانه گندم از لحاظ محتوی پروتئین و عناصر ریزمغذی مهم (آهن، روی و منگنز) تاثیر گذاشته که نشان دهنده جریان مثبت تثبیت نیتروژن از مایه تلقیحی سیانوباکتری به گندم جهت بهبود تولید بوده است. محققان نشان دادند که سیانوباکتری‌های آزادزی می‌توانند حدود ۲۰-۳۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سال به خاک اضافه نمایند (Issa و همکاران، ۲۰۱۴). بالاترین میزان تثبیت نیتروژن مولکولی جدایه‌های ازتوباکتر توسط رجایی و همکاران (۲۰۰۷) و دولتی و همکاران (۱۳۹۱) به ترتیب ۸/۳ و ۴۲۸/۲ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند.

جدول ۱: مقادیر فعالیت نیتروژنازی، حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین و سیدروفور در جدایه‌های Anabaena ssp

جدایه سیانوباکتری	انحلال فسفر (mgP/l)		سیدروفور	اکسین* (µg/µg Chla)			فعالیت نیتروژنازی
	۱۵ روز	۳۰ روز	(µmol/ml.day)	0 (µg/mL) Trp	100 (µg/mL) Trp	500 (µg/mL) Trp	(nmol C_2H_4/h)
Anabaena sp. GGuCy-17	۶۴۱/۰a	۲۸۱/۳a	۳/۹۵cde	+	++	+	۲۲/۶۳b
Anabaena sp. GGuCy-21	۶۰/۴gh	۱۰/۹hl	۶/۶۹a	+	+	+	۱۰/۵۲e
Anabaena sp. GGuCy-23	۱۰۲/۲b	۲۳/۴gh	۳/۴۴de	+	-	-	۲۲/۹۲b
Anabaena sp. GGuCy-24	۸۲/۸d	۱۷/۲gh	۴/۳۱bcd	-	+	+	۱۱/۷۷de
Anabaena sp. GGuCy-33	۹۸/۴bc	۹۹/۵bc	۳/۰۷def	-	+	+	۲۱/۱۱b
Anabaena sp. GGuCy-41	۴۵/۶h	۲۰/۰gh	۴/۹۴bc	+	+	+	۱۴/۶۳cd
Anabaena sp. GGuCy-42	۷۹/۶de	۱۶/۲gh	۳/۳۸de	+	++	+	۳۸/۵۶a
Anabaena sp. GGuCy-48	۹۵/۳cd	۲۷/۹gh	۵/۷۵ab	-	-	+	۱۴/۴۰cd
Anabaena sp. GGuCy-49	۷۹/۴de	۱۷/۳gh	۲/۵۶fg	+	+	+	۱۰/۶۲e
Anabaena sp. GGuCy-50	۹۶/۷cd	۲۲/۱gh	۳/۴۴de	+	+	+	۱۲/۵۷de

*علائم: +++ (گروه ۱: توان بالا با تولید بیش از ۲۰ µg/µg Chla)، ++ (گروه ۲: توان متوسط با تولید ۱۰-۲۰ µg/µg Chla)، + (گروه ۳: توان ضعیف با تولید کمتر از ۱۰ µg/µg Chla) و ـ (گروه ۴: بدون تولید IAA).

مقایسه میانگین انحلال فسفر در محلول روشناور بعد از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز بعد تلقیح در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۱). غلظت فسفر محلول در ۱۵ روز بعد از تلقیح جدایه‌های مورد آزمایش، بین ۴۵/۶ تا ۶۴۱ میلی‌گرم فسفر بر لیتر متغیر بود. جدایه Anabaena sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه جدایه‌ها از لحاظ مقدار حل‌کنندگی فسفات (۶۴۱ میلی‌گرم فسفر بر لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. تولید اسید فتالیک، عامل عمده برای انحلال فسفات بوسیله سیانوباکتری‌ها توسط یاندجری و همکاران (۲۰۱۱) معرفی شده است.

سنجش کمی تولید IAA توسط سیانوباکتری‌ها در مقادیر مختلف اسیدآمینه ال-تریپتوفان و در ۱۵ روز بعد از تلقیح، برای جدایه‌های مختلف آنابنا در جدول ۱ نشان داده شد. جدایه‌های مختلف سیانوباکتری از نظر توان تولید IAA به چهار گروه شامل (گروه ۱ با توان تولید بالا (۲۰ ≤ میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a)، گروه ۲ با توان تولید متوسط (۲۰-۱۰ میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a)، گروه ۳ با توان تولید پایین (۱۰ > میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a) و گروه ۴ با عدم توانایی تولید IAA) تقسیم‌بندی شده‌اند (Torres-Rubio و همکاران، ۲۰۰۰). در تیمار بدون تریپتوفان ۷۰ درصد از جدایه‌ها در گروه ۳ (توان تولید پایین) قرار گرفتند و بقیه جدایه‌ها در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان ۲۰ درصد جدایه‌ها در گروه ۲ (توان تولید متوسط)، ۶۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۲۰ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) قرار گرفتند. در تیمار ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان ۹۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۱۰ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. آزمون کمی توان تولید IAA برای تیمار بدون ال-تریپتوفان در جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 برابر ۱۰/۸۳ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a، در تیمار ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 برابر ۱۵/۸۱ و ۹/۲۱ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a، بیشترین مقادیر اکسین (IAA) را نشان دادند. گزارشات متعددی تولید فیتوهورمون IAA توسط سویه‌های سیانوباکتریایی آزادزی و همزیست را نشان داده‌اند (Prassana و همکاران، ۲۰۰۹). Mazhar و Hasnain (۲۰۱۱) در غلظت‌های

مختلف ال-تریپتوفان مقدار تولید IAA را برای دو سویه سیانوباکتری بدست آوردند و نشان دادند که تا غلظت حدود ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقدار تولید IAA افزایش یافته و بعد از آن تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقدار تولید کاهش یافته است. بنابراین افزودن مقدار مناسب ال-تریپتوفان به محیط تا حدی می‌تواند باعث تولید اکسین گردد و افزودن بیش از حد تأثیری در تولید اکسین ندارد و سرعت تشکیل اکسین را پایین می‌آورد و می‌تواند موجب تحریک و تولید اتیلن تنشی شود.

همه جدایه‌های Anabaena قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول۱). تولید سیدروفور در جدایه‌های GGuCy-21 و GGuCy-48 بیشترین مقدار به ترتیب ۶/۶۹ و ۵/۶۹ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز حاصل گردید (جدول ۱). ۴۰ درصد از جدایه‌ها تولید سیدروفور بیش از حد متوسط (۴/۱۵ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) داشتند. بررسی Trick و Kerry (۱۹۹۲) نشان داد که دو جدایه Synechococcus sp. PCC 7492 و Aanbaena variabilis به‌ترتیب سیدروفوری با وزن مولکولی ۳۱۰ و ۵۲۰ دالتون از نوع کاتکول تولید می‌کنند. در سال‌های اخیر، نمونه‌هایی از جذب آهن بواسطه سیدروفور در میان سیانوباکتری‌ها دوباره مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، در واقع مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان داد که همه سیانوباکتری‌ها دارای یک سیستم جذب مبتنی بر سیدروفور نیستند و مسیرهای جایگزین برای جذب آهن در آنها وجود دارد (Lis و همکاران، ۲۰۱۵). اهمیت احیای آهن بواسطه سوپراکسید به عنوان روش جایگزین در سیانوباکتری Lyngbya majuscule به اثبات رسیده است. همچنین هزینه متابولیکی بیوسنتز و انتقال سیدروفور زیاد است (Lis و همکاران، ۲۰۱۴).

نتیجه‌گیری

سیانوباکتری‌ها نقش مهمی در محیط زیست بعنوان فراهم‌کننده عناصر غذایی در کشاورزی ایفا می‌کنند. مطالعات تنوع و فراوانی نشان دادند که سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار Nostoc و Anabaena با گستره حدود ۴۰ تا ۹۰ درصد در خاک‌های شالیزاری غالب هستند. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که سیانوباکتری‌های جنس آنابنا قطعاً بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند. آنها به رشد و نمو گیاهان با انتقال مستقیم یا غیرمستقیم نیتروژن تثبیت شده یا از طریق بهبود کیفیت خاک و وضعیت عناصر غذایی و انحلال فسفات‌ها و همچنین تولید هورمون‌ها و مواد محرک رشد کمک می‌کنند. در آزمایش حاضر جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 دارای قدرت تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات معدنی بالایی بوده که می‌توان کاربرد عملی آنها به‌عنوان منبع کود زیستی برای برنج را پیشنهاد داد. بیشترین مقدار اکسین در غلظت صفر تریپتوفان توسط جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 تولید شد (جدول ۱)، بنابراین مسیرهای مستقل از تریپتوفان در آنها وجود دارند یا تغییر مسیر بیوسنتز اکسین می‌تواند علت آن باشد. برای کاربردی شدن این جدایه‌های برتر در جهت توسعه زاد مایه آنها در منطقه نیاز است این جدایه‌ها بتوانند به خوبی در آشیان اکولوژیک خود مستقر شوند و حداکثر مزایا را برای محصول فراهم کنند. بدیهی است برای نیل به این هدف، نیاز به انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای با این جدایه‌ها می‌باشد.

منابع

Aliasgharzad N, Shirmohamadi E and Oustan S. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil and Environment. 28(2): 119-123.

Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). Journal of Phycology 2005; 41: 421- 38.

Denison RF and Kiers ET. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and review Mycorrhizal fungi, Current Biology, 21: 775–785.

Hendrayanti, D., Khoiriyah, I., Fadilah, N. and Salamah, A. 2018. Diversity of N2-fixing cyanobacteria in organic rice field during the cycle of rice crops. Inventing Prosperous Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management. https://doi.org/10.1063/1.5050107.

Issa, A.A., Abd-Alla, M.H., Ohyama, T., 2014. Nitrogen fixing cyanobacteria: future prospect. In: Ohyama, T. (Ed.), Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation. In Tech, p. 282.

Lis H, Kranzler C, Keren N and Shaked Y. 2015. A Comparative Study of Iron Uptake Rates and Mechanisms amongst Marine and Fresh Water Cyanobacteria: Prevalence of Reductive Iron Uptake. Life, 5:841-860.

Mazhar S and Hasnain S. 2011. Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on Triticum aestivum var. Uqab 2000 growth. African Journal of Agricultural Research, 6(17): 3988-3993.

Mishra A.K., Shukla E., Singh S.S. Phlogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. Protoplasma 2013; 250 (1):77- 94.

Mishra Y, Bhargava P, Chaurasia N and Rai LC. 2013. Proteomic evaluation of the non-survival of *Anabaena doliolum* (Cyanophyta) at elevated temperatures. European Journal of Phycology, 44(4): 551–565.

Prakash O, Sharma R, Rahi P and Karthikeyan N. 2015. Role of Microorganisms in Plant Nutrition and Health. In: Rakshit A., Singh HB. and Sen A. (eds.), Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances, 125-140.

Prasanna R, Jaiswal P, Shrikrishna J, Joshi M, Nain L, Rana A and Shivay YS. 2012. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat. Journal of Agricultural Technology. 8(1): 157-171.

Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S., Nain, L., 2012. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. Eur. J. Soil Biol. 50, 118–126.

Rastogi R.P. and Sinha R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Biotechnology Advances, 27: 521-539.

Sahu D., Priyadarshani I. and Rath B. 2012. Cyanobacteria- as potential biofertilizers. CIBTech Journal of Microbiology. 1(2-3): pp.20-26.

Sharma NK, Tiwari SP, Tripathi K and Rai AK. 2011. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. Journal of Applied Phycology, 23:1059–1081.

Soltani N, Khavari-Nejad R, Tabatabaie M, Shokravi SH and Valiente EF. 2006. Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium Fischerella ambigua strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22 (6): 571-576.

Torres-Rubio MG, Astrid S, Castillo J and Martiners P. 2000. Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. And Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and Siderophores, from colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 42: 171-176.

Trick CG and Kerry A. 1992. Isolation and Purification of Siderophores Produced by Cyanobacteria, Synechococcus sp. PCC 7942 and Anabaena variabilis ATCC 29413. Current Microbiology, 24: 241-245.

Vaishampayan A, Sinha RP and Häder DP. 1998. Use of genetically improved nitrogen-fixing Cyanobacteria in rice paddy fields: Prospects as a source material for engineering herbicide sensitivity and resistance in plants. Botanica Acta, 111: 176–190.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and identification of *Anabaena* spp and evaluation of their plant growth promoting properties

Saheb Soodaee Mashaee[1*], Naser Aliasgharzad[2], Neda Soltani[3]

[1] Ph.D. of soil biology and biotechnology, Researcher of Rice Research Institute in Mazandaran, Iran

[2] Professor of soil biology, department of soil science, University of Tabriz, Iran

[3] Professor, Department of Biology, Research Institute of Applied Science, University of Shahid Beheshti, Iran

Abstract

Cyanobacteria are the simplest and one of the most visible photosynthetic organisms that have been present in fossils about two billion years ago. This research aimed the isolation of local Anabaena under cultivation of paddy field in Gilan province and their potential growth promoting-ability. After isolation, 10 isolates selected and their ability to molecular nitrogen fixation were tested with Acetylene to Ethylene reduction method. Their ability in auxin production and solubilizing the mineral P were tested with colorimetric method and siderophore production potential was tested with Cas-agar medium. The results showed that among of isolates being significant difference in terms of nitrogen fixation ability, phosphate solubilizing, oxin and siderophore production. The maximum nitrogen fixation was in GGuCy-42 (38.56 nmol. Ethylene. h^{-1}) and minimum in GGuCy-21 (10.56 nmol. Ethylene. h^{-1}). Auxin production was highest for 0, 100 and 500 (mgL-Trp ml^{-1}) in GGuCy-42 isolate equal to 10.83, 15.81 and 9.21 µg/µg Chla. Also maximum phosphate solubilizing was in GGuCy-42 isolate (641 mgP/l) and minimum in GGuCy-41 isolates (45.6 mgP/l), in terms of siderophore production was observed in GGuCy-21 (6.69 µmol/ml.day) and minimum in GGuCy-49 (2.56 µmol/ml.day).

Keywords: IAA, Atmospheric Nitrogen fixation, Cyanobacteria, Siderophore, PGPR

[1]Corresponding author: ssoodaie78@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی توان حل‌کنندگی ترکیبات نامحلول فسفر و روی توسط ۱۴ جدایه قارچ *تریکودرما*

عاطفه حسین زینلی[۱]، پیمان عباس‌زاده دهجی[*۲]، حسین علایی[۳]

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

چکیده

تثبیت فسفر و روی بر سطح کانی‌های خاک و رسوب آن‌ها به‌صورت ترکیبات نامحلول یکی از محدودیت‌های تولید محصول می‌باشد. یکی از روش‌هایی که باعث حل‌کنندگی روی و فسفات‌های نامحلول می‌شود، استفاده از قارچ‌های محرک رشد گیاه، مانند قارچ‌های *تریکودرما* می‌باشد. بدین منظور، در این پژوهش تعداد ۱۴جدایه قارچ *تریکودرما* از بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه گردید و آزمایش توان حل‌کنندگی روی و فسفات بر روی آنها مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت بررسی توان حل‌کنندگی فسفر جدایه‌های مختلف از محیط کشت حاوی تری‌کلسیم فسفات (TCP) و جهت آزمایش حل‌کنندگی روی از محیط کشت حاوی ZnO و $ZnCO_3$ استفاده گردید. نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها توان حل‌کنندگی فسفر در محیط تری‌کلسیم فسفات را داشتند، به‌طوری‌که توانایی حل‌کنندگی فسفر تمامی جدایه‌های *تریکودرما* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بیشترین میزان حل‌کنندگی مربوط به جدایه‌های T1 و T3 به‌ترتیب با مقدار۷۵۲ و ۷۸۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. هم‌چنین نتایج حاصل از حل‌کنندگی ZnO و $ZnCO_3$ نشان داد که تمامی جدایه‌ها به‌جز T6 و T12 توانایی حل‌کنندگی را داشتند که توانایی حل‌کنندگی تمامی جدایه‌های *تریکودرما* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بیشترین میزان حل‌کنندگی ZnO جدایه‌های T1 و T3 و T4 با مقدار ۳۸/۰، ۳۷/۸، ۴۱/۳ میلی‌گرم برلیتر بود و جدایه‌های T6 و T12 توانایی انحلال ZnO را نداشتند. هم‌چنین در مورد حل‌کنندگی $ZnCO_3$ بیشترین میزان حل‌کنندگی، جدایه‌های T1 و T3 با مقدار ۵۱/۱ و ۴۷/۰ میلی‌گرم برلیتر بود و جدایه‌های T6 و T12 توانایی انحلال $ZnCO_3$ را نداشتند. هم‌چنین با آزمایشی که بر روی pH و میزان انحلال فسفر انجام شد، نشان داد که با کاهش pH انحلال فسفر افزایش یافت که بیشترین حل‌کنندگی فسفر با میزان ۷۵۲ و ۷۸۶ میلی‌گرم در لیتر در pH ۳/۲۱ و ۳/۱۳ مشاهده شد. با توجه به توانایی جدایه‌های *تریکودرما* در انحلال ترکیبات روی و فسفر، می‌توان از جدایه‌های برتر در آزمون گلخانه‌ای و مزرعه‌ای استفاده کرد و در صورت مشاهده پاسخ مثبت آنها را به عنوان کود زیستی مناسب معرفی کرد.

کلمات کلیدی: تری‌کلسیم فسفات، روی، فراهمی عناصر، قارچ‌های محرک رشد گیاه

مقدمه

فسفر، یکی از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان زراعی است که به‌دلیل تثبیت توسط یون‌های مغذی نظیر آهن، کلسیم و منزیم، قابلیت جذب آن توسط گیاه به‌شدت کاهش می‌یابد. یکی از راه‌های تأمین فسفر مورد نیاز گیاه استفاده از کودهای زیستی در اکوسیستم زراعی است (Susana و همکاران، ۲۰۰۶). روی یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاهان است که نقش‌های زیادی در گیاهان از جمله شرکت در ساختمان آنزیم‌های گیاهی، سوخت و ساز قندها و ساخت تریپتوفان و ایندول استیک اسید ایفا می‌کند (Jiang و همکاران، ۲۰۱۸). یکی از روش‌های افزایش عملکرد درختان و گیاهان زراعی، استفاده از کودهای شیمیایی است که استفاده‌ی مداوم از آن‌ها باعث افزایش اسیدی شدن خاک، کاهش خواص فیزیکی و میزان مواد آلی خاک می‌شود (Nottidg و همکاران، ۲۰۰۵). به‌همین دلیل استفاده از روش‌های زیستی، همچون گروهی از میکروارگانیسم‌ها مانند ریزوباکتری‌های بهبوددهنده‌ی رشد گیاه (PGPR[1]) و قارچ‌های بهبوددهنده‌ی رشد گیاه (PGPF[2]) که رابطه‌ی همیاری با گیاهان دارند، می‌تواند راه‌کار مناسبی جهت بهبود تغذیه و رشد گیاه در شرایط عادی و تنش باشند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با سرکوب عوامل بیمارگر گیاهی، تولید محرک‌های رشد گیاه، کاهش تنش‌های زیستی و غیرزیستی و یا با القای مقاومت سیستمیک (ISR[3]) اثرات مفیدی بر گیاهان داشته باشند (Shoresh

* ایمیل نویسنده مسئول: P.abbaszadeh@vru.ac.ir

[1]Plant Growth Promoting Rhizobacteria
[2]Plant Growth Promoting Fungi
[3]Induced Systemic Resistance

و همکاران، ۲۰۱۰). کودهای زیستی علاوه‌بر تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، باعث کاهش بیماری‌ها و بهبود ساختمان خاک و در نتیجه تحریک رشد بیشتر گیاه و افزایش کمی وکیفی محصول می‌شوند (Balemy و همکاران، ۲۰۰۷).

یکی از روش‌های زیستی جایگزین کودهای شیمیایی، گونه‌های تریکودرما[1] هستند که باعث افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می‌شوند (Harman، ۲۰۱۱). گونه‌های قارچ تریکودرما به‌عنوان قارچ‌های افزاینده‌ی رشد گیاهی PGPF جزء متداول‌ترین گونه‌های قارچی اصلاح کننده‌ی خاک محسوب می‌شوند (Vinale و همکاران، ۲۰۰۸). گونه‌های جنس تریکودرما از مهم‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست هستند که به‌عنوان قارچ ساپروفیت در اغلب خاک‌ها وجود دارند. هم‌چنین اغلب سویه‌های تریکودرما، محیط اطراف خود را با ترشح اسیدهای آلی همچون اسید گلوکونیک، اسیدسیتریک و اسیدفوماریک اسیدی می‌کنند و در نتیجه قادر به انحلال ترکیبات نامحلول و افزایش فراهمی فسفر، آهن، منگنز و منیزیم خواهند بود (Harman و همکاران، ۲۰۰۴). گونه‌های قارچ‌های تریکودرما به‌عنوان قارچ محرک رشد گیاه (PGPF) توان تولید سیدروفور، آنزیم حل‌کنندگی فسفات و فیتوهورمون‌ها را دارند (Doni و همکاران، ۲۰۱۴).

توان اسپورزایی بالا، تحمل بالا نسبت به عناصر سنگین خاک، شوری و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه و رقابت تغذیه‌ای بالا نسبت به‌عوامل بیماری‌زا در محیط ریزوسفر، از مهم‌ترین خصوصیات گونه‌های مختلف جنس تریکودرما محسوب می‌شوند (Harman و همکاران، ۲۰۰۴). گونه‌های مختلف تریکودرما با استفاده از راه‌کارهایی مانند افزایش جذب عناصرغذایی به‌دلیل افزایش حلالیت عناصر و تغییر در pH فرایشه و ترشح هورمون‌های رشد، سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند (Contreras-cornejo و همکاران، ۲۰۱۳). گونه‌ی T.harzianum قادر به افزایش حلالیت منگنز، روی و فسفات‌های سنگی (خصوصا فسفات کلسیم) بوده که در نتیجه منجر به افزایش جذب فسفر و چندین ریزمغذی به وسیله گیاهان می‌شود (Altomare و همکاران، ۱۹۹۹). هدف این تحقیق، بررسی حل‌کنندگی روی و فسفات‌های نامحلول توسط ۱۴ جدایه تریکودرما و انتخاب جدایه‌های برتر برای آزمون گلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گونه‌های مختلف قارچ‌های تریکودرما از کلکسیون میکروبی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) انتخاب شدند. در این پژوهش صفات محرک رشدی قارچ‌های تریکودرما شامل حل‌کنندگی روی و فسفات اندازه‌گیری شد.

حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول معدنی

برای این منظور از محیط NBRIP[2] حاوی مواد زیر بر اساس گرم در لیتر می‌باشد (گلوکز (۱۰) ، تری‌کلسیم فسفات (۱۰)، $MgCl_2.6H_2O$ (۵)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۲۵)، KCl (۰/۲) و $(NH_4)_2SO_4$ (۰/۱)، NH_4NO_3 (۰/۲) استفاده شد و pH محیط در نهایت روی ۶/۸ تنظیم گردید. در این روش ۱۰۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچها (10^8 اسپور در هر میلی‌لیتر) به ۲۵ میلی‌لیتر محیط NBRIP حاوی ۱۰ گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات منتقل شد. سپس ارلن‌های تلقیح داده شده همراه با یک شاهد به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده و pH آن‌ها قرائت شد. سپس تعلیق قارچ سانتریفیوژ (با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول رویی با ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط شد. پس از بیست دقیقه خواباندن نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، میزان جذب نور به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ قرائت و میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده به وسیله‌ی KH_2PO_4 محاسبه شد (Saravanakumar و همکاران، ۲۰۱۳).

حل‌کنندگی ترکیبات نامحلول معدنی روی

برای این منظور از محیط مایع Sucrose-Yeast extract (SY) (حاوی ۳۰ گرم سوکروز و دو گرم در لیتر عصاره مخمر) که حاوی دو گرم در لیتر نمک‌های ZnO و $ZnCO_3$، با pH برابر با ۶/۸ استفاده شد. ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچها (10^8 اسپور در هر میلی‌لیتر) به ۲۵ میلی‌لیتر محیط SY منتقل شد و نمونه‌ها برای مدت ۱۲۰ ساعت تکان در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شد و پس از آن pH آن‌ها قرائت شد. سپس محیط کشت حاوی قارچ سانتریفیوژ (با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با محیط SY به نسبت ۱۰۰:۱

[1] Trichoderma

[2] National Botanical Research Institute Phosphate broth medium

رقیق شد و مقدار روی محلول در نمونه‌های تلقیح شده با قارچ و شاهد با استفاده از دستگاه جذب اتمی مورد اندازه‌گیری قرارگرفت (Altomare و همکاران، ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. هم‌چنین داده‌های بدست آمده از نرم افزار و جدول‌ها و نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه‌های Excel و Word ارائه شد.

نتایج و بحث

مطابق نتایج تجزیه واریانس جدول ۱ توانایی حل‌کنندگی فسفر، ZnO و $ZnCO_3$ تمامی جدایه‌های *تریکودرما* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر جدایه‌های *تریکودرما* بر میزان حل‌کنندگی فسفر، ZnO، $ZnCO_3$

منابع تغییرات	درجه آزادی	فسفر	ZnO	$ZnCO_3$
قارچ	۱۳	۱۹۵۷۸۱**	۵۴۳**	۷۱۲**
خطا	۲۷	۸۴۰	۷/۴۹	۷/۸۵
ضریب تغییرات		۱۳/۵	۱۲/۸	۱۳/۹

** نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد تمامی جدایه‌ها قادر به انحلال ترکیبات نامحلول فسفر بودند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیشترین مقدار انحلال فسفر جدایه‌های T1 و T3 به‌ترتیب با میزان ۷۵۲ و ۷۸۶ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان انحلال جدایه‌های T6، T8، T10، T11، T12، T14 به‌ترتیب با میزان ۵۳/۷، ۳۱/۰، ۲۹/۳، ۷۷/۳، ۲۶/۳ و ۵۲/۷ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. Harman و همکاران (۲۰۰۴) طبق پژوهشی گزارش کردند که جدایه‌های *تریکودرما* محیط اطراف خود را با ترشح اسیدهای آلی همچون اسید گلوکونیک، اسید سیتریک اسیدی می‌کنند که در نتیجه باعث حل شدن فسفات و ریزمغذی‌ها می‌شوند. همچنین Doni و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که جدایه‌های *تریکودرما* به‌عنوان قارچ محرک رشد گیاه (PGPF) توان تولید سیدروفور و حل‌کنندگی فسفات را دارند. Altomar و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که جدایه‌های *تریکودرما* قادر به افزایش حلالیت روی و فسفات‌های سنگی (خصوصا فسفات کلسیم) بوده که در نتیجه منجر به افزایش جذب فسفر و روی به‌وسیله گیاهان شدند. Yadidia و همکاران (۲۰۰۱) طبق آزمایشی گزارش کردند، هنگامی که خاک با جدایه‌های *تریکودرما* تیمار شد، جوانه‌زنی بذرهای خیار ۳۰ درصد، وزن خشک ۸۰ درصد، طول ساقه ۴۰ درصد و غلظت فسفر ۹۰ درصد افزایش یافت. Zhao و همکاران (۲۰۱۴) اثرات *تریکودرما* در بهبود کیفیت خاک و رشد گیاه از طریق تبدیل منابع آلی به فرم معدنی از جمله فسفر، نیتروژن و آهن نشان دادند. Rudresh و همکاران (۲۰۰۵) طی پژوهشی نشان دادند که *تریکودرما* از طریق حل‌کنندگی فسفات باعث افزایش جذب عناصر غذایی و عملکرد دانه نخود شد و همچنین در آزمایش مزرعه‌ای افزایش غلظت فسفر در بوته‌ی نخود تلقیح شده با *تریکودرما* را نسبت به شاهد گزارش کردند.

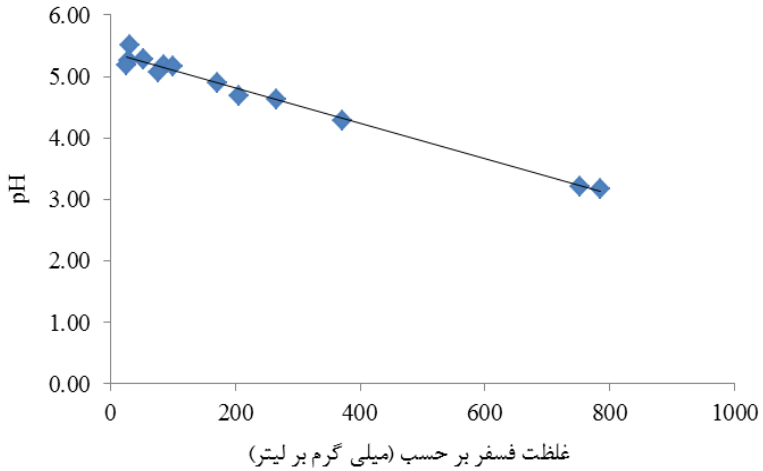
با توجه به نتایج بدست آمده جدول ۲ تمامی جدایه‌ها به جز T6 و T12 توانایی حل‌کنندگی ZnO را داشتند که بیشترین حل‌کنندگی مربوط به سویه‌های T1، T3و T4 به‌ترتیب با میزان ۳۸/۰، ۳۷/۸، ۴۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین حل‌کنندگی مربوط به سویه‌های T2، T8، T10، T11و T14 به‌ترتیب میزان ۱۱/۴، ۱۵/۴، ۱۳/۳، ۱۵/۲ و ۱۴/۹ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده از جدول ۲ تمامی سویه‌ها به جز T6 و T12 توانایی حل‌کنندگی $ZnCO_3$ را داشتند که بیشترین حل‌کنندگی در جدایه‌های T1 و T3 به‌ترتیب با میزان ۵۱/۱ و ۴۷/۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. کمترین حل‌کنندگی در جدایه‌های T2، T8، T10، T11 و T14 با میزان ۹/۶۰، ۹/۹۰، ۱۴/۶، ۱۱/۹، ۱۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. Anuradha و همکاران (۲۰۱۶) طی پژوهشی میزان حل‌کنندگی $ZnCO_3$ و ZnO را در محیط پیکوسکیPKV توسط قارچ‌های *تریکودرما* را به‌ترتیب ۲۹۳ و ۱۸۷ میلی‌گرم برلیتر گزارش کردند. همچنین Vaid و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که *تریکودرما* برخی از اسیدهای آلی مانند اسید گلوکونیک، سیتریک اسید و فوماریک اسید را در ریزوسفر تولید می‌کند که با کاهش pH خاک، باعث افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول مانند Zn و جذب آن توسط گیاه شود. Azarmi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که جدایه‌های *تریکودرما* با انحلال Zn و تولید IAA شد باعث افزایش

رشد و جذب مواد مغذی در گیاهان شدند. همچنین Jayant (۲۰۱۲) طی پژوهشی انحلال Zn به‌وسیله *تریکودرما* و جذب آن توسط گیاه را نشان دادند.

جدول ۲- مقایسه میانگین مقدار حل‌کنندگی فسفر،ZnO و $ZnCO_3$ توسط جدایه‌های مورد آزمایش و pH محیط تری‌کلسیم فسفات

شماره جدایه	میانگین مقدار حل‌کنندگی فسفر	میانگین مقدار حل‌کنندگی ZnO	میانگین مقدار حل‌کنندگی $ZnCO_3$	pH
	mg L^{-1}			
T.harzianum T1	۷۵۲a	۳۸/۰a	۵۱/۱a	۳/۲۱
T.harzianum T2	۸۶/۰e	۱۱/۴d	۹/۶۰d	۵/۱۸
T.atroviride T3	۷۸۶a	۳۷/۸a	۴۷/۰a	۳/۱۳
T.harzianum T4	۳۷۲b	۴۱/۳a	۲۳/۱c	۴/۲۹
T.awreoviridae T5	۱۰۱e	۲۹/۷b	۲۴/۷c	۵/۱۶
T.harzianum T6	۵۳/۷ef	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۵/۲۷
T.harzianum T7	۱۷۲d	۳۱/۴b	۲۲/۵c	۴/۸۹
T.harzianum T8	۳۱/۰f	۱۵/۴d	۹/۹۰d	۵/۵۰
T.viride T9	۲۶۶c	۲۲/۰c	۲۳/۴c	۴/۶۳
T.harzianum T10	۲۹/۳f	۱۳/۳d	۱۴/۶d	۵/۲۶
T.harzianum T11	۷۷/۳ef	۱۵/۲d	۱۱/۹d	۵/۰۷
T.harzianum T12	۲۶/۳f	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۵/۱۹
T.awreoviridae T13	۲۰۶d	۲۸/۱b	۳۲/۶b	۴/۶۹
T.awreoviridae T14	۵۲/۷ef	۱۴/۹d	۱۱/۶d	۵/۲۸
شاهد بدون قارچ	۵/۶۵g	۰/۱۰e	۰/۱۵e	۶/۴۰

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشند



شکل ۱- نمودار رابطه همبستگی بین حلالیت فسفر و pH محلول حاوی تری‌کلسیم فسفات

همچنین نتایج شکل ۱ نشان داد رابطه‌ی منفی بین حلالیت فسفر و pH محیط تری کلسیم فسفات وجود دارد و با کاهش pH محیط تری‌کلسیم فسفات حلالیت فسفر افزایش پیدا کرد. رابطه منفی بین pH و میزان فسفر حل شده توسط محققین بسیاری گزارش شده است که با کاهش pH انحلال فسفر افزایش پیدا کرد (Richardson و همکاران، ۲۰۰۱؛ Esiken و همکاران، ۲۰۱۰؛ Yu و همکاران، ۲۰۱۱).

نتیجه‌گیری

فسفر یکی از عناصر ضروری گیاهان است و همچنین عنصر روی که نقش زیادی در گیاهان از جمله سوخت وساز قندها و شرکت در ساختمان آنزیم‌های گیاهی ایفا می‌کند، اما در بیشتر خاک‌های آهکی این عناصر که بیشتر به صورت نامحلول در خاک وجود دارند که باعث کاهش جذب و در نتیجه باعث کاهش رشد گیاهان می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های قارچی *تریکودرما* نقش موثری در انحلال ترکیبات نامحلول روی و فسفر داشتند. احتمالا استفاده از این جدایه‌ها در شرایط خاکی می‌تواند نقش موثری در افزایش فراهمی عناصر روی و فسفر در خاک داشته باشند. در بین قارچ‌های مورد بررسی، سویه‌های T1 و T3 که به‌ترتیب مربوط به قارچ *T.harzianum* و *T.atroviride* موثرترین به منظور استفاده در کشت‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای به منظور بررسی نقش آنها در افزایش فراهمی عناصر در خاک و رشد گیاهان می‌باشند. در صورت موثر بودن این جدایه‌ها در شرایط گلخانه و همچنین مزرعه، می‌توان از این جدایه‌ها به عنوان کود زیستی در جهت کاهش مصرف کودهای شیمیایی استفاده کرد.

منابع

Altomare, C., Norvell, W. A., Bjorkman, T. and Harma, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology, 65(7), 2926-2933.

Anuradha, P. and Syed, I. 2016. Evaluation of zinc solubilIzation capacity of different microbial strain and their effect on *bt* cotton. Journal of Agriculture Sciences, 24, 1474-1477.

Azarmi, R., Hajiegrari, B. and Giglou, A. 2011. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. African Journal of Biotechnology, 10(31), 5850-5855.

Balemy, T., Pal, N. and Saxena, A.K. 2007. Response of onion (Allium cepa L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. Acta agric Slovenica, 89, 107-114.

Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castro, R. and Lopez-Bucio, J. 2013. Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma* Physiology, genetics and gene expression. *Trichoderma* Biology and Applications, 175-196.

Doni, F., Isahak, A., Zain, C. R. C. M. and Yusoff, W. M. W. 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma spp*. inoculants. AMB Express-a Springer Open Journal, 4, 2-7.

Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S. M. F. Donmez, M. Turan and Gunes, A. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically growth strawberry, Scientia Horticulture, 124, 62-66.

Harman, G. E. 2011. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica, 39,103-108.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Natural Review Microbiology, 2, 43-56.

Jayant, R. 2012. International conference on Biological and Life Sciences IPCBEE, 40, 83-90.

Jiang, Y., Gao, W.W., Zhao, J.L, Chen, Q., Liang, D., Xu, C., Huang, L.S. and Ruan, L.m.2018. Analysis of influencing factors on soil Zn content using generalized additive model. Scientific Reports, 8: 15567.

Nottidge, D.O., Ojeniyi, S.O. and Asawalam, D.O. 2005. Comparative effects of plant residues and NPK fertilizer on soil properties in a humid Ultisol. Nigerian Journal of Soil Science, 15, 9–13.

Richardson, A.E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorous by plants, Australian. Journal of Plant Physiology, 28(9), 897–906.

Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K. and Prasad, R. D. 2005. Effect of combined application of Rhizobium, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied Soil Ecology, 28, 139-146.

Saravanakumar, K., Arasu, V.S. and Kathiresan, K. 2013. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina.* Aquatic Botany, 104, 101–105.

Shoresh, M. G., Harman, E. and Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review Phytopathol, 48, 21–43.

Susana, B., Rosas, J.A., Andre, M.R. and Nestor, S.C. 2006. Phosphatesolubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia–legume symbiosis. Soil Biol. Biochem, 38, 3502-3505.

Vaid, S.K., Kumar, B., Sharma, A., Shukla, A.K. and Srivastava P.C. 2014. Effect of zinc solubilizing bacteria on growth promotion and zinc nutrition of rice. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 14(4), 889-910.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, 40, 1-10.

Yadidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harizanum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil, 235, 235-242.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H, Liu, G.H and Mao, C. 2011. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization, Biology and Fertility of Soils, 47(4), 437-446.

Zhao, L., Wang, F., Zhang, Y and Zhang, J. 2014. Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. Journal Basic Microbiology, 54, 115-124.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The investigation of solubilization of insoluble phosphorus and zinc compounds by 14 Trichoderma isolates

Hossein zeynali, F[1]., Abbaszadeh-Dahaji, P[*2]., Alaei, H.[3] Hoseini, F. [1]

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University Of Rafsanjan, Iran

[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University Of Rafsanjan, Iran

[3] Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

Abstract

The fixation of phosphorus and zinc on soil minerals and their precipitation as insoluble compounds is one of the limitations of yield production. One of the methods that solubilize the insoluble zinc and phosphates is application of plant growth stimulating fungi, such as Trichoderma. To this end, 14 isolates of drought stress-resistant Trichoderma were selected from the Gene Bank in Department of Agriculture of Vali-e-Asr University of Rafsanjan. The isolates were then tested for zinc and phosphate solubility. To determine the solubility of phosphorus by different isolates, the medium containing tricalcium phosphate (TCP), and for evaluating Zn solubility the medium including ZnO and $ZnCO_3$ media were used. The results showed that all isolates had phosphorus solubility in tricalcium phosphate medium; so, the ability of phosphorus solubility of all isolates of Trichoderma was significant at 1% level. The highest ability for dissolution was recorded for T1 and T3 isolates up to 752 and 786 mg L^{-1} respectively. Also, the results of ZnO and $ZnCO_3$ solubility indicated that all isolates had the ability to solubilize except for T6 and T12 that this ability was significant for all Trichoderma isolates at 1% level. The highest ZnO dissolution was observed for isolates of T1, T3 and T4 isolates with 38.0, 37.8, 41.3 and 41.3 mg L^{-1}, and T6 and T12 isolates did not have the ability to dissolve ZnO. Also, for $ZnCO_3$ solubility, the highest solubility was related to T1 and T3 isolates with 51.1 and 47.0 mg L^{-1}, and T6 and T12 isolates did not have the ability to dissolve $ZnCO_3$. Also, with a test on pH and dissolution rate of phosphorus, it was shown that by decreasing pH, the solubility of phosphorus increased and the highest solubility of phosphorus was observed at 752 and 786 mg L^{-1} at pH 3.13 and 3.21. Regarding the ability of Trichoderma drought resistant isolates to dissolve zinc and phosphorus compounds, superior isolates can be used in greenhouse and field tests, and, if viewed as positive, they were introduced as suitable biological fertilizer.

Keywords: Tricalcium Phosphate, Zinc, availability of nutrient, Plant Growth Promoting Fungi

[*] Corresponding author, Email: P.abbaszadeh@vru.ac.ir

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تغییرات مقدار روی و رشد کلزا در پاسخ به باکتری‌های محرک رشد

علیرضا توسلی[۱*]، کاظم قاسمی گلعذانی[۲]، سالار فرهنگی آبریز[۳]، سعید قاسمی[۳]، هادی اسدی رحمانی[۴]، حسن منیری‌فر[۵]

[۱] استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

[۲] استاد گروه اکوفیزیولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] دانش آموخته دوره دکتری، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز

[۳] دانش آموخته دوره دکتری، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز

[۴] دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۵] دانشیار بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

چکیده

استفاده از باکتری‌های محرک رشد جهت افزایش جذب عناصر غذایی یکی از روش‌های متداول در کشاورزی مدرن است. این تحقیق جهت بررسی اثرات احتمالی تلقیح بذر با باکتری‌های سودوموناس (RS-168) و آزوسپریلیوم (RS-SP7) بر جذب و انتقال عنصر روی، مقدار روی در برگ و ریشه و رشد کلزا (*Brassica napus* cv. okapi) طراحی و اجرا گردیده است. تیمارهای آزمایشی شامل بدون تلقیح، تلقیح با سودوموناس، تلقیح با آزوسپریلیوم و تیمار ترکیبی سودوموناس + آزوسپریلیوم بودند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، تمامی تیمارهای باکتریایی موجب افزایش جذب و انتقال روی در کلزا شدند، که در این بین، استفاده از سودوموناس و تیمار تلفیقی سودوموناس + آزوسپریلیوم بیش‌ترین افزایش در جذب روی را موجب گردیدند. بیشترین محتوای روی در بافت برگ نیز در تیمار حاصل از باکتری سودوموناس مشاهده گردید. افزایش مقدار روی در پاسخ به باکتری‌های سودوموناس و آزوسپریلیوم سبب افزایش رشد اندام هوایی و وزن خشک آن گردید. حداکثر وزن خشک اندام هوایی به ترتیب در تلقیح بذور با سودوموناس و سودوموناس + آزوسپریلیوم ایجاد شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های سودوموناس توانایی بالایی در افزایش جذب و انتقال روی در کلزا دارند که می‌توان از این قابلیت در افزایش رشد گیاهان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سودوموناس، آزوسپریلیوم، جذب روی، کلزا، تغذیه گیاه

مقدمه

تغذیه گیاه از اصلی ترین موارد در افزایش رشد گیاه در شرایط گوناگون محیطی است (Alshaal و همکاران ۲۰۱۷). باکتری‌های محرک رشد به دلیل قابلیت‌های مختلف زیستی و شیمیایی خود توانایی افزایش جذب برخی از عناصر را به گیاهان می‌بخشند. سودوموناس و آزوسپریلیوم از جمله باکتری‌های مهم محرک رشد در گیاهان هستند که کاربرد زیادی در بخش کشاورزی دارند (Gupta و همکاران ۲۰۱۵). این باکتری‌های محرک رشد با سنتز برخی از مواد مانند اسیدهای ارگانیک توانایی جذب عناصر را در خاک افزایش می‌دهند. سودوموناس بیشتر به عنوان باکتری حل کننده فسفات در خاک مطرح است. آزوسپریلیوم نیز به عنوان باکتری است که جذب نیتروژن را در گیاه افزایش می‌دهد، هرچند که این باکتری‌ها می‌توانند جذب سایر عناصر را نیز در گیاه تغییر دهند (Gallarato و همکاران ۲۰۱۵). عنصر روی یکی از عناصر مهم در رشد گیاه است که دارای نقش‌های مختلفی در رشد و تمایز بافت می‌باشد. این عنصر در سنتز کلروفیل در برگ ها نقش کلیدی داشته و گیاهانی که فقر روی دارند مقدار کلروفیل کمتری خواهند داشت. روی به عنوان یکی از عناصر مهم در ساخت و انتقال مواد قندی در گیاه است. این عنصر در جذب و انتقال نیتروژن از خاک نیز دارای اثرات مثبتی است (Fageria, 2016). کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان است که جهت استخراج روغن کشت می‌شود و پس از سویا و نخل روغنی در جایگاه سوم تولید روغن قرار دارد. امروزه دانه کلزا به علت داشتن حدود ۴۰ الی ۴۸ درصد روغن و ۳۸ الی ۴۵ درصد پروتئین در کنجاله مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (Salisbury و همکاران ۲۰۱۶). سازگاری کلزا با شرایط آب و هوایی اکثر نقاط ایران، سبب توسعه کشت آن گردیده و به عنوان نقطه امید جهت تأمین روغن خام مورد نیاز کشور به شمار می آید، چرا که نیاز کشور به روغن گیاهی رو به افزایش است. موفقیت در تولید

* ایمیل نویسنده مسئول: ar.tavasolee@yahoo.ca

این گیاه زراعی نیازمند تغذیه مناسب آن توسط کشاورزان است. بر این اساس این پژوهش جهت ارزیابی اثرات باکتری های محرک رشد سودوموناس و آزوسپریلیوم بر مقادیر جذب و انتقال روی به اندام هوایی و رشد کلزا طراحی و اجرا شده است.

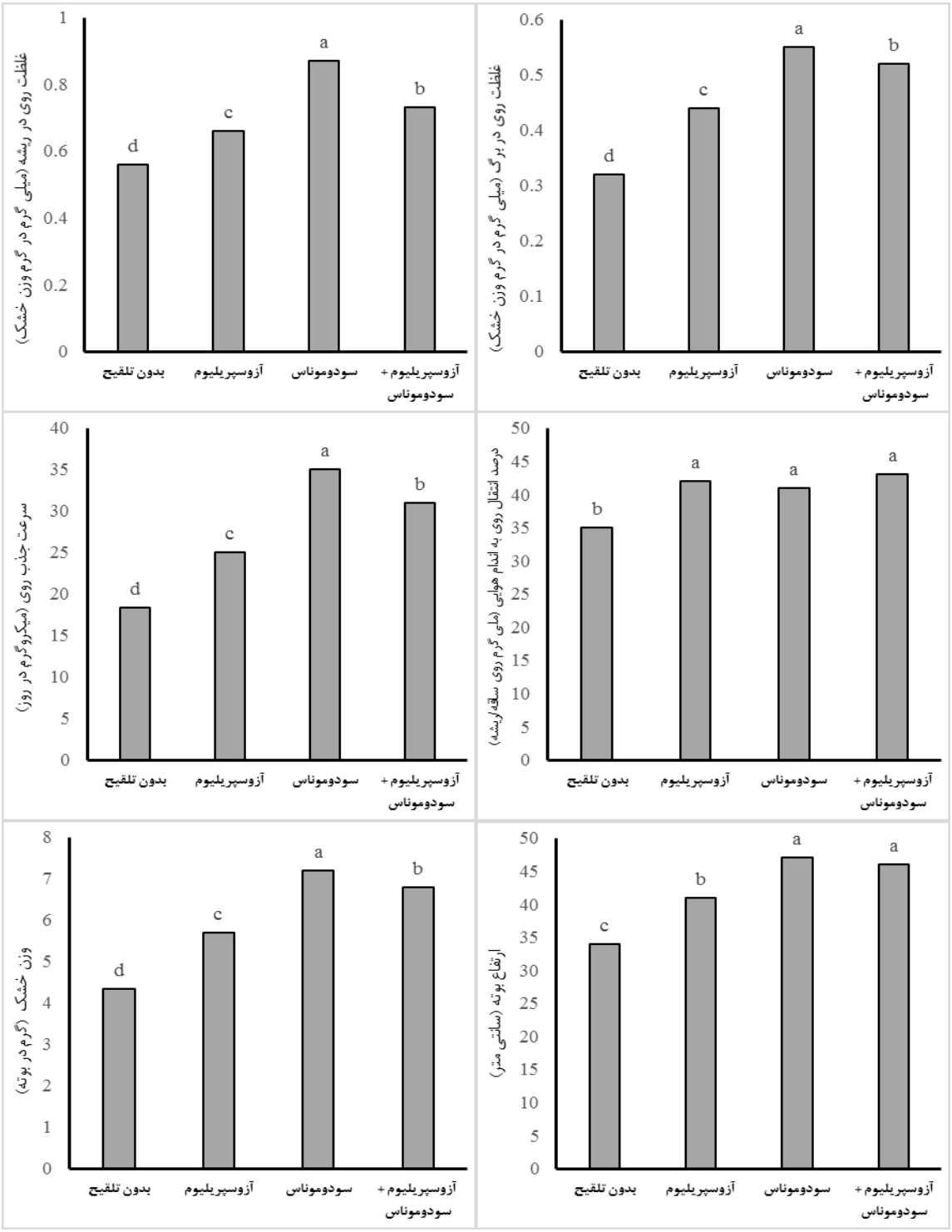
مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ و در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه تبریز طراحی و اجرا شد. طرح آزمایشی بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار بود. بذرهای رقم اکاپی کلزا با باکتری‌های سودوموناس (RS-168) و آزوسپریلیوم (RS-SP7) با جمعیت (10^8 cfu ml^{-1}) به صورت تک تیمار و تیمار همزمان تلقیح و در گلدان‌هایی با بستر پرلیت کشت شدند. گلدان‌ها در دمای حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد با طول روز ۱۳ ساعت قرار گرفتند. برای تغذیه گیاهان از محلول هوگلند استفاده شد. ۶۰ روز پس از کاشت اندازه گیری‌های مربوط به مقدار روی در برگ و ریشه و وزن خشک تک بوته کلزا انجام شد. برای اندازه‌گیری مقدار روی در ریشه و برگ، ابتدا نمونه‌های گیاهی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند و سپس در کوره الکتریکی و دمای ۵۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفتند تا خاکستر گردند. نمونه های حاصل خاکستر گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ مولار هضم شده و مقدار روی با دستگاه طیف سنج جذب اتمی اندازه‌گیری شد. سرعت جذب روی بر اساس مقدار کل روی در بوته در طی دوره رشد گیاه تعیین گردید. نسبت روی در اندام هوایی به کل روی در گیاه نیز به عنوان شاخص انتقال روی از ریشه به اندام هوایی تعیین شد. وزن خشک بوته های کلزا پس از قرارگیری نمونه‌های گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری گردید. نتایج توسط نرم افزار MSTATC آنالیز و مقایسه میانگین ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

استفاده از باکتری‌های آزوسپریلیوم، سودوموناس و آزوسپریلیوم + سودوموناس موجب افزایش غلظت روی در ریشه و برگ کلزا شد (شکل ۱). این تیمارهای باکتریایی، سرعت جذب و درصد انتقال روی به اندام هوایی را نیز تشدید نمودند. گیاهان تلقیح شده با سودوموناس و آزوسپریلیوم + سودوموناس به ترتیب بیشترین مقدار روی را در بافت‌های خود داشتند. تیمار کلزا با سودوموناس بیشترین سرعت جذب روی را در مقایسه با سایر تیمارهای باکتریایی ایجاد کرد و پس از آن تیمار ترکیبی آزوسپریلیوم + سودوموناس قرار داشت. در مورد درصد انتقال، هر سه تیمار باکتریایی اثرات مشابهی ایجاد کردند و تفاوت معنی داری در بین این تیمارها مشاهده نشد. تلقیح با سودوموناس منجر به افزایش ۴۷ و ۳۶ درصدی غلظت روی در ریشه و برگ کلزا شد. هر سه تیمار باکتریایی شامل باکتری‌های آزوسپریلیوم، سودوموناس و آزوسپریلیوم + سودوموناس رشد کلزا را افزایش دادند، به گونه ای که وزن بوته و ارتفاع آن نسبت به حالت عدم تیمار رشد چشم‌گیری داشت (شکل‌های ۱ و ۲). بیشترین رشد حاصل از تیمارهای باکتریایی در تیمار باکتری سودوموناس و پس از آن در تیمار ترکیبی باکتری‌های آزوسپریلیوم + سودوموناس مشاهده شد. ارتفاع بوته حاصل از تیمار باکتری سودوموناس با تیمار آزوسپریلیوم + سودوموناس مشابه بود.

نتایج حاصل نشان داد که تیمارهای باکتریایی به خصوص تیمار سودوموناس موجب افزایش سرعت جذب و مقدار روی در برگ و ریشه کلزا می‌گردد. علت افزایش مقدار روی در برگ و ریشه کلزا را می‌توان به بیشتر شدن سرعت جذب و انتقال این عنصر در پاسخ به باکتری‌های محرک رشد نسبت داد (شکل ۱). تیمارهای باکتریایی از سوی دیگر موجب افزایش سرعت جذب و انتقال روی در گیاه شدند که این امر می‌تواند حاصل افزایش انحلال روی در خاک به وسیله باکتری سودوموناس و آزوسپریلیوم باشد (Bapiri و همکاران، ۲۰۱۲؛ Ebrahim and Aly, 2005). Naz و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که باکتری سودوموناس می‌تواند با افزایش انحلال روی در خاک سبب افزایش غلظت این عنصر در گندم شود. نتایج مشابهی نیز توسط Goteti و همکاران (۲۰۱۳) برای ذرت گزارش شده است. از سوی دیگر استفاده از باکتری های محرک رشد سودوموناس و آزوسپریلیوم می‌تواند با افزایش رشد ریشه به جذب عناصر غذایی توسط گیاه کمک نماید (Etesami and Maheshwari, 2018). افزایش رشد حاصل از تیمارهای باکتریایی در کلزا را می‌توان به بیشتر شدن جذب عنصر غذایی روی توسط این تیمارها نسبت داد (شکل ۱). روی از عناصر مهم افزایش دهنده رشد گیاه است که می‌تواند با افزایش سنتز کلروفیل و تولید مواد قندی موجب افزایش رشد گیاه گردد (Fageria, 2016).



شکل ۱- مقدار عنصر روی، جذب و انتقال آن، وزن بوته و ارتفاع بوته در کلزا تحت تیمارهای مختلف باکتریایی

حروف مختلف در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون چند دامنه ای دانکن می‌باشد.



بدون تلقیح



تلقیح با آزوسپریلیوم



تلقیح با سودوموناس



تلقیح با آزوسپریلیوم + سودوموناس

شکل ۲- اثر تلقیح باکتری‌های سودوموناس و آزوسپریلیوم بر رشد کلزا

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل، استفاده از باکتری‌های محرک رشد سودوموناس و آزوسپریلیوم موجب افزایش جذب و انتقال روی در کلزا می‌گردند که در این بین تیمار گیاهان با سودوموناس و تیمار ترکیبی سودوموناس + آزوسپریلیوم نتایج بهتری را نشان دادند. تیمارهای باکتریایی به طور چشمگیری رشد کلزا را افزایش می‌دهند. با توجه به اهمیت عنصر روی در رشد و زادآوری گیاهان، این تیمارهای باکتریایی را می‌توان به طور وسیعی در مزارع کشور برای افزایش رشد و محصول دهی کلزا استفاده نمود.

منابع

Alshaal, T., El-Ramady, H., Al-Saeedi, A.H., Shalaby, T., Elsakhawy, T., Omara, A.E.D., Gad, A., Hamad, E., El-Ghamry, A., Mosa, A. and Amer, M. 2017. The rhizosphere and plant nutrition under climate change. In Essential Plant Nutrients (pp. 275-308). Springer, Cham.

Bapiri, A., Asgharzadeh, A., Mujallali, H., Khavazi, K. and Pazira, E. 2012. Evaluation of Zinc solubilization potential by different strains of Fluorescent Pseudomonads. J. Appl. Sci. Environ. Manage, 16 295 – 298.

Cakmak, I. and Kutman, U.B. 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. Eur J Soil Sci, 69, 172-180.

Ebrahim, M.K. and Aly, M.M. 2005. Physiological response of wheat to foliar application of zinc and inoculation with some bacterial fertilizers. J Plant Nutr, 27, 1859-1874.

Etesami, H. and Maheshwari, D.K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. Ecotox Environ Safe, 156, 225-246.

Fageria, N.K., 2016. *The use of nutrients in crop plants*. CRC press.

Gallarato, L.A., Paulucci, N.S., Chiappero, J., Cesari, A.B., Reguera, Y.B., Vicario, J.C. and Dardanelli, M.S. 2015. Stress physiology in Azospirillum and other PGPRs. In Handbook for Azospirillum (pp. 319-330). Springer, Cham.

Goteti, P.K., Emmanuel, L.D.A., Desai, S. and Shaik, M.H.A. 2013. Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). Int J Microbiol, 2013.

Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. J Microb Biochem Technol, 7, 096-102.

Naz, I., Ahmad, H., Khokhar, S.N., Khan, K. and Shah, A.H. 2016. Impact of zinc solubilizing bacteria on zinc contents of wheat. Am. Euras. J. Agric. Environ. Sci, 16, 449-454.

Salisbury, P.A., Cowling, W.A. and Potter, T.D. 2016. Continuing innovation in Australian canola breeding. Crop Pasture Sci, 67, 266-272.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Changes in zinc content and rapeseed growth in response to the growth promoting bacteria

Tavasolee[*1], AR., Ghassemi-Golezani[2], K., Farhangi-Abriz[3], S., Ghassemi[3], S., Asadi Rahmani[4], H., Monirifar[5], H.

[1] Assistance Prof., Soil and Water Research Department, East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran
[2] Professor, Department of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Ph.D. graduate, Department of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Ph.D. graduate, Department of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] Associate Prof, Soil and Water Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
[5] Associate Prof, Seed and Plant Improvement Research Department, East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran

Abstract

The use of growth-promoting bacteria to increase the absorption of the nutrients is one of the most commonly used methods in modern agriculture. This research was designed and conducted to evaluate the possible effects of seed inoculation with pseudomonas (RS-168) and azospirillum (RS-SP7) on zinc uptake, translocation, and zinc content in root and leaf, and rapeseed growth (*Brassica napus* cv okapi). Experimental treatments consisted of non-inoculation, inoculation with pseudomonas, inoculation with azospirillum, and pseudomonas + azospirillum combination. According to the results, all bacterial treatments increased the zinc uptake and translocation in rapeseed plants, while the use of pseudomonas and the combined treatment of pseudomonas + azospirillum caused the highest increase in zinc uptake. The highest content of zinc in leaf tissue was observed in pseudomonas treatment. Increasing zinc in response to pseudomonas and azospirillum bacteria increased the growth of shoot and its dry weight. The highest dry weight of shoot was observed in seed inoculation with pseudomonas and pseudomonas + azospirillum. The results showed that pseudomonas bacteria have a high ability to increase zinc uptake and translocation in rapeseed, which can be used to increase the growth of plants.

Keywords: Pseudomonas, Azospirillum, Zinc uptake, Rapeseed, Plant nutrition

[*] Corresponding author, Email: ar.tavasolee@yahoo.ca

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثر تلقیح باکتری‌های محرک رشد بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی سیر تحت تنش شوری

علیرضا توسلی[۱*]، سعید قاسمی[۲]، کاظم قاسمی گلعذانی[۳]، سالار فرهنگی آبریز[۲]، احمد بابیوردی[۱]، هوشنگ خسروی[۴]

[۱] استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

[۲] دانش آموخته دوره دکتری، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز

[۳] استاد گروه اکوفیزیولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۴] استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

شوری یک عامل محدودکننده برای رشد و تولید است. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های ساکن ریزوسفر گیاهان هستند که با استفاده از مکانیسم‌های مختلف موجب تحریک رشد میزبان و افزایش تحمل نسبت به تنش‌های محیطی می‌شوند. یک آزمایش گلخانه‌ای بر اساس فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۷ اجرا شد تا اثر تلقیح باکتری‌های محرک رشد بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی سیر تحت تنش شوری مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری صفات مورفولوژیکی گیاه سیر مانند ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ در بوته و سطح برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. استفاده از آزوسپریلیوم (RS-SP7) و ازتوباکتر کروکوکوم (A-106) سبب افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد برگ در بوته گردید. بنابراین در شرایط شوری می‌توان از باکتری‌های محرک رشد گیاه برای بهبود رشد گیاه از طریق فرآیندهای تحریک رشد گیاه و به طور غیرمستقیم از طریق بهبود شاخص های زیستی خاک و در نتیجه بهبود شرایط حاصلخیزی و تغذیه گیاه استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ارتفاع بوته، ازتوباکتر، آزوسپریلیوم، سطح برگ

مقدمه

امروزه گیاهان دارویی از نظر اقتصادی مهم هستند و به صورت خام یا فراوری شده در طب سنتی و مدرن صنعتی مورد استفاده و بهره‌وری قرار می‌گیرند. عوارض جانبی داروهای شیمیائی و تمایل بشر به استفاده هرچه بیشتر از محصولات طبیعی به منظور حفظ سلامت خویش و همچنین مشکلات سیستم دارویی مدرن، باعث توجه هرچه بیشتر بشر به گیاهان دارویی گردیده است (Rahimzadeh و همکاران، ۲۰۱۲). سیر گیاهی تک لپه، علفی و یک‌ساله از خانواده Alliaceae می‌باشد. برخی از محققان منشأ این گیاه را آسیای مرکزی می‌دانند که توسط مهاجرین اولیه به شرق اروپا و آسیا منتقل شده است. سیر به صورت خام یا فرآوری شده در طب سنتی یا مدرن صنعتی مورد استفاده و بهره‌برداری قرار می‌گیرد (Ghaderifar و همکاران، ۲۰۱۲). به‌طوری‌که استفاده از آن برای کاهش کلسترول، تنظیم فشارخون، درمان ناراحتی‌های قلبی و عروقی و سرماخوردگی توصیه شده است. سطح زیر کشت جهانی سیر حدود یک میلیون و ۴۶۵ هزار هکتار است و میانگین عملکرد آن نیز بیش از ۱۶ تن در هکتار ذکر شده است. در ایران سطح زیر کشت این گیاه ده هزار هکتار و عملکرد آن (۹ تن در هکتار) کمی بیشتر از ۵۰ درصد عملکرد جهانی می‌باشد (FAO, 2012). این احتمال وجود دارد که سیر در طول دوره رشد، با تنش‌های محیطی متفاوتی مواجه گردد که این امر می تواند شدیداً بر رشد و عملکرد گیاه اثر گذارد.

شوری آب و خاک از مهم ترین موانع افزایش عملکرد گیاهان در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد که می‌تواند موجب تغییر در الگوی رشد و کاهش عملکرد در بسیاری از گیاهان زراعی شود. شوری کلرید سدیم بر روند انتقال آب و یون‌ها در گیاهان تأثیر می‌گذارد، به طوری که ممکن است تعادل یونی و وضعیت مواد غذایی را در گیاه تغییر دهد (Hasni و همکاران، ۲۰۰۹). تنش شوری از طریق کاهش سطح برگ و وزن تر و خشک گیاه، محدود نمودن فعالیت کلروفیل‌ها، آنزیم‌ها و سنتز پروتئین‌ها موجب اختلال در وظایف غشای کلروپلاست می‌شود (Taïbi و همکاران، ۲۰۱۶).

* ایمیل نویسنده مسئول: ar.tavasolee@yahoo.ca

یکی از راهکارهایی که تحت تنش شوری می‌تواند سبب تعدیل آسیب به فرآیندهای فیزیولوژیکی شود و مانع افت کارایی فتوسنتزی گیاه گردد استفاده از باکتری‌های محرک رشد می‌باشد. این باکتری‌ها از طریق تولید آنزیم آمینوسیکلوپروپان‌کربوکسیلات‌دی آمیناز سبب کاهش میزان اتیلن گیاه می‌شود و میزان فراهمی عناصر کم‌مصرف در شرایط تنش شوری را افزایش می‌دهد (Chang و همکاران، ۲۰۰۷). اثرات باکتری‌های محرک رشد برای رشد و نمو گیاهان به دو صورت اثرات مستقیم و اثرات غیر مستقیم می‌باشد. در حالت مستقیم انواع باکتری‌های محرک رشد با استفاده از مکانیسم‌های تثبیت زیستی نیتروژن، افزایش جذب و فراهمی یا محلول‌کردن عناصر غذایی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، تولید انواع ویتامین‌ها، تولید سیدروفورهای کلاته کننده آهن و محلول ساختن فسفات باعث تحریک و افزایش رشد گیاهان می‌شوند. در حالت غیرمستقیم، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل نموده و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند. رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاه‌های مناسب برای فعالیت پاتوژن‌ها، تولید آنتی بیوتیک و سیانید هیدروژن از مهم‌ترین مکانیسم‌های مورد استفاده در این روش می‌باشند. استفاده از این باکتری‌ها در تنش‌های محیطی می‌تواند در کاهش اثرات تنش مفید واقع شود (Grobelak و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به وسعت اراضی شور در ایران و ضرورت شناخت عوامل کاهش دهنده اثر تنش شوری، این تحقیق صورت پذیرفت تا تأثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد بر روی برخی صفات مورفولوژیکی گیاه سیر بررسی شود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی برخی تغییرات مورفولوژیکی گیاه سیر تحت تنش شوری در واکنش به تلقیح با باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلیوم آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در شرایط گلخانه‌ای اجرا گردید. بذرهای سیر پس از تلقیح باکتری‌های مورد نظر آزوسپریلیوم (RS-SP7) و ازتوباکتر کروکوکوم (A-106) با جمعیت (10^8 cfu ml^{-1}) در گلدان‌هایی با بستر پرلیت کشت شدند. برای تیمار شاهد از آب شهری با هدایت الکتریکی برابر ۰/۸ dS/m استفاده شد. سطوح شوری نیز با اضافه کردن سدیم کلراید به آب شهری (۶ dS/m و ۱۲ dS/m) ایجاد شدند. بلافاصله بعد از کاشت، آب و محلول‌های شوری در هدایت‌های الکتریکی مورد نظر مطابق با تیمارها به گلدان‌ها اضافه شدند. با توجه به استفاده از بستر کشت پرلیت، عناصر غذایی به صورت محلول هوگلند بعد از استقرار گیاهچه و در مراحل مختلف رشد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. برای جلوگیری از افزایش هدایت الکتریکی گلدان‌ها بر اثر مصرف محلول غذایی هوگلند، بستر کاشت گلدان‌ها هر ۳۰ روز یک بار به طور کامل با آب شهری شسته شده و مجدداً با محلول‌های مورد نظر تیمار می‌گردند. ۱۲۰ روز پس از کاشت ارتفاع بوته با خط کش، قطر ساقه توسط کولیس، سطح برگ توسط سطح برگ سنج و تعداد برگ در بوته اندازه‌گیری شدند. رسم نمودارها با نرم افزار Excel و تجزیه آماری با نرم افزار MSTAT-C و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.



شکل ۱. نمایی از گلدان‌های سیر مورد آزمایش در شرایط گلخانه

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر شوری بر روی ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ در بوته و سطح برگ سیر معنی‌دار گردید. همچنین تلقیح با باکتری‌های محرک رشد بر روی تمامی این صفات به جز تعداد برگ در بوته اثر معنی‌داری داشت. اثر متقابل شوری × باکتری‌های محرک رشد بر هیچکدام از صفات معنی‌دار نگردید (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برخی صفات مورفولوژیکی سیر تحت تنش شوری و تلقیح باکتری‌های محرک رشد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		ارتفاع بوته	قطر ساقه	تعداد برگ در بوته	سطح برگ
تکرار	۲	۱۶۳/۴۹	۱/۴۸	۲/۷۷	۲/۱۱
شوری (S)	۲	۴۷۳/۴۱**	۱/۸۵**	۲۳/۴۴**	۵۹۳/۴۴**
باکتری‌های محرک رشد (P)	۲	۵۹/۲۸*	۰/۳۷**	۱/۳۳ ^{ns}	۴۰/۴۴*
S×P	۴	۹/۰۲^{ns}	۰/۰۲۴^{ns}	۰/۱۱^{ns}	۲/۲۲^{ns}
خطای آزمایشی	۱۶	۱۰/۲۱	۰/۰۲۵	۰/۴	۹/۴۸
ضریب تغییرات	-	۶/۰۷	۳/۱۷	۷/۳۲	۴/۲۱

^{ns} ، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش شدت شوری ارتفاع بوته به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. تلقیح با باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر سبب افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته گردید ولی اختلاف بین این دو باکتری معنی‌دار نبود (جدول ۲). ارتفاع گیاه یکی از خصوصیات مورفولوژیکی است که شدیداً تحت تأثیر شوری قرار می گیرد. در گیاهان تحت تنش شوری، عدم تورژسانس مناسب سلول ها و تخصیص بیشتر مواد سنتز شده جهت مقابله با تنش، کوتاه شدن دوره رشد گیاه و نیز مکانیسم های فرار از تنش همگی می‌توانند مانع از توسعه عادی سلول‌ها و در نتیجه کاهش ارتفاع گیاه شوند. تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش توسعه ریشه و جذب بهتر آب و مواد غذایی می شود و این امر موجب بهبود رشد رویشی گیاه و افزایش ارتفاع بوته‌ها می‌گردد (شهرکی و همکاران، ۱۳۹۵).

قطر ساقه گیاهان سیر تحت تنش شوری کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت اما، اختلاف بین شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر معنی‌دار نبود. استفاده از باکتری‌های محرک رشد به‌ویژه آزوسپریلیوم به طور معنی‌داری قطر ساقه را افزایش داد (جدول ۲). از مهم‌ترین اثرات منفی شوری انباشت بالای یون‌های سدیم و کلر در درون سلول‌هاست که منجر به عدم تعادل یونی شده و بی‌نظمی‌های فیزیولوژیکی ایجاد می‌شود. جذب بالای یون سدیم جذب یون پتاسیم را مهار می‌کند. عنصر پتاسیم یکی از عناصر مهم و اساسی برای رشد و نمو در گیاه است و کمبود جذب آن باعث کاهش رشد از جمله کاهش قطر ساقه می‌گردد (وفادار و همکاران، ۱۳۹۷). Hamidi و همکاران (۲۰۰۶) افزایش قطر ساقه ذرت تحت تاثیر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد را گزارش کردند. برخی پژوهشگران اعتقاد دارند که تأثیر هورمونی القاء شده در گیاه توسط باکتری‌های محرک رشد به طور مستقیم موجب تغییرات مشخص در مورفولوژی ساقه، نظیر افزایش قطر ساقه می‌شود (Amoaghaei و همکاران، ۲۰۰۳).

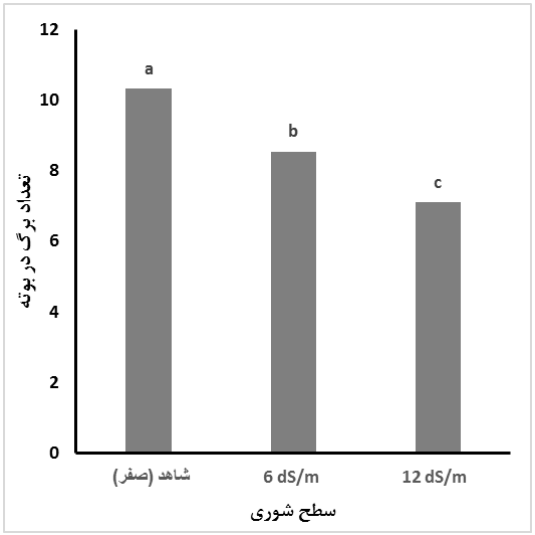
بر اساس جدول ۲، تنش شوری سبب افت معنی‌دار سطح برگ گیاهان سیر شد. تلقیح با باکتری‌های محرک رشد سبب بهبود سطح برگ گردید اما، اختلاف بین آزوسپریلیوم و ازتوباکتر معنی‌دار نگردید (جدول ۲). در گیاهان قرار گرفته تحت تنش شوری، اولاً تقسیم و تولید سلول‌های جدید که لازمه رشد گیاه است کاهش پیدا می‌کند و ثانیاً تحت چنین شرایطی به علت اختلالات متابولیکی درون سلول برخی مواد در دیواره سلولی تجمع می‌یابند که مانع گسترش دیواره سلولی می‌شوند. کاهش سطح برگ در گیاهان تحت تنش شوری را می‌توان به کاهش ساخت پروتئین بر اثر کمبود آب در برگ‌های در حال رشد نسبت داد (Ali و همکاران، ۲۰۰۴). از جمله دلایل افزایش سطح برگ در تیمار تلقیح شده با کود زیستی می‌توان به تولید انواع متابولیت-های موثر در رشد گیاه مانند هورمون‌های محرک رشد به عنوان عوامل افزاینده رشد گیاه و همچنین گسترش سطح ریشه در اثر فعالیت باکتری‌ها و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی توسط ریشه گیاه از نقاط دورتر و عمیق تر از سطح ریشه اشاره کرد (Hamidi, 2006).

جدول ۲- میانگین برخی صفات موفولوژیکی سیر در واکنش به تلقیح باکتری‌های محرک رشد تحت تنش شوری

تیمار	ارتفاع بوته (**cm**)	قطر ساقه (**mm**)	سطح برگ (**cm**)
شوری			
شاهد (صفر)	٦٠/٠٩ **a**	٧/٧٨ **a**	٨١/١١ **a**
٦ dS/m	٥٢/٢٤ **b**	٧/٠٢ **b**	٧٣/٦٧ **b**
١٢ dS/m	٤٥/٦٠ **c**	٦/٩٦ **b**	٦٤/٨٩ **c**
باکتری‌های محرک رشد			
شاهد	٤٩/٦٩ **b**	٧/٠٤ **c**	٧٠/٧٨ **b**
آزوسپریلیوم	٥٣/٩٣ **a**	٧/٤٥ **a**	٧٤/٣٣ **a**
ازتوباکتر	٥٤/٣١ **a**	٧/٢٦ **b**	٧٤/٥٦ **a**

حروف متفاوت در هر ستون نشانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد.

شکل (۲) اثر سطوح مختلف شوری بر تعداد برگ در بوته را نشان می‌دهد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش شوری تعدد برگ در بوته به طور معنی‌داری کاهش یافت. در خاک‌های شور در ابتدا رشد رویشی و توسعه برگ‌ها متأثر می‌شوند. کاهش رشد و نمو گیاهان در خاک‌های شور مربوط به بالا بودن فشار اسمزی ناشی از وجود یون‌های سدیم و کلر می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش قابلیت استفاده از آب موجود برای گیاه می‌شود. در شرایط شور با افزایش غلظت نمک‌ها در محلول غذایی، پتانسیل اسمزی محلول کاهش یافته و به دنبال آن فشار آماس سلول نیز کاهش می‌یابد و این مانع رشد برگ گیاهان می‌شود. از طرفی به دلیل ریزش احتمالی برگ‌ها، مواد پرورده و انرژی کافی برای تولید مجدد برگ‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند. یکی از اثرات مهم افزایش شوری افزایش سرعت پیری برگ می‌باشد و عامل اصلی که باعث پیری برگ می‌شود، کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش شوری است که احتمالاً به دلیل سست شدن اتصال کلروفیل با پروتئین‌های کلروپلاستی در اثر افزایش غلظت یون‌های سمی سدیم و کلر تحت تنش شوری می‌باشد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹).



شکل ۲- اثر سطوح مختلف شوری بر تعداد برگ در بوته سیر

نتیجه‌گیری

بطورکلی تنش شوری دارای دو اثر متفاوت است. در مرحله اول موجب القای تنش اسمزی شده که نتیجه آن کاهش رشد ریشه و برگ به‌دلیل تنش رطوبتی می‌باشد. در صورتی که دوره تنش طولانی‌تر شود گیاهان عدم تعادل یونی (زیاد بود و یا کمبود برخی یون ها) را نیز تجربه می‌کنند که می‌تواند موجب پیری زود هنگام برگ‌ها و کاهش سطح فعال فتوسنتز کننده شود. گیاهان قادر هستند با همزیستی تعدادی از ریز موجودات خاک، علائم تنش را کاهش دهند. این درحالی است که در سال های اخیر، رهیافت‌های جدید کنترل بیولوژیکی با استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاهی جهت حفظ و نگهداشت گیاهان در برابر تنش محیطی از جمله شوری به شدت توسعه پیداکرده است. این پژوهش نشان داد که با افزایش سطح شوری صفات مورفولوژیکی گیاه سیر مانند ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ در بوته و سطح برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. نتایج نشان داد که کاربرد باکتری‌های محرک رشد باعث بهبود صفات مختلف مورفولوژیکی سیر گردید.

منابع

رحیمی، ا.، شمس الدین سعید، م. و اعتمادی، ف. ۱۳۸۹. اثر تنش شوری بر جوانه زنی، رشد رویشی و مقادیر یونی سیاه دانه (*Nigella Sativa* L.). فصلنامه علمی- پژوهشی خشک بوم. ۱: ۳۰-۲۰.

شهرکی، م.، دهمرده، م.، خمری، ع. و اصغرزاده، ا. ۱۳۹۵. اثر باکتری های ازتوباکتر و آزوسپیریلوم و سطوح کود دامی بر ویژگی های کمی و کیفی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). نشریه بوم شناسی کشاورزی. ۸: ۶۹-۵۹.

وفادار، م.، قادری، ح. و وطن خواه، ا. ۱۳۹۷. تأثیر تنش شوری بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و گیاه بنگ دانه (*Hyoscyamus reticulatus* L.). فرآیند و کارکرد گیاهی. ۷: ۹۹-۸۵.

Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M.Y. and Tahir, G.R. 2004. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. International Journal of Environmental Science and Technology, 1, 221-225

Amoaghaei, R., Mostajeran, A. and Emtiazi, G. 2003. Effect of strain and concentration of Azospirillum on the root growth wheat varieties. Journal of Agricultural Science. 33: 222-213.

Chang, P.C. 2007. The use of plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) and an arbuscular mycorrhiza fungus (AMF) to improve plant growth in saline soil for phytoremediation. A thesis presented to the University of Science in Biology, Ontario.Canada. 153p.

FAO STAT. 2012. http://faostat.fao.org./site/340/default. aspx.

Ghaderifar, F., Akbarpour W., Khavari F. and Ehteshamnia A. 2012. Determination of salinity tolerance threshold in six medicinal plants. Journal of Plant Production. 18,15-24.

Grobelak, A., Napora, A. and Kacprzak, M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. Ecological Engineering, 84, 22-28.

Hamidi, A. 2006. The application of bio-fertilizers on yield and forage Agroecolocgic aspects of late corn silage hybrids. PhD thesis of Agriculture, Department of Agriculture, Tarbiat Modarres University, p. 181.

Hamidi, A., Ghalavand, A., Dehghanshoar, M. M., Malakouti, M. j., Asgharzadeh, H., and Chogan, R. 2006. Application of plant growth stimulating bacteria (PGPR) on yield of corn forage. Pajouhesh & sazandegi, 70, 16-22.

Hasni, I., Ben Ahmed, H., Bizid, E., Raies, A., Samson, G. and Zid, E. 2009. Physiological characteristics of salt tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, At University of California, Davis, USA, Volume: Paper 1363.

Rahimzadeh, S.T., Sohrabi, Y., Heydari, G.R., and Pirzad, A.R. 2012. The effect of application of biofertilizers on some morphological characteristic and yield of *Dracocephalum moldavica* L. Iranian Journal of Horticultural Science, 25, 335-343.

Taïbi, Kh., Taïbi, F., Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhodja, M. and Mulet. J.M. 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South African Journal of Botany, 105: 306-312.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria, on some morphological characteristics of garlic under salinity stress

Tavasolee*[1], AR., Ghassemi[2], S., Ghassemi-Golezani[3], K., Farhangi-Abriz[2], S., Bybordi[1], A., Khosravi[4], H.

[1] Assistance Prof., Soil and Water Research Department, East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran

[2] Ph.D. graduate, Department of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[3] Professor, Department of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[4] Assistance Prof, Soil and Water Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Abstract

Salinity is a limiting factor for growth and production. Plant growth-promoting rhizobacteria are a group of plant rhizosphere inhabitant's bacteria which stimulate plant growth and increase host tolerance to environmental stresses using several mechanisms. A greenhouse experiment with factorial arrangements based on randomized complete block design with three replications were conducted in 2018, to evaluate the effect of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on some morphological traits of garlic (*Allium sativum* L.) under salinity stress. Results showed that with increasing salinity, morphological traits such as plant height, stem diameter, number of leaves per plant and leaf area significantly decreased. The use of Azospirilium (RS-168) and Azotobacter chroococcum (A-106) significantly increased plant height, stem diameter and number of leaves per plant. Therefore, in the saline conditions plant growth promoting rhizobacteria could be used to directly increase plant growth by plant promoting mechanisms and indirectly increase soil fertility condition and plant nutrition by increasing soil biological indices.

Keywords: Plant height, Azotobacter, Azospirillum, Leaf area

* Corresponding author, Email: ar.tavasolee@yahoo.ca

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ورمی‌کمپوست و بررسی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها به‌عنوان بسته کود زیستی

فائزه پرستش [۱*]، حسینعلی علیخانی[۲]، حسن اعتصامی[۳] و محمدرضا حسندخت[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران

[۲]استاد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران

[۳]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تهران

[۴]استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران

چکیده

از مهم‌ترین اهداف کشاورزی پایدار کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش کارایی کودهای زیستی است. کاربرد برخی باکتری‌های محرک رشد گیاه سبب افزایش عملکرد گیاه میزبان از طریق فرآیندهایی همچون حل‌کنندگی فسفات، تولید هورمون‌های گیاهی و افزایش مقاومت به تنش‌های غیر زیستی را می‌توان عنوان کرد. مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ورمی‌کمپوست را نشان می‌دهد. این مطالعه به‌منظور جداسازی و بررسی خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های دارای توان حل‌کنندگی فسفات از ورمی‌کمپوست انجام شد و میزان توان حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی، تولید هورمون ایندول استیک اسید و تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از توالی 16S rRNA ، نشان دادند که جدایه شماره ۲۲ با شباهت ۹۹ درصد به گونه Serratia marcescens، جدایه شماره ۳۸ با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه Serratia marcescens، جدایه شماره ۵۷ با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه Bacillus thuringiensis، جدایه شماره ۶۲ با شباهت ۹۹ درصد به گونه Pseudomonas aeruginosa و جدایه شماره ۵۳ با شباهت ۹۸ درصد به گونه Pseudomonas aeruqinosa تعلق دارند.

کلمات کلیدی: باکتری محرک رشد گیاه، Serratia marcescens، Pseudomonas aeruginosa

مقدمه

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر مورد استفاده گیاهان بوده و علی‌رغم مقدار قابل‌توجه آن در خاک تنها بخش کوچکی از آن قابل‌استفاده برای گیاهان می‌باشد، لذا مقدار فسفر قابل‌جذب خاک به‌تنهایی نمی‌تواند نیاز گیاهان زراعی و باغی را تأمین نماید. در اکثر خاک‌های کشاورزی، بخش عمده کودهای فسفرِ مصرف شده در خاک تثبیت می‌شود و منجر به کاهش کارایی فسفر، آلودگی محیط‌زیست و همچنین عدم تعادل عناصر غذایی در خاک می‌گردد. بنابراین استفاده از منابعی که برای محیط‌زیست زیان کمتری داشته باشد و همچنین نیاز غذایی گیاه را برطرف کند اهمیت ویژه‌ای دارد. ورمی‌کمپوست ، یک کود زیستی محرک رشد گیاه است که محصول نهایی فرآیند تجزیه مواد آلی در حضور کرم‌های خاکی کمپوستر بوده که با عبور مداوم مواد آلی از سیستم گوارش کرم، مواد اولیه تجزیه و به‌صورت نسبتاً پایدار تبدیل می‌گردد و به دلیل کاهش سطح آلاینده‌ها، داشتن سطح بالای جمعیت میکروبی و عناصر غذایی، در حال حاضر به‌عنوان یکی از بهترین کودهای زیستی در دنیا شناخته می‌شود (Rashtbari و همکاران ۲۰۱۴، Ravindran و همکاران،۲۰۰۸). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش مصرف کودهای فسفرِه در طی سال‌ها، نه‌تنها عملکرد محصولات زراعی را چندان افزایش نداده بلکه در مواردی سبب بر هم زدن تعادل عناصر غذایی و کاهش محصول نیز شده است. مصرف بی‌رویه کودهای فسفاتِه، علاوه بر هزینه‌های بسیار بالا، اثرات زیان‌بار نیز دارد (Gyaneshwar و همکاران، ۲۰۰۲). از جمله این اثرات می‌توان به مسمومیت ناشی از جذب بیش از حد فسفر معدنی و بالا رفتن غلظت آن در بافت‌های گیاهی و به هم خوردن تعادل عناصر غذایی، کاهش محصول، تجمع بور در گیاه در حدسمی، کاهش جذب مس، غیر متحرک شدن آهن در خاک، ممانعت از جذب آهن توسط ریشه، مختل کردن متابولیسم روی درون گیاه، کاهش میکوریزایی شدن ریشه، آلودگی خاک به کادمیوم، تنزل کیفیت محصول، ازدیاد بار منفی خاک و آلودگی آب‌ها به فسفر و بروز پدیده اوتریفیکاسیون را نام برد (Lu و همکاران، ۲۰۱۶). بااین‌حال نیاز به استفاده زیاد ورمی‌کمپوست برای رسیدن به عملکرد مطلوب و دارا بودن فسفات‌های نامحلول آلی (غیرقابل جذب بودن) از محدودیت‌های کاربرد ورمی‌کمپوست می‌باشند.

*مسئول مکاتبه: faeze.parasetsh@ut.ac.ir

یکی از راه‌های تعدیل محدودیت‌های فوق و افزایش اثربخشی ورمی‌کمپوست، غنی‌سازی آن با باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[1]به‌ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)[2]می‌باشد(Busato و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات، از روش‌های مؤثر برای افزایش فسفر قابل‌جذب، جلوگیری از آلودگی آب و خاک و نیل به هدف کشاورزی پایدار است. باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق اسیدی کردن، کلاته کردن، ترشح پروتون، آزادسازی اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم باعث افزایش فسفر قابل‌جذب می‌شوند. در میان این مکانیسم‌ها، اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم نقش مهمی در سم‌زدایی آلاینده‌ها و فعالیت میکروبی خاک دارند. دیگر متابولیک‌های محرک رشد گیاه که توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول تولید و در خاک ترشح می‌شوند شامل فیتوهورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورها هستند که علاوه بر انحلال فسفات‌های نامحلول و تأمین فسفر موردنیاز گیاه بر رشد و عملکرد محصول اثر می‌گذارند. لذا این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ورمی‌کمپوست و بررسی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها به‌عنوان بسته کود زیستی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری ورمی‌کمپوست

به‌منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی و معدنی، از مرکز تحقیقات ورمی‌کمپوست پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر کرج نمونه ورمی‌کمپوست تازه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند و سپس تا آغاز مراحل جداسازی در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی و تهیه کشت خالص باکتری‌ها از ورمی‌کمپوست

برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها، ابتدا از ورمی‌کمپوست سری‌های رقت تهیه شد و سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر سری رقت به سطح ظروف پتری حاوی آگار مغذی منتقل و توسط میله شیشه‌ای ال-شکل استریل شده، پخش گردید. ظروف پتری با نوار پارافیلم درزگیری و به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد باکتری‌ها، مراحل دستیابی به کلنی تک از جدایه‌ها، به‌صورت تجدید کشت در دو مرحله و در محیط ذکرشده صورت گرفت (Roy و همکاران،۲۰۰۷). سپس جهت نگهداری از جدایه‌های منتخب در طول انجام پروژه، جدایه‌ها در محیط کشت آگار مغذی مورب در داخل لوله‌های آزمایش با درب محکم کشت و با نوار پارافیلم درزگیری و درون یخچال (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

توانایی کیفی انحلال فسفات آلی و معدنی

برای ارزیابی توان انحلال فسفات معدنی، باکتری‌ها بر روی محیط کشت اسپربر که حاوی ۲/۵ گرم فسفات معدنی تری کلسیم فسفات بود، کشت و به مدت ۹ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هم‌چنین به‌منظور ارزیابی توان انحلال فسفات آلی باکتری‌ها بر روی محیط کشت اسپربر حاوی ۲/۵ گرم اینوزیتول هگزا فسفات به‌عنوان منبع فسفات آلی کشت و به مدت چهار روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. توانایی انحلال فسفات بر اساس شاخص انحلال فسفات با استفاده از معادله زیر اندازه‌گیری شد (Premono و همکاران،۱۹۹۲):

$$PSI = \frac{\text{کل قطر منطقه هاله}}{\text{قطر کلنی}}$$

توانایی کمی انحلال فسفات معدنی

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر توان حل‌کنندگی فسفات، جدایه‌ها در محیط کشت اسپربر مایع با سه تکرار کشت شدند. ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع تلقیح شده و نمونه شاهد (بدون تلقیح)، بر روی شیکر انکوباتور و در تاریکی با دمای ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ ساعت قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون‌ها با ۵۰۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله سلول‌های باکتری، ذرات

[1] Plant growth-promoting rhizobacteria
[2] Phosphate Solubilizing Bacteria

معلق و فسفات نامحلول به کمک سانتریفوژ از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در محلول‌رویی به روش وانادات- مولیبدات اندازه‌گیری شد (Sperber، ۱۹۵۸).

بررسی کیفی تولید سیدروفور

آزمون توان کیفی سیدروفور به روش الکساندر و زوبرر (Alexander and Zuberer، ۱۹۹۳) انجام شد. پس از تهیه محیط کشت جامد کروم آزرول اس، جدایه‌ها بر روی محیط به روش نقطه‌گذاری کشت‌شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز درون انکوباتور قرار گرفت. وجود هاله نارنجی در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخصی از توانمندی جدایه در جذب آهن از طریق ترشح سیدروفور در نظر گرفته شد.

توانایی تولید IAA

برای ارزیابی تولید هورمون ایندول استیک اسید از روش گلیک من و دساکس (Glickmann and Dessaux، ۱۹۹۵) استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت رشد داده و سپس، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت محتوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط ال -تریپتوفان منتقل شد و برای مدت ۷۲ ساعت در ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. سوسپانسیون با ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم مولار) مخلوط شد .مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول‌موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها از طریق مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد IAA محاسبه شد.

شناسایی باکتری

به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب ، هر یک از جدایه‌های ذکرشده در پنج میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از روش Edwards و همکاران (۱۹۸۹) و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F با توالی (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) و 1492R با توالی (5′-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3′) انجام شد (Edwards و همکاران ،۱۹۸۹). توالی ژن‌های 16S rRNA بعد از خالص‌سازی محصولات PCR با کیت خالص‌سازی (Promega, Madison, WI, USA) توسط دستگاه توالی یاب شرکت ماکروژن کره جنوبی قرائت شد و تمام توالی‌های حاصل توسط نرم‌افزار (Edit sequence version 5.1) ویرایش شد و نتایج حاصل با توالی‌های ژن 16S rRNA موجود در بانک ژن دیتا بیس NCBI تطبیق داده شد و با دو روش اتصال همسایه و حداکثر احتمال در نرم‌افزار Mega 5 درخت فیلوژنتیکی برای جدایه‌های موجود رسم شد. توالی‌های نوکلئوتیدی که در این تحقیق شناسایی شدند به پایگاه داده‌های GenBank فرستاده و با شماره دسترسی‌های مختلف ثبت شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از جداسازی جدایه‌های باکتری

در این مطالعه، ۶۶ جدایه باکتریایی جداسازی شد. سپس به‌منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از محیط کشت اسپربر جامد استفاده گردید که در نهایت تنها ۱۸ جدایه دارای توان انحلال فسفر معدنی بودند.

نتایج آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که توانایی جدایه‌های مورد بررسی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی در محیط جامد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جدایه ۳۸ نسبت به سایر جدایه‌ها توانایی بیشتری در انحلال فسفات نامحلول معدنی در محیط کشت جامد اسپربر و جدایه ۵۲ کمترین توان را در انحلال فسفات داشت. محدوده‌ی شاخص HD/CD در بین باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ۱/۲۷ تا ۳/۵۴ متغیر بود و میانگین آن ۲/۳۶ به دست آمد (جدول ۲)

جدول ۱ - تجزیه واریانس آزمون نیمه کمی (HD/CD) انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه باکتری	۱۷	۰/۵۲**
خطا	۱۸	۰/۰۱
ضریب تغییرات (٪)	-	۴/۴۴

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین آزمون نیمه کمی (HD/CD) انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

جدایه	HD/CD	جدایه	HD/CD	جدایه	HD/CD
۴۷	۲/۸۱ bc	۶۳	۲/۵۷ def	۱	۲/۵۴ def
۵۲	۱/۲۷ j	۶۴	۱/۸۹ gh	۱۰	۲/۴۵ ef
۵۳	۲/۴۲ f	۶۶	۲/۵۳ def	۱۵	۱/۷۴ h
۵۴	۲/۰۶ g	۳۴	۲/۶۳ cdef	۱۶	۲/۶۳ cde
۵۹	۱/۵ i	۳۸	۳/۵۴ a	۲۲	۲/۹۲ b
۶۲	۱/۹۳ g	۴۰	۲/۴۴ ef	۲۷	۲/۷۰ cd

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. HD/HC= Halo Diameter/Colony Diameter

نتایج آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات‌های نامحلول آلی

نتایج تجزیه واریانس این آزمون نشان داد که توانایی جدایه‌های مورد بررسی در انحلال فسفات‌های نامحلول آلی در محیط جامد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بود (جدول ۳). محدوده‌ی شاخص HD/CD در بین باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی از صفر تا ۵/۸۹ متغیر بود و میانگین آن ۲/۷۳ به دست آمد.

جدول۳- تجزیه واریانس آزمون نیمه کمی (HD/CD) انحلال فسفات‌های نامحلول آلی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	۱۷	۴/۵۳**
خطا	۱۸	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)	-	۲/۹

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد

جدول۴- مقایسه میانگین آزمون نیمه کمی (HD/CD) انحلال فسفات‌های نامحلول آلی توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

جدایه	HD/CD	جدایه	HD/CD	جدایه	HD/CD
۴۷	c۴/۷۱	۱	j۱/۷۴	۶۶	i۱/۹۵
۵۲	hi۲/۰۴	۱۰	e۲/۸۱	۴۰	k۰
۵۳	j۱/۶	۱۵	e۲/۹۱	۶۴	g۲/۲۴
۵۴	i۲/۰۱	۱۶	gh۲/۱۶	۳۸	d۴/۲۷
۵۸	f۲/۳۸	۲۲	a۵/۸۹	۶۳	f۲/۴۱
۶۲	j۱/۶۱	۲۷	b۴/۸	۳۴	fg۲/۳

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. HD/HC= Halo Diameter/Colony Diameter

نتایج آزمون کمی توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی

تجزیه واریانس این آزمون نشان داد که توانایی جدایه‌های مورد بررسی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی در محیط مایع دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۵). طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها تمامی جدایه‌های مورد بررسی در این آزمون قادر به انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی در محیط مایع بودند (جدول ۴-۶). حداکثر میزان انحلال (۳۶۱/۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مربوط به جدایه شماره ۲۲ و حداقل میزان انحلال (۱۵۳/۸۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) متعلق به جدایه شماره ۵۳ بود. Lavania and Nautiyal(۲۰۱۳) با جداسازی باکتری‌های مختلف حل‌کننده فسفات از خاک‌های مناطق جغرافیایی مختلف هند گزارش کردند که بیشترین انحلال فسفر در محیط مایع مربوط به باکتری Serratia marcescens بود که توانست تا ۹۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر در محیط کشت مایع حل نماید.

جدول۵- تجزیه واریانس آزمون کمی انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	۴	۵۵۳۲۳/۴**
خطا	۵	۱۵۳۰/۴۷
ضریب تغییرات (٪)	-	۷/۱

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول۶- مقایسه میانگین آزمون کمی انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

جدایه	میزان انحلال تری کلسیم فسفات (µg/ml)	جدایه	میزان انحلال تری کلسیم فسفات (µg/ml)
۲۲	a۳۶۱/۳۷	۵۷	d۱۸۵/۱۲۵
۳۸	b۲۹۲	۶۲	c۲۳۲/۵
۵۳	d۱۵۳/۸۷		

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

نتایج حاصل از برخی آزمون‌های خصوصیات محرک رشد گیاه جدایه برتر

نتایج نشان دادند که این سویه‌ها دارای توان پایین تولیدIAA[3] می‌باشند (جدول ۷). یکی از راه‌های تأثیر باکتری‌ها بر رشد و نمو گیاهان سنتز فیتورهورمون ایندولی (IAA) است. این هورمون باعث توسعه سیستم جذب توسط ریشه گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی به‌وسیله گیاه می‌شود (Sergeeva و همکاران،۲۰۰۲). همچنین تلقیح دانه‌های کلزا با Pseudomonas GR12-2 که IAA را در سطح پایین تولید می‌کرد، طول ریشه گیاهچه ها را دو تا سه برابر افزایش داد (Gupta و همکاران،۲۰۱۲). همچنین تمامی جدایه‌ها دارای توان تولید سیدروفور بودند. توانایی تولید سیدروفور در تعداد زیادی از ریزجانداران ازجمله باکتری‌ها و قارچ‌ها در شرایط کمبود آهن گزارش‌شده است.

جدول۷- نتایج برخی از آزمون‌های خصوصیات محرک رشد گیاه جدایه‌های برتر در آزمون گرماگذاری

جدایه	خصوصیت	
	تولید سیدروفور	تولید IAA(µg ml-1)
۲۲	+	۱۲/۶۴
۳۸	+	۱۲/۳۳

[3] Indole Acetic Acid

۵۳	+	۱۲/۲۹
۵۷	+	۱۳/۸۲
۶۲	+	۱۳/۰۷

شناسایی جدایه‌های حل‌کننده فسفات آلی و معدنی

نتایج حاصل از توالی ژنی 16S rRNA نشان دادند که جدایه شماره ۲۲ با شباهت ۹۹ درصد به گونه Serratia marcescens، جدایه شماره ۳۸ با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه Serratia marcescens، جدایه شماره ۵۷ با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه Bacillus thuringiensis، جدایه شماره ۶۲ با شباهت ۹۹ درصد به گونه Pseudomonas aeruginos و جدایه شماره ۵۳ با شباهت ۹۸ درصد به گونه Pseudomonas aeruqinosa تعلق دارند.

جدایه‌های مورد آزمایش در پایگاه داده GenBank با شماره ثبت ارائه‌شده در زیر ثبت گردید و درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها در شکل ۱ گزارش‌شده است.

جدایه ۶۲ با شماره ثبت MH177874

جدایه ۵۷ با شماره ثبت MH177875

جدایه ۵۳ با شماره ثبت MH177876

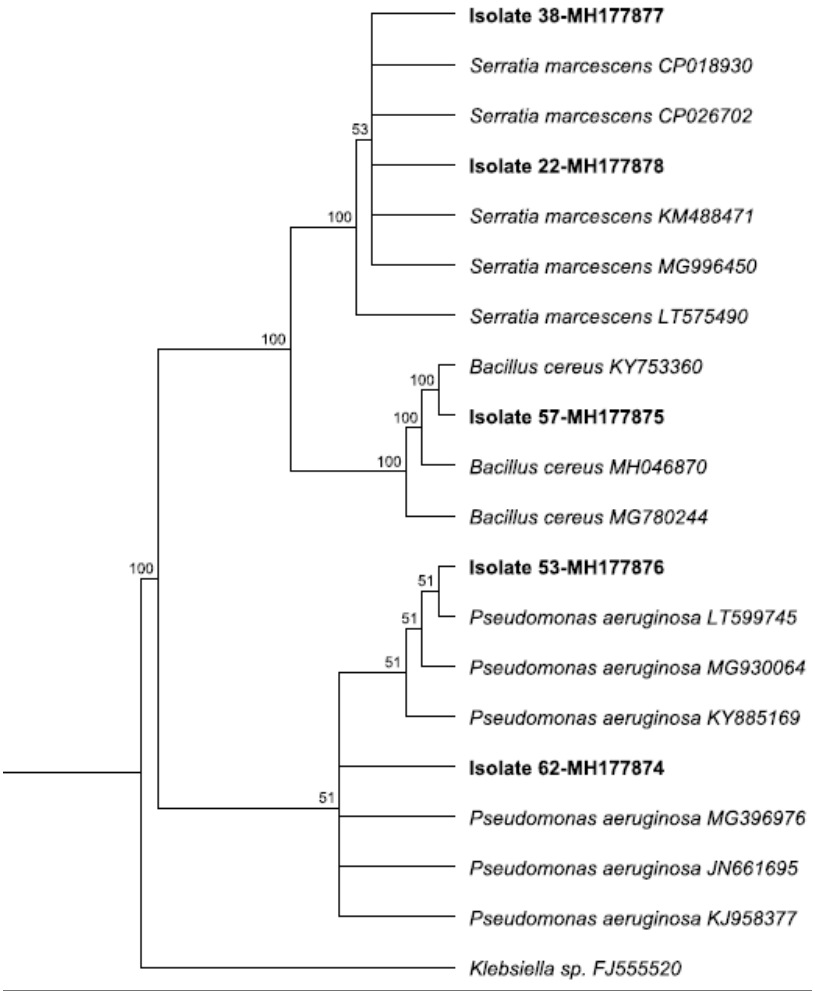
جدایه ۳۸ با شماره ثبت MH177877

جدایه ۲۲ با شماره ثبت MH177878

Gupta و همکاران (۲۰۱۲) با جداسازی Pseudomonas.sp و Serratia marcescens و بررسی توان انحلال فسفات معدنی آن‌ها در محیط حاوی تری کلسیم فسفات (TCP) گزارش کردند که این سویه‌ها توانستند فسفر را از ۲۵ تا ۳۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند جایگزین مناسبی جهت کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفاته باشند و در آینده استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک استراتژی مناسب در جهت مدیریت بهتر ورمی‌کمپوست در خاک‌ها امکان‌پذیر است.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های ۲۲، ۳۸، ۵۳، ۶۲ و ۵۷

منابع

Alexander, D., & Zuberer, D. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. Biology and Fertility of Soils. 16: 2. 118-124.

Busato, J.G., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresour. Technol. 110, 390e395.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research. 17: 19. 7843-7853.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61: 2. 793-796.

Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., & Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis Miller. Microbiological Research. 167: 6. 358-363.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., & Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and soil, 245(1), 83-93.

Lu, H., Feng, Y., Wu, Y., Yang, L., & Shao, H. 2016. Phototrophic periphyton techniques combine phosphorous removal and recovery for sustainable salt-soil zone. Science of the Total Environment. 568, 838-844.

Premono, M. E., Moawad, A., & Vlek, P. 1996. Effect of phosphate-solubilizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian Journal of Crop Science. 11: 1. 13-2.

Rashtbari, M., and Alikhani, H.A. 2014. Effects of Different Enrichment Treatments on Chemical Properties of Vermicompost during Maturation .Bull. Env. Pharmacol. Life Sci, 3 (5):119-124.

Ravindran B, Dinesh SL, John Kennedy L and Sekaran G, 2008. Vermicomposting of Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm Eisenia fetida. Applied Biochemical Biotechnology 151: 480–488.

Roy, S., Suchismita, C., & Mukherjee, S. 2007. Biological control of Phytophthora spp. with a novel indigenous Pseudomonas isolate. Journal of Mycopathological Research. 45: 1. 117-121.

Sergeeva, E., Liaimer, A., & Bergman, B. 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Planta. 215: 2. 229-238.

Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research. 9: 6. 778-781.

Topic for submission: Soli biology and biofertilizer

Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria from Vermicompost and Study of their Plant Growth-promoting Bacteria as a Biofertilizer Package

F. Parastesh[1*], H. Alikhani[2] and H. Etesami[3] M. Hasandokht [4]

[1] M.Sc. Graduate, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

[2] Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj,
Iran

[4] Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran,Karaj,Iran

Abstract

One of the most important goals of sustainable agriculture is to reduce the use of fertilizers and increase the efficiency of biofertilizers. The use of some plant growth-promoting bacteria increases plant crop performance through processes such as phosphate solubilization, production of hormones (Sidrophor and IAA) and increased resistance to non-biological stress. The present study shows the isolation and identification of native vermicompost bacteria. This study was carried out to determine the growth-promoting properties of phosphate-soluble bacteria from vermicompost. The solubility of organic and inorganic phosphates, the production of indole acetic hormone and the production of sidrophore were investigated. Based on the results of the 16S rRNA sequence, it was shown that isolate 22 with 99% similarity of Serratia marcescens, isolate 38 with 100% a similarity of Serratia marcescens, isolate 57 with 100% similarity of Bacillus thuringiensis, isolate 62 with 99% a similarity of Pseudomonas aeruginosa and isolate 53 with 98% similarity fo Pseudomonas aeruqinosa.

Keywords: Plant growth-promoting bacteria, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens,

* Corresponding Authors; Email: feaze.parasetsh@ut.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بکارگیری باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان کود زیستی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی

علیرضا فلاح نصرت‌آباد[۱*]، نعمت‌الله محمودی[۲]، مصطفی آرمنده[۳]

[۱] دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۲] استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

[۳] دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

قابلیت دسترسی زیستی فسفر برای تولیدکنندگان اولیه (فیتوپلانکتون‌ها) در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی عمدتاً به واسطه تشکیل کمپلکس با کاتیون‌ها و مواد آلی به‌شدت کاهش می‌یابد. در این راستا، برای افزایش فسفات محلول در آب منطبق بر اصول کشاورزی پایدار، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات بسیار ضروری است. با این هدف، نمونه‌برداری از رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران انجام شد. جداسازی باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت NBRIP انجام و سپس سویه‌ها با روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. به علاوه، تاثیر تغییرات دما، pH و شوری (منطبق با شرایط محیطی استخرهای پرورشی) بر رشد سویه‌ها بررسی شد. همچنین توانایی موثرترین سویه در آزادسازی فسفات از رسوبات در شرایط آکواریوم مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر، ۶۴ سویه جداسازی شد که از میان آن سویه $Persian_{10}$ (*Pseudomonas deceptionensis*) به‌عنوان موثرترین سویه در آزادسازی فسفر انتخاب شد که قابلیت رشد مطلوبی در شرایط استخرهای پرورشی نیز دارد. به طور کلی نتایج نشان داد که با تلقیح این سویه به درون اکواریم، میزان فسفات محلول آب به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از گروه بدون تلقیح بود. بر اساس نتایج این مطالعه، از سویه $Persian_{10}$ می‌توان به‌عنوان باکتری موثر حل‌کننده فسفات به‌عنوان کودهای زیستی برای استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: فسفر، فیتوپلانکتون، رسوبات، تولیدکنندگان اولیه، آبزی پروری

مقدمه

تغذیه و تولید ماهیان گرمابی شامل ماهی فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix)، سرگنده (Hypophthalmichthys nobilis)، کپور (Cyprinus carpio) و آمور (Ctenopharyngodon idella) در استخرهای خاکی به شکل مستقیم و غیرمستقیم به تولیدات طبیعی استخر وابسته است (Boyd و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین افزایش تولیدات طبیعی (فیتوپلانکتون‌ها و سپس زئوپلانکتون‌ها) در استخرهای پرورشی خاکی برای افزایش تولید ماهی بسیار ضروری می‌باشد. فسفر از مواد مغذی ضروری در کنترل تولیدات اولیه می‌باشد. در مزارع پرورشی ماهی به‌منظور افزایش سطح مواد مغذی محلول در آب (به‌ویژه فسفر) و نهایتاً افزایش تولیدات اولیه و ثانویه از کودهای مختلف شیمیایی و آلی استفاده می‌شود. به‌طور کلی در طول یک دوره پرورش ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ کیلوگرم کودهای شیمیایی و ۱۰ تا ۱۲ تن کودهای حیوانی به ازای هر هکتار بکار می‌رود (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲)، که میزان کاربرد کود شیمیایی فسفاته (به‌ویژه سوپر فسفات تریپل)، ۲۰۰ تا ۴۰۰ کیلوگرم می‌باشد.

با توجه شرایط قلیایی محیط استخرهای ماهیان گرمابی، درصد بسیار زیادی از فسفر به‌صورت ترکیب با کلسیم و منیزیم رسوب کرده و از دسترس خارج می‌گردد. علاوه بر این، در استخرهای پرورشی به‌منظور از بین بردن ارگانیسم‌های بیماری‌زا، تنظیم pH و سیستم بافری آب، آهک‌های مختلفی ($CaCO_3$، CaO و $Ca(OH)_2$) به مقدار زیاد (تقریباً ۳ تا ۵ تن) استفاده می‌شود. همچنین مطالعات گزارش کردند که نیمی از فسفر کودهای فسفاته توسط کلسیم موجود در خود این کود از دسترس خارج می‌گردد. از این‌رو درصد بسیار زیادی از فسفر محلول در آب استخر (حدود ۷۵ تا ۹۰ درصد) از دسترس خارج می‌گردد و این شرایط سبب بازده بسیار پایین کودهای شیمیایی گردیده که موجب مصرف بی‌رویه و مخرب آن‌ها می‌گردد.

* ایمیل نویسنده مسئول: Rezafayah@yahoo.com

این کودها از معادن سنگ فسفات تولید می‌شوند که این معادن همواره دارای عناصر فلزی و سمی نظیر کادمیوم، آرسنیک و سرب به‌عنوان ناخالصی نیز می‌باشند و حذف این ناخالصی‌ها تقریباً غیرممکن است. لذا کاربرد مداوم و زیاد این کودهای فسفره اغلب منجر به تجمع عناصر سمی و آلودگی خاک و آب می‌گردد و ممکن است از طریق زنجیره غذایی به انسان برسد(McLaughlin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Raven و Loeppert، ۱۹۹۷؛ Luo و همکاران، ۲۰۰۹). برای تولید هر تن کود شیمیایی فسفاته، حدود ۵ تن فسفوژیپسوم به عنوان محصول جانبی تولید می‌گردد که خود به‌عنوان یک چالش محیط زیستی بزرگ در صنعت فسفات می‌باشد. به‌علاوه انتشار گازهای گلخانه متاثر از تولید (ناشی از مصرف سوخت فسیلی) و مصرف کودها نیز به‌عنوان یک معضل مهم جهانی مطرح می‌باشد. گزارشات جهانی نیز حاکی کاهش شدید منابع سنگ فسفات طی ۵۰ سال آینده می‌باشد که خود چالشی جدی در مسیر تولید آن‌ها خواهد بود (Nichols و Middleton، ۲۰۰۳). از طرف دیگر، گزارش‌ها نشان می‌دهد که بیش از ۹۰ درصد از کودهای شیمیایی فسفاته مصرفی در ایران، وارداتی بوده که این مساله موجب وابستگی بیشتر و خروج ارز از کشور می‌گردد.

بنابراین با توجه به شرایط محیطی خاص حاکم بر استخرها (وجود حجم زیاد رسوب و ارتفاع زیاد آب روی رسوب، نوسانات اکسیژنی، pH قلیایی و غیره) و مدیریتی ویژه آن‌ها و لزوم رعایت قوانین کشاورزی پایدار لازم است با به‌کارگیری تکنیک‌ها و روش‌های دوستدار محیط زیست، فسفر قابل دسترس در استخرها افزایش یابد.

از مهم‌ترین روش‌های افزایش فسفر قابل دسترس و استفاده بهینه از فسفر انباشته شده در رسوبات استخرها (کمپلکس‌های آلی و معدنی)، استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها با مکانیزم‌های متنوعی از جمله تولید اسیدهای آلی و سنتز آنزیم‌ها، باعث آزادشدن فسفر غیرمحلول (آلی و معدنی نامحلول) به شکل محلول و قابل دسترس می‌گردند (Bianco و Defez، ۲۰۱۰). در بین میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات، باکتری‌ها نقش بسزایی در افزایش فسفات قابل دسترس دارند (Jana، ۲۰۰۷؛ Maitra و همکاران، ۲۰۱۵).

در سال‌های اخیر، در جهان، جداسازی و استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفر به منظور بهبود رشد گیاهان زراعی و باغی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (فلاح نصرت‌آباد و همکاران، ۱۳۸۲؛ فلاح نصرت‌آباد و شریعتی، ۱۳۹۳؛ Fallah Nosratabad و همکاران، ۲۰۱۷). اما استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در حوزه آبزی‌پروری در ابتدای مسیر خود قرار دارد و بیشتر در فاز تحقیقاتی و آزمایشگاهی قرار دارد.

حضور فیتوپلانکتون در حوزه آبزی‌پروری به‌عنوان گونه هدف، با ساختار متفاوت (بدون ریشه و معلق در آب) از گیاهان باغی و زراعی و همچنین رابطه قوی‌تر بین آب و رسوب سبب شده است که این تحقیق نسبت به تحقیقات سایر حوزه‌های کشاورزی کاملاً متمایز باشد. بررسی مطالعات انجام شده نشان داده است که پژوهشی در ارتباط با استفاده از گونه‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان کود زیستی در حوزه آبزی پروری ایران انجام نشده است و از این حیث، این مطالعه به‌عنوان اولین دستآورد پژوهشی در ایران می‌باشد.

مطابق اسناد بالادستی (برنامه پنجم توسعه) باید تا پایان برنامه حداقل ۳۵ درصد از کودهای مصرفی کشاورزی تحت پوشش کودهای زیستی قرار گیرند. بر اساس گزارش اخیر فدراسیون بین المللی جنبش کشاورزی ارگانیک و موسسه تحقیقات کشاورزی ارگانیک در سال ۲۰۱۴، حدود ۴۳/۷ میلیون هکتار اراضی کشاورزی ارگانیک در جهان وجود داشته است (حدود یک درصد از کل اراضی کشاورزی جهان) که بیش‌ترین مقدار آن در اقیانوسیه و کم‌ترین آن در آفریقا می‌باشد. بر اساس گزارش این دو نهاد بین المللی، تنها حدود ۰/۰۸ درصد از کل اراضی کشاورزی ایران زیر کشت محصولات ارگانیک می‌باشد، این در حالی است که در کشورهای پیشرو ۲ تا ۳ درصد سطح زیر کشت آن‌ها به این محصولات اختصاص دارد. از این حیث، ایران در بین ۱۷۲ کشور مورد مطالعه رتبه ۸۴ را دارد. بنابراین کاربرد مکمل زیستی باکتری فسفاتی در مزارع آبزی‌پروری در تحقق اهداف برنامه بالادستی کشور نیز ضروری است.

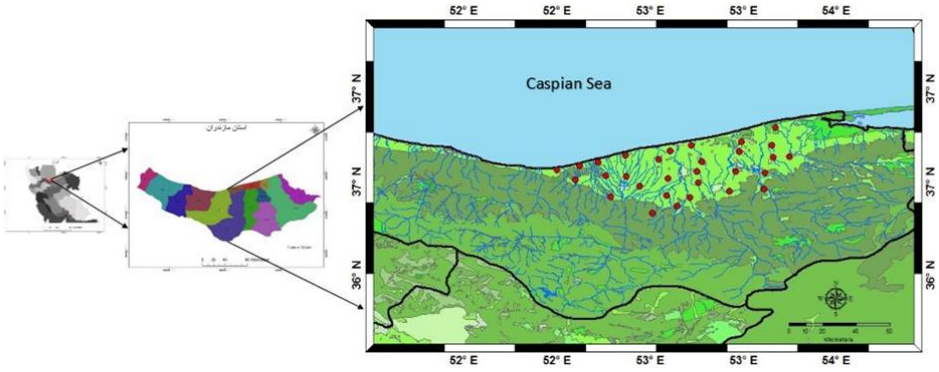
با توجه به پتانسیل بالای تولید ماهیان گرمابی در کشور (حدود ۵۰ درصد از تولیدات آبزی‌پروری کشور) و همچنین مزایای کودهای زیستی (غالباً ارزان قیمت، همگام با طبیعت و پایدار)، استفاده از این نوع کودها می‌تواند برای رسیدن به اهداف آبزی‌پروری پایدار در کشور بسیار مفید باشد. همچنین به نظر می‌رسد با توجه به مساحت بالای زیر کشت ماهیان گرمابی در کشور (تقریباً ۵۰۸۳۵ هکتار) بازار مناسبی برای تولید و فروش کودهای زیستی در حوزه آبزی پرورش وجود داشته باشد.

لذا با توجه به وجود ترکیبات نامحلول ترکیبات کلسیم فسفات (Ca-P) در استخرهای ماهیان گرمابی و شرایط قلیایی استخرها، در مطالعه حاضر تلاش شد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات موثر بر انحلال تری‌کلسیم فسفات (TCP) از رسوبات استخرهای مازندران جداسازی و شناسایی شوند. سپس توانایی این باکتری‌ها در آزادسازی فسفر از TCP در محیط کشت جامد و مایع و مقاومت به شرایط محیطی (دما، شوری و pH) ارزیابی گردد. در نهایت تأثیر موثرترین سویه (توانایی بالای انحلال فسفر و رشد در دامنه وسیعی از پارامترهای محیطی) در شرایط آکواریوم (شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی) بر سطح فسفات محلول آب بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفات

برای نمونه‌برداری از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی‌متری رسوبات کف ۳۰ مزرعه پرورش ماهی در نواحی مرکزی استان مازندران در سال ۱۳۹۵ با توجه به عرض‌ها و طول‌های جغرافیایی یکنواخت از نمونه‌بردار گرب ون‌وین (Hydro-Bios، آلمان) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. نقاط نمونه‌برداری در استان مازندران

برای تهیه یک نمونه واحد، نمونه‌برداری‌های متعددی از نقاط مختلف استخر انجام و سپس با هم مخلوط شدند. نمونه‌های رسوب در درون کیسه‌های پلاستیکی در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. فرآیند جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفر در موسسه تحقیقات خاک و آب کشور انجام شد. با توجه به شرایط مدیریتی استخر (آهک پاشی، کوددهی آلی و معدنی و غذادهی) و شرایط قلیایی pH، ترکیبات کلسیم فسفات به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات معدنی نامحلول فسفر مطرح می‌باشد. از این‌رو، در این مطالعه برای جداسازی و انتخاب باکتری‌های حل‌کننده فسفات از محیط کشت NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات استفاده شد (Hu و همکاران، ۲۰۱۰). به‌منظور جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفر ابتدا ۱۰ گرم از نمونه رسوبات هموژن‌شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب نمک استریل ۰/۸۵ درصد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی تکان دهنده رفت و برگشت قرار داده شد. سپس رقت‌های متوالی تا ۸-۱۰ تهیه و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر در سه تکرار روی محیط کشت جامد NBRIP (pH=۷) پخش شد (جدول ۱) و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگه‌داری شدند. به‌طور کلی به‌منظور جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ویژگی تشکیل هاله در اطراف کلنی استفاده شد (Nautiyal، ۱۹۹۹). همچنین با توجه به خصوصیات و تفاوت‌های مورفولوژیکی کلنی‌ها، کلنی‌های تشکیل-دهنده هاله در محیط کشت جامد NBRIP با استفاده از لوپ آزمایشگاهی استریل برداشت و در محیط کشت عمومی نوترینت آگار خالص‌سازی شدند.

جدول ۱. ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت NBRIP

ماده شیمیایی	مقدار ($g.L^{-1}$)
$MgCl_2$	۵
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۵
KCl	۰/۲
$(NH_4)_2SO_4$	۰/۲
$Ca_3(PO_4)_2$	۵
گلوکز	۱۰
آگار	۱۵

پس از خالص‌سازی سویه‌ها برای مقایسه توانایی انحلال فسفر سویه‌های جداشده از شاخص حل‌کنندگی در محیط کشت NBRIP جامد حاوی تری-کلسیم فسفات (منبع فسفات معدنی نامحلول) و همچنین میزان رهاسازی فسفات در محیط کشت محیط کشت NBRIP مایع استفاده شد. در این راستا برای مقایسه توانایی حل‌کنندگی سویه‌ها در محیط کشت جامد ابتدا به‌منظور یکسان‌سازی جمعیت سویه‌ها هر یک از سویه‌های باکتریایی در محیط کشت نوترینت براث (مایع) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط کشت (مایع) در محیط کشت جامد به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ تا ۳۰ سانتی‌گراد به‌صورت نقطه‌ای کشت داده شد (سه تکرار). در نهایت موثرترین سویه‌ها بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی به عنوان شاخص حل‌کنندگی (رابطه ۱) شناسایی شد (Nautiyal, 1999). بر اساس این شاخص جدایه‌ای که نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیشتری داشته باشد، قدرت حل‌کنندگی بالاتری خواهد داشت.

رابطه ۱ قطر کلنی/ قطر هاله = شاخص حل‌کنندگی

به‌منظور اندازه‌گیری کمی فسفات حل‌شده توسط سویه‌های باکتریایی از محیط کشت مایع NBRIP به روش Mehta و Nautiyal (۲۰۰۱) استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی (جمعیت ۱۰۸×۲-۱) از ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت NBRIP منتقل شد. ارلن‌ها (حاوی محیط کشت) به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور تکان-دهنده رفت و برگشت (انکوباتور شیکردار) نگه‌داری شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و فسفات محلول‌رویی با روش مولیبدات آبی اندازه‌گیری گردید (Mehta and Nautiyal, 2001). جمعیت باکتری‌ها با استفاده از روش شمارش درون پلیت شمارش شد. به‌منظور بررسی اثر اتوکلاو بر مقادیر فسفات‌های محلول در محیط‌های کشت، مقدار فسفات محلول در محیط کشت بدون باکتری (گروه کنترل) اندازه‌گیری شد.

شناسایی مولکولی موثرترین سویه حل‌کننده فسفات

به‌منظور شناسایی مولکولی سویه‌های موثر با استفاده از روش توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA ابتدا برای استخراج ماده ژنتیکی (DNA) از کیت استخراج ژنوم باکتریایی (سیناپیور، سیناژن، ایران) استفاده شد. به‌منظور تکثیر ژن مورد نظر از آغازگرهای عمومی رفت ۲۷F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و برگشت ۱۴۹۲R (GGTTACCTTGTTACGACTT)، دئوکسی ریبونوکلئوتیدهای سه فسفاته (DNTPs)، منیزیم کلراید (MgCl2)، DNA تک پلیمراز و DNA استخراج شده استفاده گردید (جدول ۳-۴). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد (Weisburg و همکاران، ۱۹۹۱). برنامه PCR دارای ۳۰ چرخه به‌صورت چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت‌شدن ابتدایی) به مدت ۴ دقیقه، در پی آن دمای واسرشت‌شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (دمای جفت‌شدن) و دمای طویل‌شدن ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در پایان نیز یک چرخه اضافی (طویل‌شدن

نهایی) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد SimplySafe (جایگزین اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی اسیدهای نوکلئیک) منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعه تکثیر شده جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر[1]کره جنوبی ارسال شد. تعلق توالی‌های بدست آمده با استفاده از ابزار بلاست[2](مقایسه توالی مورد نظر با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر دارد) انجام و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد. به‌منظور انجام عمل بلاست از کانتیگ[3](توالی پیوسته‌ای از DNA که از کنار هم‌گذاری توالی‌های رفت[4]و برگشت[5]ساخته می‌شود) ساخته‌شده توسط نرم‌افزار ContigExpress 11.5.3 استفاده شد. توالی سویه شناسایی‌شده در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت و شماره دسترسی سویه‌ها دریافت شد و از طریق پایگاه الکترونیک این بانک قابل دستیابی می‌باشند.

انتخاب موثرترین سویه (از بین ۱۱ سویه‌ی شناسایی‌شده) بر اساس توانایی انحلال در محیط کشت مایع و توانایی رشد و تکثیر در شرایط محیطی مختلف (دما، pH و شوری)

به‌منظور انتخاب موثرترین سویه (بین سویه‌های شناسایی‌شده به روش مولکولی) از معیار میزان فسفات محلول در محیط کشت مایع و توانایی رشد و تکثیر در شرایط محیطی مختلف از جمله تغییرات دما، pH و شوری استفاده شد.

با توجه به اینکه دما، pH و همچنین شوری در مزارع پرورش ماهیان گرمابی در طول روز، فصول و همچنین در مناطق مختلف متفاوت است، سویه‌های جداسازی‌شده برای اینکه بتوانند حداکثر کارآیی را داشته باشند، باید در دامنه‌ی وسیعی از پارامترهای محیطی قابلیت رشد و تکثیر داشته باشند. از این‌رو، در آزمایشگاه تاثیر سطوح مختلف دما، pH و شوری (متناسب با دوره پرورش ماهیان گرمابی در استان مازندران) بر توانایی رشد و تکثیر و زنده-مانی سویه‌های مختلف ارزیابی شد. ارزیابی اثر دما در سطوح ۴، ۱۸، ۲۶ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

با توجه به اینکه شوری آب در استخرها طی نمونه‌برداری در مناطق مختلف بین ۰ تا ۶ گرم بر لیتر متغیر بود (سنجش‌شده توسط شوری‌سنج چشمی). از این‌رو، تست شوری در سطوح ۰، ۱/۵، ۳، ۵ و ۱۰ گرم در لیتر (کلرید سدیم) بر رشد و زنده‌مانی سویه‌ها انجام شد.

به‌علاوه به‌دلیل فعالیت‌های عمده بیولوژیکی موجود در استخر (فتوسنتز و تنفس) تغییرات pH محسوسی در طول شبانه روز وجود دارد. بنابراین تست pH در سطوح ۶/۴، ۷/۴، ۸/۴ و ۹/۴ انجام گرفت. برای ارزیابی اثر پارامترهای محیطی ذکر شده، از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های مورد نظر (با نسبت ۱ درصد) (جمعیت ۱۰۷×۲-۱) به ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث استفاده شد. سپس جمعیت باکتری‌ها با روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) پس از ۲۴ ساعت تخمین زده شد (Koch، ۱۹۷۰). به‌طور کلی، در روش کدورت‌سنجی، رشد و تراکم باکتری‌ها با استفاده از کدورت محیط (OD) تعیین می‌گردد. در واقع هر چه کدورت محیط بیشتر باشد، رشد و تکثیر و در نتیجه تراکم بیشتر است.

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر در شرایط آکواریوم

پرتودهی رسوبات و تعیین دوز بهینه استریل

برای بررسی اثر باکتری در آزادسازی فسفات در شرایط آکواریوم ابتدا رسوبات استریل شد. در این مطالعه برای استریلاسیون رسوبات از پرتو گاما به دلیل اثرات قوی‌تر بر حذف میکروارگانیسم‌های خاک و همچنین اثرات کمتر بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک نسبت به سایر روش‌ها (اتوکلاو، گرمادهی خشک، مواد و گازهای شیمیایی و غیره) استفاده شد (McNamara و همکاران، ۲۰۰۳).

[1] Bioneer
[2] Blast
[3] Contig
[4] Forward
[5] Reverse

برای تعیین دز بهینه استریل پرتو گاما، نمونه‌هایی از رسوبات بستر استخر پرورش ماهیان گرمابی جمع‌آوری و در مخزنی به‌صورت فیزیکی مخلوط شدند. به‌منظور جلوگیری از آلوده شدن رسوبات پس از پرتودهی، نمونه‌های رسوبات قبل از پرتودهی، به‌طور کامل بسته‌بندی[1] و سپس درون دستگاه گاما سل کبالت۶۰[2] تحت پرتو گاما با دوزهای ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۹۰ کیلوگری[3] (یک گری عبارت است از مقدار انرژی جذب شده بر حسب ژول در یک کیلوگرم ماده) قرار داده شد. پس از پرتودهی، نمونه‌ها به بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک ایران منتقل و سپس جمعیت میکروارگانیسم‌ها در طول ۲ هفته انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفت.

پس از شمارش میکروارگانیسم‌ها در رسوبات پرتودهی‌شده با دوزهای مختلف، دوز بهینه استریل رسوبات تعیین شد. در نهایت، حجم رسوبات مورد نیاز برای انجام آزمایش در شرایط آکواریوم به مرکز تحقیقات پرتو گاما سازمان انرژی اتمی ایران منتقل و فرآیند استریلاسیون انجام شد.

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفات در آزادسازی فسفات از رسوبات

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر در بخش آبزی‌پروری دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس انجام گردید. در شروع آزمایش ابتدا رسوبات به مرکز تحقیقات پرتو گاما سازمان انرژی اتمی ایران منتقل شد تا تحت دوز ۵۵ کیلوگری پرتو گاما استریل شود. برای اطمینان از عدم آلودگی احتمالی رسوبات طی انتقال آن‌ها به بخش آبزی‌پروری مجدداً رسوبات مورد ارزیابی میکروبی در محیط کشت‌های مختلف قرار گرفت. رسوبات استریل‌شده به ارتفاع ۳ سانتی‌متر در کف مخازن و نمونه‌های آب نیز به ارتفاع تقریبی ۱۴ سانتی‌متر (۱۰ لیتر) به آکواریوم-هایی به ابعاد ۲۵×۳۰×۳۰ سانتی‌متر در سه تکرار اضافه شد.

به‌منظور ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر، سویه مذکور در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28 تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور تکان‌دهنده رفت و برگشت (شیکر انکوباتور) کشت داده شد و سپس برای ایجاد تراکم ۱۰۲ در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (استریل‌شده تحت پرتو گاما) طی ۵ روز متوالی (یکبار در روز در ساعتی مشخص) در سه تکرار به درون آکواریوم‌ها تلقیح شد. از آنجایی‌که انحلال فسفر تحت تاثیر همزمان عوامل زیستی و فیزیکو-شیمیایی می‌باشد. به‌منظور جداکردن اثر عوامل فیزیکو-شیمیایی از عامل زیستی (باکتری) از گروه بدون تلقیح به‌عنوان گروه کنترل (بررسی اثر عوامل فیزیکو-شیمیایی) استفاده شد. این آزمایش به مدت ۴ هفته انجام شد و تراکم باکتری، فسفات محلول، آنزیم فسفاتاز و غلظت فرم‌های مختلف فسفر در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۹، ۱۶، ۲۳ روز بعد از آخرین تلقیح سنجش شدند. در این تحقیق با توجه به میزان بالای فسفر انباشته شده در رسوبات، تنها اثر باکتری بر آزادسازی فسفات از منابع فسفات ذخیره شده در رسوبات بررسی شد و مواد دیگری نظیر کود و غیره افزوده نشد. دما در طول دوره آزمایش ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد حفظ شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور مقایسه اثر موثرترین سویه حل‌کننده فسفر بر میزان فسفات محلول آب در روزهای مختلف از تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measure ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه سطح فسفات محلول آب در روزهای مختلف در دو گروه تیمار و شاهد از آزمون t غیرجفتی (Independent sample t-TEST) استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) به‌ترتیب برای تحلیل آماری و آنالیز توصیفی استفاده شد.

[1] Sealed
[2] Gamma cell Co60
[3] Kilo gray

نتایج و بحث

در مجموع، ۶۴ سویه باکتری حل‌کننده فسفر با استفاده از محیط کشت اختصاصی جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات (TCP) جداسازی گردید. در مطالعه حاضر بر اساس شاخص حل‌کنندگی (نسبت قطر هاله به قطر کلنی) در محیط کشت جامد، ۱۱ سویه موثر حل‌کننده فسفر انتخاب و سپس با روش توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA شناسایی مولکولی شدند. به‌منظور انتخاب موثرترین سویه از بین ۱۱ سویه، توانایی آن‌ها در انحلال TCP در محیط کشت مایع و همچنین قابلیت رشد و تکثیر آن‌ها در دامنه‌ی پارامترهای محیطی شامل دما، pH و شوری استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه Persian10 علاوه بر داشتن توانایی بالا در انحلال TCP با کارایی انحلال ۳/۵۱ در محیط کشت جامد و ۸۰/۵۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط مایع، دارای توانایی رشد و تکثیر مطلوبی در شرایط محیطی (دما، pH و شوری) استخرهای پرورشی استان مازندران نیز می‌باشد.

به‌علاوه توانایی سویه Persian10 در آزادسازی فسفات از رسوبات در شرایط آکواریوم نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فسفات محلول در آب مربوط به روزهای ۹، ۱۶ و ۲۳ بود. نتایج تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که در گروه تیمار میزان فسفات محلول آب در روزهای بعد از تلقیح به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از زمان قبل از تلقیح بود. اما در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری در بین روزها مشاهده نشد (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲. نتایج مقایسه سطح فسفات محلول آب در روزهای مختلف در گروه تیمار (تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر)

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	آزمون F	*P* value
گروه تیمار	۱/۵۰۷	۱/۹۱۷	۱۱۶۸۱/۸۴	<۰/۰۵
گروه شاهد	۱/۸۵۹	۰/۰۰۷	۶/۸۲۴	>۰/۰۵



شکل ۲. مقایسه سطح فسفات محلول آب در دو گروه تیمار و کنترل در روزهای مختلف (حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین میانگین داده‌ها در روزهای مختلف در گروه تیمار می‌باشد (سویه‌ی $Persian_{10}$ در ۵ روز متوالی به اکواریوم‌ها اضافه شد).

به‌علاوه نتایج آزمون t غیرجفتی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار و کنترل در میزان فسفات محلول در آب در روزهای بعد از تلقیح وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین فسفات محلول آب بین گروه تیمار و کنترل در روزهای مختلف با استفاده از آزمون t غیرجفتی

متغیر	زمان	تیمار	کنترل	*P* value
		$\bar{x}$ ±SD	$\bar{x}$ ±SD	
فسفر محلول	روز ۰	۰/۰۱۹۳±۰/۰۰۵	۰/۰۲۶±۰/۰۱۲	*۰/۴۳
	روز ۲	۰/۱۰۴±۰/۰۰۹	۰/۰۵۶±۰/۰۱۷	**۰/۰۱
	روز ۹	۰/۱۷۶±۰/۰۰۹	۰/۰۸۸±۰/۰۰۹	**۰/۰۰
	روز ۱۶	۰/۱۷۱±۰/۰۱	۰/۰۷۵±۰/۰۱۲	**۰/۰۰
	روز ۲۳	۰/۱۹۷±۰/۰۱۲	۰/۰۵۲±۰/۰۱۹	**۰/۰۰

* عدم تفاوت معنی‌دار بین دو گروه، ** تفاوت معنی‌دار بین دو گروه

بحث

در میان شاخصه‌های مختلف کیفیت آب، درجه حرارت، pH و شوری از جمله مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر رشد و تکثیر باکتری در محیط می‌باشند. بسیاری از محققان در بخش کشاورزی توجه بسیار زیادی به این موضوع داشته‌اند. در این راستا، مطالعه Johri و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که از میان ۸۵۷ جدایه حل‌کننده فسفر صرفاً ۱۸ مورد از آن‌ها توانایی رشد و تکثیر و انحلال مطلوب فسفر در محدوده وسیعی از درجه حرارت، pH و شوری داشتند. به‌علاوه مطالعات دیگری از جمله Son و همکاران (۲۰۰۶) و Malboobi و همکاران (۲۰۰۹) نیز این موضوع را بسیار حائز اهمیت دانستند. بر این اساس نتایج این مطالعه نشان داد که شرایط محیطی نظیر درجه حرارت، pH و شوری در مزارع پرورش ماهیان گرمابی مازندران طی دوره پرورش به‌ترتیب ۳۴-۱۸ درجه سانتی‌گراد، ۸/۷-۷/۲ و ۶-۰ گرم بر لیتر در نوسان بود. از این‌رو در مطالعه حاضر پس از ارزیابی قدرت حل‌کنندگی فسفر در محیط مایع، برای انتخاب موثرترین سویه، اثر پارامترهای محیطی (دما، pH و شوری) روی آن‌ها نیز بررسی شد.

در مطالعه حاضر با در نظرگرفتن برآیند معیارهای مختلف از جمله قدرت انحلال فسفر و توانایی رشد در شرایط محیطی مختلف، سویه Persian10 (P. deceptionenesis) به‌عنوان موثرترین سویه حل‌کننده فسفر از بین ۱۱ سویه موثر انتخاب شد. عواملی از قبیل توانایی مطلوب در انحلال فسفر، رشد و تکثیر بهینه در دماهای مختلف به‌ویژه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رشد و تکثیر مطلوب در pH های مختلف به‌ویژه در pH های بالاتر از ۸، در انتخاب این سویه به‌عنوان موثرترین سویه تاثیرگذار بود. زنده‌مانی و رشد این سویه در دمای پایین‌تر از ۱۸ تا ۴ درجه سانتی‌گراد می‌تواند در توانایی تثبیت این سویه در رسوبات استخرهای ماهیان گرمابی مفید باشد. این خصوصیت موجب بالابردن اطمینان از عملکرد مطلوب این سویه در استخرهای نزدیک مناطق کوهستانی می‌گردد. به‌علاوه استفاده از این سویه ماندگاری و اثر بخشی کود زیستی را در استخر در طول سال نیز تضمین می‌کند.

عملکرد سویه Persian10 در شرایط آکواریوم

به‌طور کلی تلقیح سویه Persian10 (P.deceptionensis) موجب افزایش معنی‌داری در میزان فسفات محلول آب در زمان‌های بعد از تلقیح (۲، ۹، ۱۶ و ۲۳) شده است. به‌علاوه میزان فسفات محلول در آب بین گروه تیمار (تغییرات بر اساس واکنش‌های زیستی-شیمیایی) و گروه کنترل (تغییرات بر اساس واکنش‌های شیمیایی) در زمان‌های مختلف (۲، ۹، ۱۶ و ۲۳ روز بعد از تلقیح) نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با توجه به نتایج این تحقیق در شرایط آکواریوم به‌نظر می‌رسد بخش زیادی از تغییرات میزان فسفات محلول در روزهای مختلف ناشی از اثر باکتری‌ها بر روی کمپلکس-های معدنی و آلی فسفر باشد.

افزایش میزان فسفات محلول آب ۲ روز بعد از آخرین تلقیح می‌تواند ناشی از اثر اسیدهای آلی ترشح شده توسط باکتری‌ها و به تبع آن آزادشدن فسفات از ترکیباتی Ca-P نظیر کلسیم فسفات آمورفوس (جسم جامد غیرکریستالی که بدون شکل و فرم است) (Ca9(PO4)6.nH2O) و مونوکلسیم فسفات (CaHPO4) که دارای حلالیت بالاتری نسبت به سایر ترکیبات Ca-P می‌باشند (Alvarez و همکاران، ۲۰۰۴).

در مجموع در زمینه عوامل موثر بر نوع و میزان اسیدهای آلی آزادشده در سویه‌های مختلف و همچنین در شرایط مختلف (منابع مختلف کربن و ازت) نیاز به مطالعات گسترده‌تری می‌باشد. همچنین در نظرگرفتن پویایی و نرخ اثر باکتری‌ها، نرخ تولید اسیدهای آلی و نرخ تولید کمپلکس‌ها و آنزیم‌ها و همچنین نرخ اثر واکنش‌های شیمیایی در یک محیط پرورشی برای تحلیل هر چه بهتر فرآیند رسوب و انحلال فسفات محلول بسیار حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی بر اساس نتایج این مطالعه، سویه Persian10 می‌تواند به‌عنوان باکتری موثر حل‌کننده فسفات در قالب کود زیستی فسفره در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

پورغلام، ر.، نصراله‌زاده‌ساروی، ح.، سعیدی، ع.ا.، مخلوق، آ.، واحدی، ف.، رستمیان، م.ت.، (۱۳۹۲). بررسی فاکتورهای زیستی و غیر زیستی استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی غنی شده با کود شیمیایی و شیرابه کود گاوی در استان مازندران. مجله توسعه آبزی پروری، ۷ (۳): ۱۱-۲۲.

فلاح نصرت‌آباد ع.ر.، شریعتی ش.، (۱۳۹۳). بررسی تاثیر باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس در عملکرد گندم و جذب عناصر غذایی و مقایسه آن با کود شیمیایی و آلی، نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۸ (۵): ۹۷۶-۹۸۶.

فلاح نصرت‌آباد ع.ر.، رحیمیان ح.، صالح‌راستین ن.، ملکوتی م.ج.، (۱۳۸۲). بررسی پراکنش ریزجانداران حل‌کننده فسفر در خاک‌های استان گیلان، نشریه خاک و آب، ۱۷ (۲): ۱۶۲-۱۷۶.

Bianco, C., and Defez, R., (2010). Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of Sinorhizobium meliloti. Applied and environmental microbiology, 76 (14): 4626-4632.

Boyd, C. E., Wood, C. W., and Thunjai, T., (2002). Aquaculture pond bottom soil quality management. Pond Dynamics /Aquaculture Collaborative Research Support Program, Oregon State University.

Fallah Nosratabad, A, R., Etesami, H., Shariati, Sh., (2017). Intergated use of organic fertilizer and bacterial inoculants improves phosphorus use efficiency in wheat fertilized with triple superphosphate. Rhizosphere, 3 (2017): 109-111.

Hu, X. J., Li, Z. J., Cao, Y. C., Zhang, J., Gong, Y. X., and Yang, Y. F., (2010). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium Pantoeastewartii subsp. stewartii g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. Aquaculture international, 18 (6): 1079-1091.

Jana, B. B., (2007). Distribution pattern and role of phosphate solubilizing bacteria in the enhancement of fertilizer value of rock phosphate in aquaculture ponds: state-of-the-art. In First international meeting on microbial phosphate solubilization (pp. 229-238). Springer Netherlands.

Johri, J. K., Surange, S., and Nautiyal, C. S., (1999). Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. Current Microbiology, 39 (2): 89-93.

Luo, L., Ma, Y., Zhang, S., Wei, D., and Zhu, Y. G., (2009). An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. Journal of Environmental Management, 90 (8): 2524-2530.

Maitra, N., Manna, S. K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C., Sharma A.P., (2015). Ecological Significance and Phosphorus Release Potential of Phosphate Solubilizing Bacteria in Freshwater Ecosystems. Hydrobiologia, 745(1): 69-83.

Mclaughlin, M. J., Tiller, K. G., Naidu, R., and Stevens, D. P., (1996). The behaviour and environmental impact of contaminants in fertilizers. Soil Research, 34 (1): 1-54.

Nautiyal, C. S., (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS microbiology Letters, 170 (1): 265-270.

Nichols, G., Middleton, G. V., (2003). Encyclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks. Geological Magazine, 141 (6): 742-743

Raven, K. P., and Loeppert, R. H., (1997). Trace element composition of fertilizers and soil amendments. Journal of Environmental Quality, 26 (2): 551-557.

Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., and Heo, M. S., (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant Pantoea agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource technology, 97 (2): 204-210.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Application of phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer in warm-water fish ponds

Ali Reza Fallah Nosratabad [1], Nemat Mahmoudi[2*], Mostafa Armandeh[3]

[1] Associate Professor in Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

[2] Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

[3] Ph.D Student in Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

Abstract

The bio-availability of phosphorus for primary producers is reduced mainly due to the formation of complex with cations and organic matter in warm-water fish ponds. Therefore, the most important new approaches for increasing water- soluble phosphate that are consistent with the principles of sustainable agriculture are the use of phosphate solubilizing bacteria (PSB). For this purpose, sampling of the sediment of warm-water fish ponds in Mazandaran province was carried out. Isolation and identification of bacteria were performed using by National Botanical Research Institute (NBRIP) medium and 16s rRNA gene sequence. The ability of strains to grow in the range of environmental parameters of warm-water fish ponds was also evaluated. In the present study, a total of 64 PSB strains were isolated, among these, one strongest PSB was including *Pseudomonas deceptionensis* (Persian10) had the best performance in solubilizing insoluble phosphates. The results showed that these strains have a high ability to dissolve insoluble phosphate compounds and grow well under the environmental parameter of warm-water fish ponds. The results showed that the amount of water soluble phosphate was significantly (P <0.05) higher than that of the non-inoculated group. Based on the results of this study, Persian10 strain can be used as an effective phosphate solubilizing bacterium as a biofertilizer for warm-water fish ponds.

Keywords: Phosphorus, Phytoplankton, Sediments, Primary producers, Aquaculture

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

ارزیابی آزمایشگاهی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های محرک رشد و کلنیزاسیون ریشه گندم توسط آنها

اسماعیل کریمی*[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، محمد رضا نیشابوری[۲]، سید بهمن موسوی[۱] ، عزت اله اسفندیاری[۳] و میکا تاراکا[۴]

[۱*]اعضای هیات علمی گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه مراغه

[۲]اعضای هیات علمی گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تبریز

[۳]عضو هیات علمی گروه مهندسی تولید و به نژادی، دانشگاه مراغه

[۴]عضو هیات علمی موسسه تحقیقات هلمهولتز آلمان، بخش تحقیقات اکولوژیک

چکیده

تشکیل بیوفیلم توانایی باکتریهای محرک رشد را در برابر شرایط نامساعد محیطی افزایش داده و توانایی آنها را در کلنیزاسیون ریشه گیاه افزایش می‌دهد. از آنجایی که بررسی باکتریهای محرک رشد با هدف تولید کودهای بیولوژیک صورت می‌گیرد و موفقیت مایه تلقیح حاصل از آنها علاوه بر غلبه بر شرایط نامساعد محیطی در خاک به برتری رقابتی در خاک و توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه بستگی دارد، لذا از این جنبه توانایی تشکیل بیوفیلم بسیار مهم تلقی می‌شود. به این منظور تعدادی جدایه از ریزوسفر گیاهان گرامینه جمع‌آوری گردیده و پس از ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم، توانایی کلنیزاسیون ریشه گندم توسط باکتری‌های منتخب با میکروسکوپ کونفوکال مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند، توانایی مطلوب‌تری نیز در کلنیزاسیون ریشه گیاه از خود نشان دادند، از این‌رو به نظر می‌رسد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به عنوان یک معیار گزینشی در انتخاب سویه‌های باکتریهای محرک رشد با توانایی کلنیزاسیون بالا سودمند باشد. همچنین میکروسکوپ کونفوکال می‌تواند روند کلنیزاسیون باکتریایی روی ریشه گیاه را به خوبی نشان دهد.

کلمات کلیدی: باسیلوس، محلول هوگلند، کریستال ویوله، ریشه‌ی گندم

مقدمه

اگر چه به کارگیری کودهای زیستی، با قابلیت بهبود رشد گیاه از طریق عرضه مواد مغذی گیاهی به شیوه¬ای سازگار با محیط زیست در پاسخ به نگرانی‌های عمومی در مورد مخاطرات ناشی از مصرف نهاده‌های شیمیایی برای بهبود عملکرد محصولات کشاورزی، در کانون توجه متخصصان کشاورزی قرار گرفته است (O'Connell, 1992) ولی عدم سازگاری و موفقیت در کاربردهای مزرعه‌ای استفاده‌ی گسترده از آن را محدود کرده است. ناتوانی و عدم موفقیت مایه تلقیح در رقابت با میکروفلور بومی و استقرار در ریزوسفر گیاه میزبان از عوامل مهم و احتمالی این ناکامی محسوب می‌گردند (Bent and Chanway, 1998). تلاش‌هایی در این زمینه در حال انجام است تا بتوان مایه تلقیح‌هایی روانه بازار کرد که از پتانسیل کلنیزاسیونی خوبی برخوردار باشند، در این راستا باکتریهای محرک رشد که توانایی تشکیل بیوفیلم را داشته باشند مورد استقبال قرار گرفته‌اند. بیوفیلم یک ویژگی ژنتیکی بوده و زمانی تشکیل می‌شود که عده زیادی از باکتریها در مواد پلیمری خارج سلولی که خودشان ترشح می‌کنند، گیر می‌افتند و زندگی اجتماعی آنها شکل می‌گیرد. این توانایی در باکتریهای محرک رشد گیاه صفتی مطلوب به شمار می‌رود، چرا که باکتری را در برابر آسیبها توانمند نموده، پتانسیل کلنیزاسیون ریشه گیاه را افزایش داده و باعث تشدید اثرات محرک رشدی آنها در قیاس با همنوعان فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم می‌گردد. با معرفی مایه تلقیح‌های باکتریایی در شکل بیوفیلمی و در نتیجه حفاظت در برابر شرایط نامطلوب زیست محیطی مانند شوری بالا، غلظت تانن، pH پایین، وجود فلزات سنگین، شکار توسط کرم‌های خاکی، رقابت با جمعیت بومی خاک و مقاومت در برابر چرای پروتوزوا می‌توان به موفقیت کاربرد مایه تلقیح‌های میکروبی امیدوار بود(Seneviratne و همکاران ۲۰۰۸). با این نگرش مزیت استفاده از PGPR بیوفیلمی نسبت به PGPR انفرادی بخوبی قابل توصیف است چرا که تشکیل بیوفیلم، یک مزیت اضافی برای PGPR در کلنیزاسیون موثر در سطح یا داخل ریشه گیاه بوده و آنها می‌توانند به خوبی با فلور بومی رقابت کنند. Timmusk و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که پنی‌باسیلوس پلی‌میکسا در اطراف نوک ریشه گیاه بیوفیلم تشکیل داده و به‌عنوان باکتری مهاجم ریشه در فعالیت‌های کنترل زیستی و افزایش تحمل به خشکسالی میزبان عمل می‌نماید. این یافته‌ها تایید می‌کنند که تولید آزمایشگاهی مایه تلقیح PGPRهای بیوفیلمی می‌تواند برای برآورده ساختن تقاضاهای بخش کشاورزی در آینده با کمک به افزایش تثبیت N_2، افزایش جذب مواد غذایی، تولید عوامل رشد گیاه و کنترل زیستی بیماری‌ها از طریق طیف وسیعی از مکانیسم‌ها، به‌کار گرفته شوند. بر مبنای بررسی‌های فوق،

- ایمیل نویسنده مسئول: sm_ka80@yahoo.com

انجام مطالعات در خصوص بهره‌گیری از پتانسیل میکروبی باکتریهای تشکیل‌دهنده بیوفیلم در جهت مقابله با انواع تنش‌های محیطی، نوید بخش این امر خواهد بود که بدون بهره‌گیری از موجودات دستکاری ژنتیکی شده، بتوان عملکرد محصولات کشاورزی را در مقابل تنشها بالا برد. این مطالعه به بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتریهای محرک رشد و سپس آزمون توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه گندم توسط آنها در شرایط آزمایشگاهی خواهد پرداخت.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری: تعداد ۹۰ عدد سویه منسوب به باکتری از مجموعه باکتریهای محرک رشد موجود در آزمایشگاه‌های بیولوژی خاک دانشگاه مراغه و دانشگاه تبریز که قبلا از ریزوسفر گونه‌های مختلف گیاهان گرامینه غیر زراعی جداسازی شده بودند، جهت این مطالعه انتخاب گردیدند. آزمون تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها: توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها بر مبنای روش تغییر یافته Stepanovic و همکاران (۲۰۰۰) و با تلقیح ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شبانه و تازه باکتری‌ها به ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل TSB 0.5 X حاوی یک درصد گلوگز درون تیوپ‌های پلاستیکی محتوای داخل میکروتیوب‌ها تخلیه و سه بار با سرم فیزیولوژیکی استریل به آرامی شستشو داده شدند تا سلول‌های غیرمتصل به دیواره میکروتیوب‌ها خارج شوند. سپس تثبیت سلول‌ها با گذاشتن این میکروتیوب‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون به‌مدت یک ساعت انجام شد. در ادامه کار میکروتیوب‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر کریستال ویوله ۰/۲ درصد و با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۱ درصد به‌عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۲۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب‌ها به آرامی به میکروپلیت منتقل شده و مقدار جذب نوری در چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

آزمون تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها روی سطح ریشه گندم: سطح بذور گندم با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد استریل و پس از شستشوی مکرر با آب مقطر استریل با سه باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ و ۱-۲۵ به‌صورت جداگانه، درون گلدان‌های حاوی پرلیت سترون کشت گردیده و با محلول غذایی هوگلنداستریل آبیاری گریده و در اتاق کشت رشد داده شدند. چهار هفته پس از تلقیح، ریشه‌ها از پرلیت خارج گردیدند و زیر جریان ملایم آب شسته شدند. سپس به قطعه‌های تقریبا یک سانتی‌متری بریده شده و پس از رنگ آمیزی با رنگ سایبرگرین با استفاده از میکروسکوپ کونفوکال در موسسه هلمهولتز آلمان بخش مطالعات اکولوژیکی خاک مورد مطالعه قرار گرفته و عکس‌های بیوفیلم باکتریایی روی ریشه تهیه گردیدند (Aline و همکاران ۲۰۱۵).

نتایج و بحث

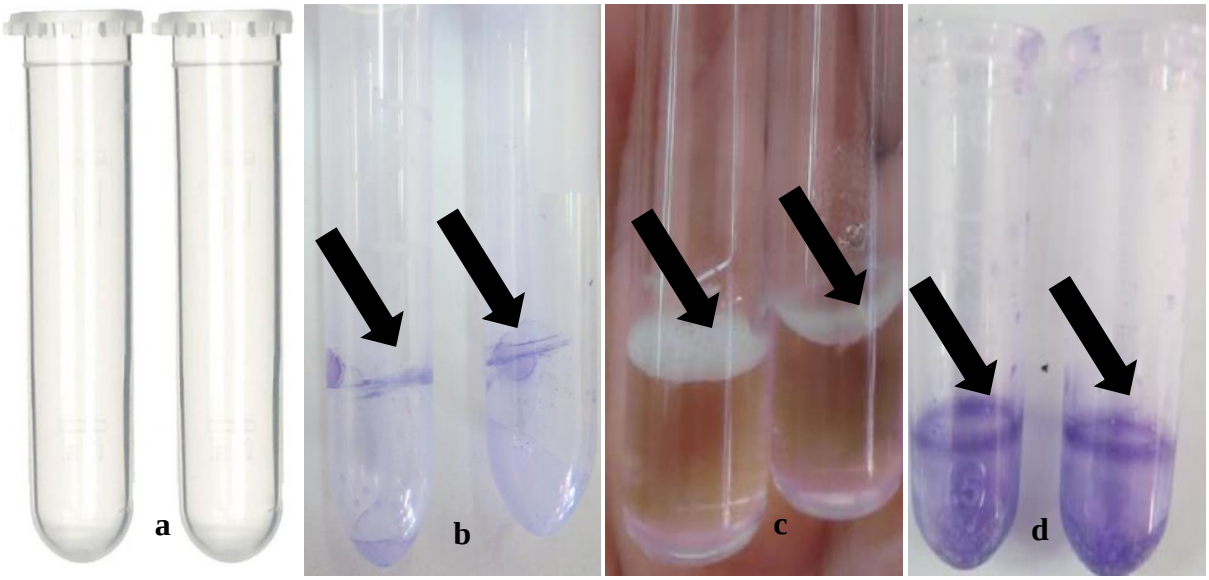
ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم

نتایج بدست آمده همانگونه که در جدول ۱ گزارش گردیده، نشان دادند که باکتری‌های مورد بررسی در حالت کلی دو نوع بیوفیلم تشکیل می‌شود و بر این اساس باکتری‌ها می‌توانند به دو گروه تقسیم شوند: الف- بیوفیلم رو شناور که در این حالت بیوفیلم در سطح محیط کشت مایع با چشم به راحتی قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۱). ب- بیوفیلم تشکیل شده در دیواره لوله و یا به شکل حلقه‌ای در اطراف لوله در سطح اتصال محیط کشت به دیواره لوله (شکل ۱). باکتری‌های گروه ب بر مبنای توانایی تشکیل بیوفیلم بر اساس توانایی اتصال به سطح دیواره ظرف در ۴ گروه دسته‌بندی شدند (Stepanovic و همکاران ۲۰۰۰). غیرچسبنده (OD < ODc)، چسبندگی ضعیف (ODc < OD < 2xODc)، چسبندگی متوسط (2 < xODc < OD 4xODc) و چسبندگی قوی (OD > 4xODc). از میان اینها سه سویه باکتریایی از گونه *Bacillus atrophaeus* انتخاب گردیدند، سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ این باکتری دارای قدرت تشکیل بیوفیلم و سویه ۱-۲۵ با قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف جهت آزمون پتانسیل کلنیزاسیونی ریشه گندم انتخاب گردیدند.

جدول ۱: گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس توانایی تشکیل بیوفیلم

قدرت تشکیل بیوفیلم		غیر چسبنده OD<ODc	چسبندگی ضعیف (ODc< OD< 2xODc)	چسبندگی متوسط (2xODc<OD< 4xODc)	چسبندگی قوی (OD > 4xODc)	روشناور (pellicle)
جمعیت	تعداد	7	14	35	28	44
جدایه‌ها	درصد	4.5	10.9	27.3	22.3	34.4

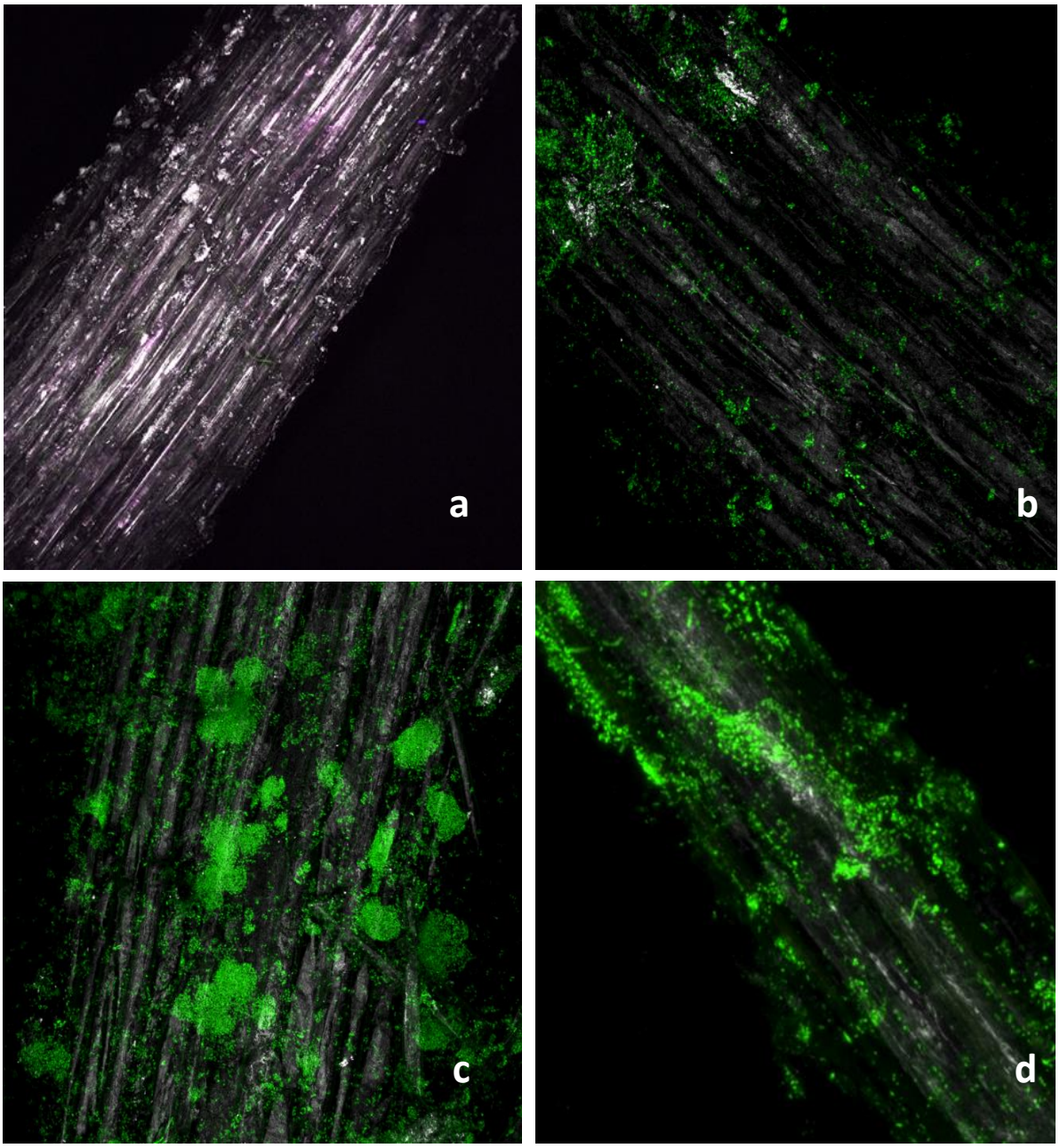
OD: میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای هر نمونه و OD_C: میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای شاهد بدون باکتری



شکل ۱ : انواع بیوفیلم ایجاد شده توسط سویه‌های جداسازی شده به ترتیب از چپ به راست: (a) بدون باکتری (شاهد)، (b) بیوفیلم چسبناک ضعیف توسط سویه ۱-۲۵، (c) بیوفیلم روشناور ۱-۱۶ و (d) بیوفیلم چسبناک قوی ۱-۵۴. فلش‌های مشکی بیوفیلم‌ها را در تصویر نشان می‌دهند. نمونه‌ها به غیر از بیوفیلم روشناور با کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شده‌اند و میزان رنگ بنفش نشان دهنده تشکیل بیوفیلم و شدت تشکیل آنها می‌باشند.

مطالعه کلنیزاسیون باکتریایی ریشه با میکروسکوپ کونفوکال

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که *Bacillus atrophaeus* سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ دارای پتانسیل مطلوبی جهت کلنیزاسیون ریشه گندم هستند و همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می¬گردد، در مدت ۱۸ روز این باکتری‌ها توانسته‌اند سطح ریشه گندم را اشغال نمایند. سویه ۱-۲۵ که در نتایج آزمایشگاهی اولیه توان تشکیل بیوفیلم را به صورت ضعیف دارا بود در قیاس با باکتریهای تشکیل‌دهنده بیوفیلم نتوانست به خوبی ریشه گندم را کلنیزه نماید. نتایج نشان داد که توزیع باکتری‌ها در سطح ریشه به‌صورت یکنواخت نبوده و در اکثر موارد به فرم کلنی که همان شکل بیوفیلمی از زندگی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد، حضور دارند. همانگونه که در تصاویر یاد شده مشخص می‌باشد الگوی کلنیزاسیون در سطح ریشه برای دو باکتری یکسان نبوده و به نظر می‌رسد بیوفیلم ایجاد شده توسط آنها دارای ساختارهای متفاوتی می‌باشد. بررسی کلنیزاسیون میکروبی توسط باکتری‌های ریزوسفری مایه‌زنی شده به خاک با استفاده از میکروسکوپ کونفوکال و میکروسکوپ الکترونی در دهه اخیر توسط محققان مختلفی بررسی شده و نتایج آن مقبول جوامع علمی قرار گرفته است. Ahmed و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از این نوع میکروسکوپ‌ها توانستند ۵ نوع مرحله متمایز در کلنیزاسیون توسط سیانوباکتر را به‌طور کامل تشریح کنند. Timmusk و همکاران (۲۰۱۴) توان کلنیزاسیون *پنه‌باسیلوس* بر روی ریشه گندم را با استفاده از این نوع میکروسکوپ تشریح کرده‌اند.



شکل۲ : تصاویر میکروسکوپی بیوفیلم میکروبی بر روی سطوح ریشه گندم پس از گذشت ۱۸ روز مایه‌زنی، (a) بدون باکتری (شاهد)، (b) باکتری فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، (c) باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه ۱-۵۴ و (d) باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه ۱-۱۶. مناطق سبز رنگ محل استقرار باکتری را نشان می‌دهد (۴۰۰۰×).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم می‌تواند معیار مناسبی جهت تخمین کلنیزاسیون ریشه گیاه توسط باکتریهای محرک رشد مطرح باشد. میکروسکوپ کونفوکال به روشنی می‌تواند روند کلنیزه شدن ریشه گیاه توسط باکتریهای مایه‌زنی شده را به نمایش درآورد.

منابع

Ahmed, P., Jaleel, C., Azooz, M. and Gowher, N. 2009. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International, 2 (3), 11-20.

Aline, B., Yi, D., Regina, K., Alga, Z. and Parniske, M. 2015. Colonization of root cells and plant growth promotion by Piriformospora indica occurs independently of plant common symbiosis genes. Frontier in Plant Science, 6, 1-11.

Bent, E. and Chanway, C.P. 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. Canadian journal of Microbiology, 44,980–988

O'Connell P. F. 1992. Sustainable agriculture – a valid alternative. Outlook Agric, 21, 5–12.

Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Bandara, W. M. M. S. and Weerasekara, M. L. M. A. W. 2008. Fungal–bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. World Journal Microbiol Biotechnol, 24, 739–743.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabić–Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40, 175–179.

Timmusk, S., Abd El-DaimI, A., Copolovici, M., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E. and Niinemets, Ü. 2014. Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles, PLOS One, 9(5), e96086.

Timmusk. S., Grantcharova, N., Gerhart, E. and Wagner H. 2005. Paenibacillus polymyxa invades plant roots and forms biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 71, 7292–7300.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: soil biology and biofertilizers

Laboratory evaluation of biofilm formation by growth promoting bacteria and wheat root colonization by them

Karimi*[1], E., Aliasgharzad[2], N., Neishabouri[2], M.R., Mousavi[1], S.B., Esfandiari[3], E., Mika[4], T.

[1] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Maragheh, Iran

[2] Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Tabriz, Iran

[3] Prof., Agronomy Department, Faculty of Agriculture University of Maragheh, Iran

[4] Associated Prof., Soil ecology department, Helmholtz institute, Germany

Abstract

The formation of biofilms increases the ability of plant growth promoting bacteria against adverse environmental conditions and increase their plant root colonization ability. Since the study of growth promoter bacteria is aimed toward producing biological fertilizers, in addition to overcoming the adverse environmental conditions in the soil, the success of their inoculum, depends on the competitive advantage in the soil and their potential to plant root colonization. So the ability of biofilm formation is considered very important. To this end, a number of isolates from the rhizosphere of Gramineae were collected. After assessing their ability to biofilm forming, the ability of target bacteria to colonizing wheat root was evaluated by confocal laser microscope. The results indicated that power biofilm forming PGPR had better ability to root plant colonization. Therefore, it seems that the biofilm forming ability could be a good selective criteria in addressing effective root colonizing PGPR strains. Confocal microscopy can depict bacterial colonization process on the plant roots.

Keywords: Bacillus, Hogland solution, Crystal violate, wheat root

* Corresponding author, Email: sm_ka80@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی توان همزیستی و شناسایی سویه‌های برتر باکتری‌های بومی همزیست عدس

الهام شمشیری‌پور[۱]، کاظم خاوازی[۲*]، شکوفه رضایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن، علیرغم افزایش عملکرد محصولات کشاورزی باعث صدمه جدی به محیط زیست می‌شود، لذا لزوم دستیابی به کودهای بیولوژیک بیش از پیش احساس می‌شود. با توجه به اینکه سویه‌های باکتری بومی توان ماندگاری بیشتری داشته و کارایی بهتری دارند، تحقیق حاضر بر روی ۹۵ جدایه باکتری همزیست با گیاه عدس انجام شد. جدایه‌ها از ۸۴ مزرعه در ۷ استان کشور که بیشترین سطح زیرکشت عدس را دارند جداسازی شد. آزمون توان همزیستی به همراه تست آلوده‌سازی گیاه با باکتری (Plant infection test) صورت گرفت. بدین منظور بذرهای عدس رقم بیله سوار درلوله‌های آزمایش حاوی محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن و آگار،کشت و در سه تکرار با هریک از جدایه‌های باکتری تلقیح شد. گیاهان در گلخانه قرار گرفت و پس از گذشت ۲ ماه از نظر وزن خشک اندام هوایی، طول ساقه، تعداد گرهک و خصوصیات ظاهری ریشه و اندام هوایی بررسی و با استفاده از وزن خشک اندام هوایی، کارایی زیستی هریک از سویه‌ها محاسبه شد. از این میان ۱۹ سویه برتر که موجب افزایش بیشتری در عملکرد و وزن خشک اندام هوایی شده بودند با در نظر گرفتن پراکندگی استانی انتخاب شد. در نهایت ۱۹ سویه وارد شناسایی مولکولی شد. باکتری‌های منتخب بر اساس توالی 16SrRNA شناسایی شدند. در نهایت تمامی سویه‌هاریزوبیوم لگومینوزارم بودند.

کلمات کلیدی: وزن خشک، عدس، تثبیت ازت، ریزوبیوم لگومینوزاروم

مقدمه

کاربرد کودهای نیتروژنه، غلظت نیترات در خاک بعد از برداشت محصول را افزایش می‌دهد که این وضعیت می‌تواند منجر به افزایش آلودگی آب‌های آشامیدنی با نیترات شود. یکی از روش‌هایی که می‌تواند استفاده از کودهای شیمیایی مانند اوره را کاهش دهد، کاربرد تثبیت‌کننده بیولوژیک نیتروژن است (Azarpour و همکاران، ۲۰۱۲). عدس (Lens culinaris Medik) یکی از مهمترین لگومها است(FAOSTAT، ۲۰۱۷). این گیاه قادر به ایجاد همزیستی با باکتری Rhizobium leguminosarum b viciae است (Weir، ۲۰۱۱). در اکثر آزمایشات انجام شده، استفاده از مایه تلقیح‌های ریزوبیومی به‌طور متوسط باعث افزایش عملکرد دانه به میزان ۲۹ تا ۳۴ درصد می‌شود(Toklu و همکاران، ۲۰۰۹). به‌منظور دستیابی به حداکثر تولید عدس، غربالگری جدایه‌های بومی ریزوبیوم برای تأمین نیتروژن کافی برای آن‌ها حیاتی است(Anglade و همکاران، ۲۰۱۵). بطور کلی هرچه میزان نیتروژن حاصل از تثبیت بالاتر باشد، میزان عملکرد ماده خشک بیشتر است(Hafeez و همکاران، ۲۰۰۰).R.leguminosarum اصلی‌ترین گونه برای گره‌زایی در قبیله ماش (Vicieae) است(Tian و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه گونه‌های از لحاظ ژنتیکی نزدیک R.fabae و R. pisi نیز گزارش شده‌اند (Tian و همکاران، ۲۰۰۸). به دلیل اهمیت فراوان دستیابی به سویه‌های بومی برتر باکتری همزیست با گیاه عدس جهت تولید کود بیولوژیک جایگزین کودهای شیمیایی، پژوهش حاضر بر روی ۹۵ جدایه باکتری همزیست عدس انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمون تعیین کارایی همزیستی (Symbiosis Efficiency (S.E.: به‌منظور انجام این آزمایش، بذر عدس رقم بیله سوار به دلیل دارا بودن بیشترین سطح کشت در کشور انتخاب شد. بذر های عدس، پس از استریل و جوانه دار شدن در لوله های شیشه ای حاوی محیط کشت مناسب برای رشد گیاه و فاقد منبع نیتروژن کاشته شدند. محیط کشتYMB تهیه و پس از توزیع در ارلن‌های ۵۰ سی‌سی استریل گردید. به میزان یک لوپ از هر یک از جدایه‌ها داخل هریک از ارلن‌ها اضافه و به مدت ۴۸ ساعت داخل شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت و مشاهده

*ایمیل نویسنده مسئول: kkhavazi@yahoo.com

کدورت، کشت باکتری مورد استفاده قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت بالای 10^8سلول در هر میلی‌لیتر که قبلاً به روش plate count شمارش شده‌اند به لوله‌ها اضافه شدند. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح در سطوح نیتروژن ۰، ۲۰، ۳۵و ۷۰ ppm در نظر گرفته شد. پس از گذشت دو ماه، زمانی که گیاهان در مرحله گلدهی یا غلاف‌دهی بودند، قسمت‌های هوایی گیاه از ناحیه طوقه قطع و ریشه‌ها پس از شستشو و خشک کردن در پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند. طول اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه و تعداد گره‌ها اندازه‌گیری شدند. همچنین خصوصیات ظاهری گیاه از نظر تشکیل یا عدم تشکیل گل و بذر نیز یادداشت شدند. برای محاسبه میزان کارایی همزیستی از وزن خشک اندام هوایی استفاده شد. میزان کارایی همزیستی باکتری‌ها از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$SE = \frac{I.C}{N.C} \times 100$$

دراین فرمول I: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار تلقیح شده، C: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بدون تلقیح و N: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد نیتروژنی است. در ارزیابی کارایی همزیستی S.E.≤۵۰: نسبتا موثر (ضعیف)،۷۵-۵۰=S.E.:موثر (متوسط)، ۱۰۰-۷۵ =S.E.:کارایی خوب و S.E.≥۱۰۰: کارایی بسیار خوب و به عنوان سویه برتر انتخاب می‌شوند(خسروی، ۱۳۹۴).

شناسایی مولکولی: جهت استخراج DNA سویه‌های برتر، برای شناسایی مولکولی از کیت استخراج مخصوص باکتری‌های گرم منفی CinnaPureDNA استفاده شد. تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی Polymerase Chaine Reraction 27F انجام شد. جهت اطمینان از صحت استخراج DNA، محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE(0.5X) عبور داده شد. قطعات حاصل از توالی 16SrRNA به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و سپس توالی بدست آمده در پایگاه NCBI، با توالی‌های موجود مقایسه شد.

آنالیزهای آماری: در کشت گلخانه‌ای از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. پس از اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در نمونه‌ها، آنالیز نتایج توسط نرم افزار SAS و مقایسه‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از مقایسه تیمارهای شاهد نیتروژنی، شاهد نیتروژنی ۷۰ ppm به دلیل کارایی بیشتر به‌عنوان شاهد برتر در محاسبه کارایی همزیستی استفاده شد (جدول ۱).

جدول۱. مقایسه تیمارهای شاهد نیتروژن از نظر تأثیر بر رشد گیاه عدس

شاهد نیتروژنی	میانگین وزن خشک اندام هوایی ($gr.pot^{-1}$)	میانگین طول گیاه (cm)
N control 70 ppm	۰/۱۴۸	۲۳/۳۰۰
N control 35 ppm	۰/۰۸۲	۱۹/۹۳۳
N control 0 ppm	۰/۰۸۲	۱۷/۶۶۷
N control 20 ppm	۰/۰۴۴	۱۶/۶۰۰

نتایج آزمون توان همزیستی: جداول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تیمارهای باکتریایی بر وزن خشک اندام هوایی، کارایی همزیستی، طول اندام هوایی و تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۲ و ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیرتیمارهای باکتریایی بر وزن خشک، کارایی همزیستی و طول اندام هوایی گیاه عدس

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن خشک (gr)	کارایی همزیستی	طول اندام هوایی
تیمار	۹۵	۰/۰۰۲۵۱**	۶۸۹۳**	۲۶/۳۹**
خطا	۱۹۸	۰/۰۰۰۹۵	۲۸۱۳	۱۷/۶۸

**و **به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns نشان دهنده عدم معنی‌دارمی‌باشند.

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیرتیمارهای باکتریایی بر تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		تعداد گره
تیمار	۹۴	۴۵/۶۹**
خطا	۱۹۳	۲۸/۱۱

*و **به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns نشان دهنده عدم معنی‌دارمی‌باشند.

تحقیقات مشابه برو روی عدس نشان داد که تأثیر تیمارهای باکتریایی بر وزن خشک اندام هوایی، کارایی همزیستی، طول اندام هوایی و تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس معنی‌دار بود(Tena و همکاران، ۲۰۱۶).

توان همزیستی سویه‌ها با استفاده از وزن خشک محاسبه گردید. ۷۰/۵ درصد از باکتری‌های مورد آزمایش کارایی همزیستی بالای ۱۰۰ درصد (کارایی بسیار خوب) داشتند. با توجه به اهمیت وزن خشک اندام هوایی در تعیین کارایی همزیستی، شاخص فوق به‌عنوان مؤلفه اصلی در مقایسه سویه‌ها درنظر گرفته شد. بر اساس مطالعات پیشین، هرچه میزان نیتروژن حاصل از تثبیت بالاتر باشد میزان عملکرد ماده خشک بیشتر است(Hafeez و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین نتایج تحقیقی که در کشور پاکستان بر روی باکتری‌های جداسازی شده از ریشه گیاه عدس صورت گرفت، افزایش وزن‌تر و خشک و طول اندام هوایی را در نتیجه تلقیح گیاه عدس با جدایه‌های فوق نشان داد(Zafar و همکاران، ۲۰۱۲).

وزن خشک تمامی جدایه‌های برتر انتخاب شده از وزن خشک تیمار شاهد نیتروژنی ۷۰ppm بالاتر بود. این امر می‌تواند علاوه بر تثبیت نیتروژن، به دلیل خاصیت محرک رشدی باکتری‌های ریزوبیوم باشد. باکتری ریزوبیوم به‌طور مؤثری ریشه گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. همچنین به دلیل خاصیت محرک رشدی، این باکتری‌ها با تولید هورمون‌های رشد گیاهان مختلف، افزایش فعالیت حل‌کنندگی فسفات، تثبیت N_2 و کنترل بیولوژیکی به رشد گیاه کمک می‌کنند(Deshwal و همکاران، ۲۰۱۱).

انتخاب سویه‌های برتر: جهت انتخاب سویه‌های برتر، جدایه‌های باکتری در درجه نخست از نظر وزن خشک اندام هوایی و کارایی همزیستی و در درجه بعد از نظر دیگر خصوصیات اندازه‌گیری شده همچون طول گیاه، تعداد غده، وضعیت کلی گیاه از نظر تولید گل و بذر و همچنین با در نظر گرفتن پراکندگی استانی باکتری‌ها، بررسی شده و در نهایت تعداد ۱۹ باکتری وارد فاز شناسایی مولکولی شدند.

نتایج شناسایی مولکولی: نتایج شناسایی مولکولی ۱۹ سویه منتخب در جدول ۴ آورده شده است.

جدول۴. مشخصات سویه‌های برتر منتخب

ردیف	نام سویه	استان	SE%	کارایی همزیستی	نتیجه شناسایی مولکولی
۱	BK11-1	کهکیلویه	۲۰۵/۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۲	GL10-1	لرستان	۲۴۷/۱۶	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۳	GK7-1	کهکیلویه	۲۳۱/۸	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۴	BA19-1	اردبیل	۲۲۴/۷۵	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*

۵	GA6-1	آذربایجان شرقی	۱۸۴/۹۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۶	BA28-2	اردبیل	۲۱۹/۹۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۷	BK6-3	کهکیلویه	۲۱۴/۹۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۸	BK2-3	کهکیلویه	۲۱۲/۹۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۹	BK12-2	کهکیلویه	۲۰۸/۳۳	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۰	GF8-1	فارس	۲۰۶/۴۶	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۱	GF5-1	فارس	۱۵۷/۴۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۲	GK11-1	کهکیلویه	۱۹۳/۴۹	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۳	KL5-3	لرستان	۱۵۲/۱۷	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۴	KK5-1	کهکیلویه	۱۵۲/۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۵	GA25-1	اردبیل	۱۸۹/۸	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۶	A1	آذربایجان شرقی	۱۵۰/۶۹	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۷	KB4-1	خراسان جنوبی	۱۶۶/۷۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۸	GQ9-3	قزوین	۱۲۵/۰۳	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۹	S2	سمنان	۸۵/۶۲۳	خوب	*Rhizobium leguminosarum*

سویه‌های باکتری برتر انتخاب شده همگی به‌عنوان*Rhizobium leguminosarum* شناسایی شدند. تمام باکتری‌های تأیید شده در بانک ریزجانداران مفید خاک‌زی مؤسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری شدند. در تحقیقاتی که در بنگلادش بر روی گیاه عدس صورت گرفت مشخص گردیده است که باکتری‌های*R. leguminosarum*، *R. etli* و *R. phaseoli* باکتری‌های همزیست هستند (Rashid و همکاران، ۲۰۱۴). اغلب باکتری‌های جداسازی شده از لگوم‌هایviceae مربوط به*R. leguminosarum*، *R. faba* و *R.pisi* می‌باشند(Álvarez-Martínez و همکاران، ۲۰۰۹)

نتیجه‌گیری

- تیمار ریزوبیومی همزیست عدس موجب افزایش کارایی همزیستی نسبت به تیمار شاهد و تیمار نیتروژنی می‌شود.
- بر اساس نتایج آزمون شناسایی مولکولی بر اساس توالی 16SrRNA تمامی ۱۹ سویه به‌عنوان *Rhizobium leguminosarum*شناسایی شدند.

منابع

خسروی، ه. ۱۳۹۴. بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیک *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* بومی ایران. نشریه پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۸(۴)، ۵۲۳-۵۱۳.

Álvarez-Martínez, E. R., Valverde, Á., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P., and Fvelázquez, E. 2009. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating Vicia from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of Rhizobium leguminosarum strains together with Vicia seeds. Archives of microbiology, 191(8), 659-668.

Anglade, J., Billen, G. and Garnier, J. 2015. Relationships for estimating N2 fixation in legumes: incidence for N balance of legume based cropping systems in Europe. Ecosphere, 6(3), 1-24.

Azarpour, E., Motamed, M. K., Moraditochaee, M. and Bozorgi, H. R. 2012. Effects of bio, mineral nitrogen fertilizer management, under humic acid foliar spraying on fruit yield and several traits of eggplant (*Solanummelongena* L.). African journal of agricultural research, 7(7), 1104-1109.

Deshwal, V. K., Vig, K., Amisha, D. M., Yadav, P., Bhattacharya, D. and Verma, M. 2011. Synergistic effects of the inoculation with plant growth-promoting Rhizobium and Pseudomonas on the performance of Mucuna.Ann. Forestry, 19(1), 13-20.

FAOSTAT Database, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC,Accessed date: 10 January 2017.

Hafeez, F. Y., Shah, N. H. and Malik, K. A. 2000. Field evaluation of lentil cultivars inoculated with Rhizobium leguminosarum bv. viciae strains for nitrogen fixation using nitrogen-15 isotope dilution. Biology and fertility of soils,31(1), 65-69.

Rashid, M. H. O., Gonzalez, J., Young, J. P. W. and Wink, M. 2014. Rhizobium leguminosarum is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. FEMS microbiology ecology, 87(1), 64-77.

Tena, W., Wolde-Meskel, E. and Walley, F. 2016. Symbiotic efficiency of native and exotic rhizobium strains nodulating lentil (Lens culinaris Medik.) in soils of southern Ethiopia. Agronomy, 6(11), 1-10

Tian, C. F., Young, J. P. W., Wang, E. T., Tamimi, S. M. and Chen, W. X. 2010. Population mixing of Rhizobium leguminosarum bv. viciae nodulating Vicia faba: the role of recombination and lateral gene transfer. FEMS microbiology ecology, 73(3), 563-576.

Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T. and Chen, W. X. 2008. Rhizobium fabae sp. nov., a bacterium that nodulates Vicia faba. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58(12), 2871-2875.

Toklu, F., Karaköy, T., Haklı, E., Bicer, T., Brandolini, A., Kilian, B. and Özkan, H. 2009. Genetic variation among lentil (Lens culinaris Medik) landraces from Southeast Turkey. Plant breeding, 128(2), 178-186.

Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of Rhizobia. New Zealand Rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html.

Zafar, M., Abbasi, M. K., Khan, M. A., Khaliq, A., Sultan, T. and Aslam, M. 2012. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions. Pedosphere, 22(6), 848-859.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Symbiotic Efficiency and molecular characterization of indigenous *rhizobium leguminosarum* b.v *Viciae* in symbiosis with Lentil

Shamshiripour[1], E., Khavazi[2*], K., Rezaei[3], Sh

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran
[2] Professors, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

Using of nitrogen fertilizers causes serious environmental damage in spite of increasing the yield of agricultural products. Therefore, increasing of biofertilizers application is necessary than before. Considering that native bacterial strains are capable of sustainability and efficiency, The present study was conducted on 95 isolates of bacteria that coexisted with lentil plant isolated from 84 points in 7 provinces of the country that have the highest Lentil cultivating area. Then (S.E test) Symbiosis Efficiency and plant Infection tests were carried out. The Lentil seeds were cultivated in vitro contained nutrient elements expect of nitrogen. Bacteria isolates were inoculated with lentil seedlings in three replications and maintained for two months in controlled greenhouse condition. The dry weight of each plant measured after two months. Results showed that inoculation of lentil plants with 19 strains of bacteria enhanced significantly dry weight of lentil plants compare to control. Results obtained by 16S Molecular identification showed that all of these 19 isolated strains from lentil farms were related to *rhizobium leguminosarum* species.

Keywords: Lentil, Nitrogen fixation, *Rhizobium leguminosarum*, Symbiosis

* Corresponding author, Email: kkhavazi@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های بومی همزیست عدس

الهام شمشیری‌پور[۱]، کاظم خاوازی[۲*]، شکوفه رضایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

در سال‌های اخیر دستیابی به کودهای بیولوژیک حاوی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن به عنوان جایگزین کودهای شیمیایی نیتروژن مورد توجه قرار دارد. بدین منظور تحقیقی بر روی گیاه عدس در ۹ استان کشور بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. ابتدا از ۸۴ نقطه نمونه‌های تصادفی خاک تهیه، سه رقم بذر بیله‌سوار، گچساران و کیمیا در دو تکرار در هریک از نمونه‌های خاک کشت و با محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن آبیاری شد. پس از برداشت در مرحله گلدهی(۲ ماه پس از کاشت) باکتری‌های ریزوبیوم از گرهک‌های ریشه جداسازی و آزمایش‌های افتراقی بیوشیمیایی انجام شد. جهت تفکیک *اگروباکتریوم* از *ریزوبیوم*، هریک از جدایه‌های باکتری به صورت همزمان روی ۴ محیط کشت YMA(تفکیک بر اساس سرعت رشد)، Hofer(تفکیک از نظر تحمل به pH بالای۱۱)، Glucose pepton agar (تفکیک بر اساس استفاده از منبع پپتون) و محیط YMA حاوی ۲ درصد NaCl (تفکیک بر اساس تحمل به نمک) کشت داده شد. پلیت‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. بر این اساس تعداد ۱۶۰جدایه به عنوان باکتری‌های همزیست گیاه عدس شناسایی شد. بطور کلی نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی بر روی باکتری‌های جداسازی شده از گره‌های ریشه عدس نشان داد که از این آزمایشات حتی می‌توان به عنوان جایگزینی برای آزمایشات گره‌زایی نیز استفاده کرد.

کلمات کلیدی: عدس، تثبیت ازت، ریزوبیوم لگومینوزاروم، همزیستی

مقدمه

از آنجایی که استفاده از کودهای نیتروژنی باعث آلودگی غیرمنتظره آب‌ها و پیری زودرس رودخانه‌ها و دریاچه‌ها می شود، تثبیت زیستی نیتروژن اهمیت زیادی پیدا کرده است(Megharaj و همکاران، ۲۰۱۱). عدس (Lens culinaris Medik) یکی از مهمترین لگوم‌ها است (FAOSTAT، ۲۰۱۷). این گیاه قادر به ایجاد همزیستی با باکتری Rhizobium leguminosarum b viciae است(Weir و همکاران، ۲۰۱۱). ریزوبیوم‌ها گروه رایجی از باکتری‌های کوچک میله‌ای شکل و گرم منفی هستند که بطور کلی توانایی تولید گره در ریشه گیاهان لگوم را دارند. باکتری ریزوبیوم به‌طور موثری ریشه گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. در مناطقی که عدس در تناوب زراعی با گیاهان دیگر قرار می‌گیرد قادر است بیش از ۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به خاک اضافه نماید که می‌تواند در تأمین مقداری از نیاز نیتروژنی محصول بعدی بسیار مفید باشد (Martinez Romero، ۲۰۰۹). به منظور دستیابی به حداکثر تولید عدس، غربالگری جدایه‌های بومی ریزوبیوم برای تأمین نیتروژن کافی برای آنها حیاتی است(Anglade و همکاران، ۲۰۱۵). باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم از لحاظ فنوتیپی بسیار شبیه باکتری‌های اگروباکتریوم که عامل بیماری گال در ریشه گیاهان است می‌باشند. از آزمون‌های بیوشیمیایی خاصی می‌توان جهت شناسایی باکتری‌های ریزوبیوم از اگروباکتریوم استفاده نمود. باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم در محیط‌های گلوکز پپتون آگار، محیط هوفر و YMA حاوی ۲ درصد کلرید سدیم قابلیت رشد نداشته و یا رشد بسیار محدودی دارند (Bhatt و همکاران، ۲۰۱۳). جدایه‌های بومی ریزوبیوم پایدارتر بوده و میزان بقاء آنها بیشتر است و این می‌تواند شانس گره‌زایی موفق و تثبیت نیتروژن در گیاه میزبان را افزایش دهد (Stajković و همکاران، ۲۰۱۱). این مساله اهمیت جداسازی باکتری‌های بومی همزیست با گیاه عدس، جهت دستیابی به مایه تلقیح مناسب برای این گیاه را دو چندان می‌کند. بر این اساس پژوهش حاضر با هدف جداسازی باکتری ریزوبیوم از خاک‌های تحت کشت عدس در ۹ استان کشور انجام شد.

*ایمیل نویسنده مسئول: khavazik@yahoo.com

مواد و روش‌ها

ابتدا از مزارع عدس واقع در مناطق مختلف ۶ استان کشور نمونه‌های ۳ کیلوگرمی خاک ازعمق ۳۰-۰ سانتی‌متری تهیه شد. همچنین از مزارع عدس سه استان زنجان، آذربایجان شرقی و سمنان نیز پس از برداشت عدس نمونه‌های گرهک از ریشه جداسازی شد(جدول ۱). جهت دستیابی به حداکثر فراوانی سویه‌های باکتری همزیست با عدس، ۳ رقم بذر عدس (بیله‌سوار، کیمیا و گچساران) که بیشترین سطح زیر کشت عدس را در کشور دارا می‌باشند از موسسه تحقیقات دیم کشور دریافت شد. بذرهای هر سه رقم عدس در شرایط استریل (زیر هود لامینار)، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۹۶ درصد غوطه ور شده، سپس پس از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت دو دقیقه داخل ۰/۱HgCl2 درصد قرار گرفته و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۱۲-۱۰مرتبه). سپس به منظور تسریع در جوانه‌زنی به مدت یک ساعت زیر هود لامینار داخل آب مقطر استریل نگهداری شدند. بذور استریل شده در داخل پلیت‌های حاوی واتراگار (۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۱۳/۵ گرم در لیتر آگار) به دستگاه ژرمیناتور منتقل شدند. بذرها پس از ۴۸ ساعت در دمای ۲۲°Cجوانه‌دار شدند. بذور جوانه‌دار شده در گلخانه در شرایط مناسب رشد گیاه عدس (دمای ۲۶ºC، رطوبت ۸۰ درصد و شدت نور ۱۲۰۰۰لوکس) در ۲ تکرار داخل گلدان‌های نیم کیلویی حاوی خاک‌های نمونه برداری شده از ۶ استان کشور کاشته شدند. گلدان‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی در گلخانه چیده شدند. جهت آبیاری گلدان‌ها از محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن با pH حدود ۷ استفاده شد. در مرحله گلدهی (ابتدای تشکیل غلاف) که گیاهان در بهترین شرایط از نظر تشکیل گره بودند گلدان‌ها در سطل آب غوطه‌ور شده و خاک اطراف ریشه به دقت حذف شد. از هر گلدان ریشه‌های دارای گرهک فعال (درشت، سالم با مرکز صورتی و قرمز) انتخاب و در داخل ظروف حاوی سیلیکاژل به سردخانه منتقل شدند. گرهک‌های خشک شده برای مدت یک ساعت در آب مقطر غوطه‌ور شدند. گرهک‌هایی که بدین صورت جداسازی شدند و همچنین گرهک‌های جداسازی شده از مزارع عدس، در شرایط استریل (زیر هود لامینار) ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۹۶ درصد قرارداده شده و پس از ۲ دقیقه غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد، ۱۰ مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. گرهک‌ها در داخل پلیت‌های استریل یک‌بار مصرف توسط میله شیشه ای له شده و عصاره آنها بدست آمد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مربوطه توسط پیپت استریل روی حداقل سه پتری‌دیش حاوی محیط کشت YMA(Yeast Extract Mannitol Agar) حاوی کنگورد ریخته شده و پس از گلس کردن کشت گردیدند. پلیت ها در انکوباتور در دمای ۲۸ºC قرار داده شده و هر روز از نظر ظهور کلنی باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. پس از چند مرحله خالص‌سازی، باکتری‌های لعابی‌شکل که رنگ کونگورد را جذب نکرده بودند روی لوله‌های مورب حاوی YMA و سه گرم در لیتر CaCO3 کشت و پس از رشد در سردخانه نگهداری شدند.

از آنجایی که باکتری‌های Rhizobium leguminosarum از لحاظ مورفولوژیکی بسیار به باکتری‌های Agrobacterium tumefaciens (باکتری مولد بیماری گال) شباهت دارند، جهت شناسایی و جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم از اگروباکتریوم از چهار آزمایش بیوشیمیایی زیر استفاده شد (Bhatt و همکاران، ۲۰۱۳).

الف- کشت بر روی محیط Congored Yeast Extract monitol agar (YMA): کلونی‌های ریزوبیوم در کنگورد سفید، نیمه‌شفاف، درخشان و در مقایسه با کلونی‌های اگروباکتریوم کوچک‌تر هستند. تفاوت دیگر کلنی‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم با اگروباکتریوم‌ها در سرعت رشد آن‌هاست. کلنی‌های ریزوبیوم پس از ۴۸ ساعت ظاهر می‌شوند ولی اگروباکتریوم‌ها تندرشدتر بوده و پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های آن‌ها در محیط کشت YMA قابل رویت است. با بررسی کشت‌ها پس از ۲۴ ساعت می‌توان این دو را از هم تفکیک نمود.

ب- کشت بر روی محیط Hofer alkaline medium: اگروباکتریوم‌ها قابلیت رشد در pH بالاتر از ۱۱ را دارند که این خاصیت می‌تواند در جداسازی ریزوبیوم و اگروباکتریوم کارساز باشد.

ج- کشت بر روی محیط Glucose pepton agar: ریزوبیوم‌ها برخلاف اگروباکتریوم‌ها که خیلی سریع در این محیط رشد می‌کنند نمی‌توانند از پپتون به عنوان منبع انرژی استفاده کنند(Bergey ، ۲۰۱۰).

د- YMA حاوی دو درصد NaCl: ریزوبیوم‌ها برخلاف اگروباکتریوم‌ها در غلظت نمک ۲ درصد قادر به رشد نمی‌باشند(Bergey ، ۲۰۱۰).

ابتدا این آزمایشات بر روی باکتری‌های شاهد مثبت *Rhizobium etli* سویه‌های166-RB، 175-RB و 180-RB و باکتری‌های شاهد منفی *Rhizobium Radiobacter* سویه‌های 176-RB، 182-RB و 194-RB موجود در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شده و سپس بر روی کلیه جدایه‌ها صورت گرفت. پس از بررسی نتایج به دست آمده، اگروباکتریوم‌ها از ریزوبیوم‌ها تفکیک شدند.

نتایج و بحث

تعداد ۴۲۵ جدایه که از لحاظ فنوتیپی مشخصات ریزوبیوم را دارا بودند از گرهک‌های ریشه جداسازی شدند.

جدول ۱. تعداد باکتری های جداسازی شده از گرهک‌های ریشه گیاه عدس در استان‌های مختلف

ردیف	استان	نوع نمونه	تعداد باکتری جداسازی شده
۱	خراسان جنوبی	خاک	۸۷
۲	فارس	خاک	۲۶
۳	اردبیل	خاک	۹۳
۴	کهکیلویه	خاک	۶۹
۵	لرستان	خاک	۵۴
۶	قزوین	خاک	۵۰
۷	زنجان	گره	۱۸
۸	آذربایجان شرقی	گره	۲۴
۹	سمنان	گره	۴

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

تمامی سویه‌هایی که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت در محیط YMA رشد کرده بودند همانند باکتری‌های شاهد اگروباکتریوم در هر سه محیط Hofer alkaline medium، Glucose pepton agar medium و YMA حاوی دو درصد NaCl رشد کردند(جدول ۲). این باکتری‌ها به عنوان اگروباکتریوم شناسایی و حذف شدند. بقیه باکتری‌ها که نتایج آزمایش بیوشیمیایی مشابه باکتری‌های ریزوبیوم را داشتند به عنوان ریزوبیوم انتخاب شدند. همه جدایه‌های خالص شده به عنوان ریزوبیوم مورد تأیید قرار نگرفتند. ازدلایل این مسئله ممکن است وجود باکتری‌هایی غیر از ریزوبیوم در داخل گره یا سایر آلودگی‌ها در سطح گره باشد. گزارش شده است که ازگرهک‌های استریل جداسازی شده از ریشه یونجه، باکتری‌های اندوفیت غیرریزوبیومی نیز جداسازی شده اند(Stajkovic و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش غلظت نمک منجر به کاهش رشد ریزوبیوم‌ها بسته به سویه باکتری می‌شود. در تمام سویه‌های مورد آزمایش، سرعت رشد با افزایش غلظت نمک از ۰/۵ تا ۶ درصد کاهش یافت. همچنین گزارش شده که pH بین ۶/۵ تا ۷ بهترین pH برای رشد باکتری‌های ریشه است. با این وجود، اثر بازدارنده pH بالا (بالاتر از ۷/۰) به وضوح در پاسخ رشد ریزوبیوم‌های مورد آزمایش مشاهده شد(Ahmed و همکاران، ۲۰۱۵). بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی گچندی و خانزول (۲۰۱۱) باکتری‌های ریزوبیوم در محیط کشت هوفر رشد نمی‌کنند و یا رشد کمی دارند که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. در تحقیقی دیگر روند کاهشی رشد باکتری‌های ریزوبیوم با افزایش شوری گزارش شده است (Thrall و همکاران، ۲۰۰۸). بر این اساس در تحقیق حاضر باکتری‌هایی که در NaCl ٪۲ رشد نکردند به عنوان ریزوبیوم انتخاب شدند.

جدول۲. قابلیت رشد باکتری‌های شاهد درمحیط‌های کشت ویژه آزمون‌های بیوشیمیایی

ردیف	شاهد	کد باکتری	رشد در محیط NaCl٪۲حاوی	رشد در محیطHofer	رشد در محیط Glucose Peptone Agar	رشد در محیط YMA پس از ۲۴ ساعت
۱	شاهدمثبت	RB-166	□	□	□	□
۲	*Rhizobium Etli*	RB-180	□	□	□	□
۳		RB-175	□	□	□	□
۴	شاهدمنفی	RB-176	□	□	□	□
۵		RB-182	□	□	□	□
۶	*Rhizobium Radiobacter*	RB-194	□	□	□	□

کشت باکتری‌های جداسازی شده از گرهک‌های واقع در ریشه عدس و نخود در محیط گلوکز پپتون آگار و YMA نتایج مشابهی با تحقیق حاضر نشان داد(Upadhayay و همکاران، ۲۰۱۷). این نتایج همچنین مشابه نتایج آزمایشات بیوشیمیایی روی باکتری‌های جداسازی شده از سویا بود(Gachande و Khansole، ۲۰۱۱)

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از آزمایشات بیوشیمیایی می‌توان جهت شناسایی ریزوبیوم و اگروباکتریوم استفاده نمود. جهت دستیابی به کود بیولوژیک حاوی باکتری‌های همزیست عدس نیاز به جداسازی سویه‌های بومی همزیست عدس از خاک‌های کشور می‌باشد. در نهایت تعداد صد و شصت جدایه ریزوبیوم همزیست با گیاه عدس از خاک‌های مورد مطالعه کشور با بیشترین سطح زیر کشت عدس جداسازی شد.

منابع

Ahmed, T. H. M. and Abdelmageed, M. S. 2015. Diversity of Rhizobium leguminosarum bv. Viceae strains isolated from different schemes in Shendi area, Extensive Journal of Applied Sciences, 3(1), 1-10

Anglade, J., Billen, G. and Garnier, J. 2015. Relationships for estimating N2 fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. Ecosphere, 6(3), pp.1-24.

Bergey's, M. O. 2010. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes.

Bhatt, S., Vyas, R. V., Shelat, H. N. and Mistry, S. J. 2013. Isolation and identification of root nodule bacteria of *mungbean* (*Vigna radiata* L.) for biofertilizer production. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(4), 127-133.

FAOSTAT Database, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC,Accessed date: 10 January 2017.

Gachande, B. D. and Khansole, G. S. 2011. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Rhizobium japonicum* syn and *Bradyrhizobium japonicum* of soybean. Bioscience Discovery Journal, 2(1), 1-4.

Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R., and Amarger, N. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of Rhizobium leguminosarum biovar viciae for nodulation of host legumes. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 2276-2283.

Martínez-Romero, E. 2009. Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis? DNA and Cell Biology, 28(8), 361-370.

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., and Naidu, R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. Environment International, 37(8), 1362-1375.

Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B. and Willems, A. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Botanica serbica, 33(1), 107-114.

Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N. and Knezevic-Vukcevic, J. 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with Rhizobium and plant growth-promoting bacteria. Rom Biotechnol Lett, 16(1), 5919-5926.

Thrall, P. H., Bever, J. D. and Slattery, J. F. 2008. Rhizobial mediation of Acacia adaptation to soil ecology, 96(4), 746-755.

Upadhayay, S. P., Pareek, N., and Mishra, G. 2015. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar India. Nusantara Bioscience, 7(2), 73-76.

Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of Rhizobia. New Zealand Rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and biochemical characterization of indigenous *bacteria* in symbiosis with Lentil

Shamshiripour[1], E., Khavazi[2*], K., Rezaei[3], S

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran
[2] Professors, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

Nowadays biofertilizers containing nitrogen-fixing bacteria are considered as an alternative to nitrogen fertilizers. For this purpose, a study was conducted on lentil plant in 9 provinces of Iran based on a completely randomized design. First, from 84 points of random soil samples, three cultivars of Bilehsuar, Gachsaran and Kimia were irrigated in each soil sample in two replications and irrigated with nitrogen source nutrient solution. After harvesting, in the flowering stage (2 months after planting), Rhizobium bacteria were isolated from the root nodules and biochemical differential tests. For isolation of Agrobacterium from rhizobium, each bacterial isolate simultaneously was applied to 4 medium, YMA (growth rate differentiation), Hofer (breakdown for tolerance to pH 11), Glucose pepton agar (breakdown based on the use of the peptone source), and YMA medium containing 2% NaCl (salt-tolerance) culture was cultured. Plates were examined after 24 and 48 hours. Accordingly, 160 isolates were identified as symbiotic nitrogen-fixing bacteria bacteria. In general, the results of biochemical experiments on isolated bacteria from lentil root nodes showed that these experiments could even be used as a substitute for nodule experiments.

Keywords: Lentil, Nitrogen fixation, *Rhizobium leguminosarum*, Symbiosis

[*] Corresponding author, Email: khavazik@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

ارزیابی همبستگی بین کاهش pH با انحلال فسفر و آزادسازی پتاسیم

بهمن خوشرو*[۱]، محمدرضا ساریخانی [۲] و شکوفه مرادی[۱]

[۱] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در این پژوهش ۸ جدایه (Az1، Az2، P1، P2، P3، R1، R2 و R3) از بانک میکروبی مورد ارزیابی نیمه‌کمی و کمی توان انحلال فسفر و نیز ارزیابی کمی توان آزادسازی پتاسیم از کانی‌های موسکویت و بیوتیت قرار گرفتند. در ادامه همبستگی بین تغییرات pH با دو متغییر توان حل‌کنندگی فسفر و پتاسیم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که دو جدایه Az1 و Az2 توانایی بالایی در حل‌کنندگی فسفات کم‌محلول نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند که برای حالت نیمه کمی به ترتیب مقادیر ۲/۳۴ و ۲/۲۷ برای نسبت قطر هاله به قطر کلنی و برای حالت کمی نیز مقادیر ۴۱۶/۰۷ و ۳۷۸/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. در ارزیابی توان آزادسازی پتاسیم نیز جدایه‌های Az1 و P1 به ترتیب با ۱۳/۷۰ و ۱۳/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر از بیوتیت و جدایه‌های Az1، P2 و Az2 به ترتیب با ۴/۶۷، ۴/۵ و ۴/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر از موسکویت بالاترین توان آزادکنندگی پتاسیم را نشان دادند. نتایج نشان داد که همبستگی معنی‌دار منفی قوی بین توان حل‌کنندگی فسفر با تغییرات pH محیط اسپربر مایع (R^2=0.96) و الکساندروف (R^2=0.7) وجود دارد. این همبستگی برای تغییرات pH و توان آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا غیرمعنی‌دار، منفی و ضعیف بود (R^2=0.4). از نتایج دیگر این آزمایش معرفی محیط MS بود که برای آزمون نیمه‌کمی انحلال فسفر ارائه شده و دارای مزیت‌هایی نسبت به سایر محیط‌های مورد استفاده برای این آزمون می‌باشد.

کلمات کلیدی: PGPR، باکتری‌های حل‌کننده فسفات، باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم، میکا

مقدمه

اگرچه فسفر به مقدار فراوان در خاکها به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شوند، اما در بسیاری از خاک‌ها تحرک و فراهمی کمی دارد. ریزجانداران خاک نقش مهمی در پویایی فسفر خاک و قابل دسترس کردن آن برای گیاهان دارند و اغلب به عنوان ریزجانداران حل‌کننده فسفات (PSB) نامیده می‌شوند (Khan وهمکاران ۲۰۰۷). گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم‌فسفات، دی‌کلسیم‌فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات را عنوان کردند. در بین باکتری‌های با این قابلیت، جنس‌های Pseudomonas، Bacillus، Rhizobium، Pantoea و Flavobacterium مشاهده می‌شود (Illmer and Schinner, 1995). جمعیت‌های قابل توجهی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک و ریزوسفر گیاه وجود دارند که شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی با غالبیت گونه‌های هوازی است، همچنین جمعیت آنها در ریزوسفر در مقایسه با خاک غیرریزوسفری به مراتب بیشتر بوده‌است. باکتری‌های حل‌کننده فسفات را می‌توان به روش تهیه سری‌های رقت یا روش‌های کشت غنی‌شده از نمونه‌های خاک ریزوسفری، غیرریزوسفری و همچنین از مناطق رسوبات سنگ‌های فسفاته جداسازی نمود. معمولاً جداسازی اولیه در محیط جامد انجام گرفته و توانایی آن در انحلال فسفات در محیط مایع آزمایش شده و بعد از انتخاب باکتری حل‌کننده فسفات کارآمد، زادمایه آن تهیه می‌شود و در شرایط آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای آزمایش‌های تکمیلی بر روی آنها در حضور گیاهان مختلف انجام می‌گیرد (ساریخانی و همکاران، ۱۳۹۲). تشخیص چشمی و حتی برآورد نیمه‌کمی توانایی انحلال فسفات ریزجانداران به وسیله غربالگری در پلیت امکان‌پذیر است که در آن تولید منطقه شفاف در اطراف کلنی‌های میکروبی در محیط کشت حاوی ترکیبات فسفات نامحلول (به عنوان عتنها منبع فسفر) مورد بررسی قرار می‌گیرد. این روش به روش هاله نیز معروف است. همچنین روش اصلاح‌یافته‌ای با استفاده از محیط حاوی برموفنل بلو ارائه شده‌است که در این محیط، رنگ آبی در اطراف کلنی‌ها به دلیل کاهش pH در نتیجه آزادسازی اسیدهای آلی، بی‌رنگ می‌شود (Rodriguez and Fraga, 1999). توجه به ایراداتی که برای روش مشاهده منطقه شفاف در اطراف کلنی در محیط پیکووسکایا (PKV) گرفته می‌شود (به عنوان نمونه برخی از باکتری‌هایی که فاقد هاله شفاف هستند ممکن است در محیط‌های مایع حل‌کنندگان خوبی باشند)، محیط جدیدی را به نام (NBRIP[2]) ارائه دادند که

*ایمیل نویسنده مسئول: bahmankhoshru@yahoo.com

[2] National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

این روش حدود سه برابر در مقایسه با PKV کارآمدتر است (ساریخانی و همکاران، ۱۳۹۲). از جمله محیط کشت‌های جامد موجود برای بررسی توان حل‌کنندگی فسفات، Sperber، PKV، NBRIP، AYG و NBRIY هستند (Nautiyal, 1999).باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق ترشح اسیدهای آلی مانند اسیدگلوکونیک، اسیداگزالیک و اسیدسیتریک موجب کاهش pH خاک در منطقه ریزوسفر شده و در نتیجه سبب افزایش حلالیت فسفر نامحلول می‌شوند (Illmer and Schinner, 1995). با توجه به اینکه ریزجانداران خاک می‌توانند از طریق کاهش pH و ترشح اسیدهای آلی، کانی‌های فسفره نامحلول در ریزوسفر را به شکل‌های قابل جذب فسفر برای گیاه تبدیل کنند، این مطالعه با هدف ارزیابی هم‌بستگی بین تولید اسید توسط PSBها و حل‌کنندگی فسفر معدنی انجام گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

۸ باکتری (Az1، Az2، P1، P2، P3، R1، R2 و R3) از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز دریافت شد که این باکتری‌ها در یک تحقیقی از کودهای زیستی جدا شده‌اند (کودهای زیستی ازتوبارور، فسکو و رویین). در این آزمایش توان حل‌کنندگی فسفر کم‌محلول تری‌کلسیم‌فسفات توسط این جدایه‌های باکتریایی در محیط اسپربر جامد و مایع و نیز الکساندروف مایع ارزیابی شد. در این دو محیط مایع سعی شد تا ضمن اندازه‌گیری فسفر و پتاسیم محلول، pH محیط مایع نیز اندازه‌گیری گردد و در ادامه هم‌بستگی بین این دو مورد بررسی قرار گرفت.

روش نیمه کمی حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات)

برای انجام این آزمون از محیط کشت اسپربر (اسپربر ۱۹۵۸) استفاده شد که در این محیط تری‌کلسیم فسفات به عنوان تنها منبع فسفر بود. برای هر سویه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به سه قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری تلقیح و ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در چهار نوبت ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشد یافته (Colony Diameter) و نیز قطر هاله شفاف (شامل قطر کلنی و بخش شفاف اطراف آن) حاصل از انحلال فسفات (HD) به دقت اندازه‌گیری شد، متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در هر نوبت برای هر جدایه محاسبه گردید (Sperber, 2010).

ارزیابی انحلال فسفر در محیط مایع اسپربر و الکساندروف

از جدایه‌ها کشت شبانه در محیط مایع NB تهیه و از سوسپانسیون باکتریایی ۵۰۰ میکرولیتر به هر ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر و برای ارزیابی در محیط الکساندروف، به محیط کشت الکساندروف (جدول۱) افزوده شد (SubbaRao, 1988). ارلن‌ها به مدت شش روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از انکوباسیون، ارلن‌ها از شیکر خارج شدند و با ۵۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. سپس دو میلی‌لیتر از محلول زلال رویی به لوله‌های شیشه‌ای تمیز انتقال داده شد و پس از اندازه‌گیری pH محلول روشناور با استفاده از pH متر، میزان فسفر محلول در محیط اسپربر و الکساندروف توسط جدایه‌های باکتریایی اندازه‌گیری شد. به هر کدام شش میلی‌لیتر آب مقطر و دو میلی‌لیتر معرف زرد (معرف نیتروواناد و مولیبدات) افزوده شد. پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر، میزان جذب نمونه‌ها قرائت شد. در پایان میزان حلالیت فسفر جدایه‌ها از طریق مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده توسط KH2PO4 محاسبه شد.

ارزیابی انحلال فسفر در محیط جامد MS[1]

محیط MS با تغییراتی در اجزای محیط Sperber تهیه شد و علاوه بر تعیین HD/CD، دارای مزیت تعیین کارایی اسید تولید شده توسط باکتری نیز می‌باشد. در این محیط کشت از منبع تری‌کلسیم فسفات و معرف متیل‌رد استفاده شده‌است. پلیت‌های حاوی محیط کشت MS را به چهار قسمت تقسیم کرده و در هر قسمت ۱۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌ها اضافه و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت هفت روز خوابانیده شدند. پس از انکوباسیون قطر کلنی‌های رشدیافته و قطر هاله‌های شفاف اندازه‌گیری شدند و متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی برای هرکدام از جدایه‌ها

[1] Modified Sperber

محاسبه شد. کارایی اسید (Acid Efficiency) هرکدام از جدایه‌ها با استفاده از معادله (۱) بدست آمد (شعاع هاله (HR)[1]، شعاع کلنی (CR)[2] و شعاع اسید (AR)[3]):

$$\%AE= ((HR-CR)/AR) \times 100$$ معادله ۱

میزان آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا

برای انجام این آزمون در محیط مایع، ابتدا کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB انجام پذیرفت و به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت برای تلقیح در ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) یا سیاه (بیوتیت) استفاده شد. برای نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری نیز ۵۰۰ میکرولیتر محیط NB استریل افزوده شد. پس از تلقیح میکروبی تحت شرایط فوق‌الذکر، انکوباسیون به مدت یک هفته در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون اجزای محیط با ۶۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شد و از محلول رویی برای تعیین میزان پتاسیم آزاد شده استفاده شد (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۶).

جدول ۱- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌ها

محیط کشت	اجزای محیط کشت (گرم بر لیتر)
NB	Peptone 5; NaCl 5; Yeast Extract 1.5; Meat extract 1.5
Sperber	Glucose 10; Yeast extract 0.5; $CaCl_2$ 0.1; $MgSO_4.7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO4)_2$ 2.5; Agar 15.
Aleksandrov	Glucose 5; $Ca_3(PO_4)_2$ 2; $MgSO_4.7H_2O$ 0.5; $FeCl_3$ 0.005; $CaCO_3$ 0.1; Mica 2
MS	Glucose 10; Yeast extract 0.5; $MgSO_4.7H_2O$ 0.25; $Ca_3(PO4)_2$ 2.5; Methyl red (%1) 1.5ml ; Agar 15.

تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش به صورت درون‌شیشه‌ای و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS آنالیز شده و نمودارها نیز از طریق نرم افزار Excel ترسیم شد.

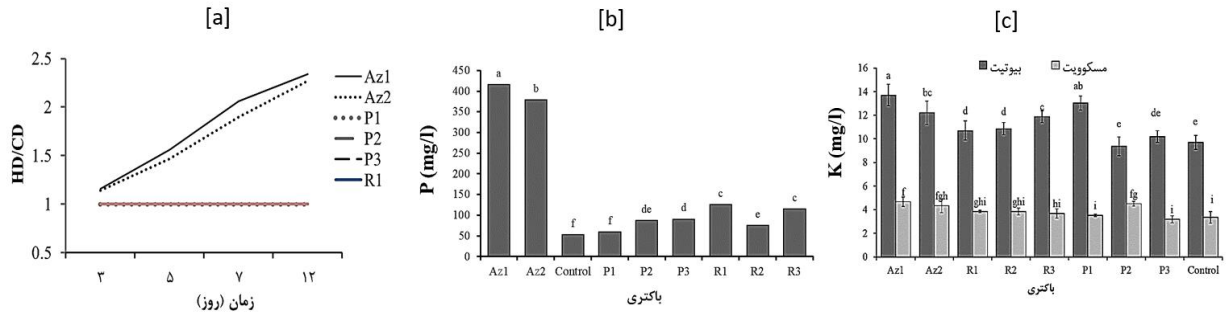
نتایج و بحث

توان حل‌کنندگی فسفات کم‌محلول و آزاد سازی پتاسیم

اندازه‌گیری قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات معدنی نامحلول و محاسبه متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) مشخص کرد که تنها دو جدایه Az1 و Az2 می‌توانند در محیط جامد اسپربر تشکیل هاله بدهند. جدایه‌های Az1 و Az2 به ترتیب با مقادیر ۲/۳۴ و ۲/۲۷ برای نسبت قطر هاله به قطر کلنی بعد از گذشت ۱۲ روز بیشترین توانایی انحلال فسفات معدنی را داشتند. در این دو جدایه نسبت قطر هاله به قطر کلنی با گذشت زمان افزایش یافت. جدایه‌های P1، P2، P3، R1، R2 و R3 نتایجی مشابهی داشتند و هیچگونه هاله‌ای در محیط جامد تشکیل ندادند (شکل ۱a). در بخش آزمون کمی، برای جدایه‌های Az1 و Az2 بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفر به ترتیب با مقادیری برابر با ۴۱۶/۰۷ و ۳۷۸/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان حل‌کنندگی در جدایه P1 (۵۹/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) بدست آمد (شکل۱b). همه باکتری‌های مورد آزمایش به غیر از جدایه P1 (پایین‌ترین میزان انحلال فسفر متعلق به این جدایه بود) با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. با وجود آنکه جدایه های P1، P2، P3، R1، R2 و R3 در محیط جامد قادر به تشکیل هاله شفاف نبودند ولی در محیط مایع قادر به انحلال فسفات به مقدار اندکی بودند. علت این امر می‌تواند تفاوت شرایط انجام آزمایش در دو حالت جامد و مایع باشد به‌طوری‌که در حالت جامد مقدار کمتری از سوبسترا در اختیار باکتری قرار می‌گیرد در حالی که در حالت مایع به‌دلیل وجود تکان‌های شیکر دسترسی سوبسترا برای باکتری کاملاً فراهم شده و می‌تواند مقدار بیشتری از تری کلسیم فسفات را حل کند (خوشرو و همکاران، ۱۳۹۴). نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قدرت رهاکنندگی پتاسیم از کانی‌های موسکویت و بیوتیت نیز نشان داد که سویه‌های مورد آزمایش دارای اثر معنی‌داری بر آزادسازی پتاسیم هستند ($p<0.01$). طبق انتظار، جدایه‌ها

[1] Halo Radius
[2] Colony Radius
[3] Acid Radius

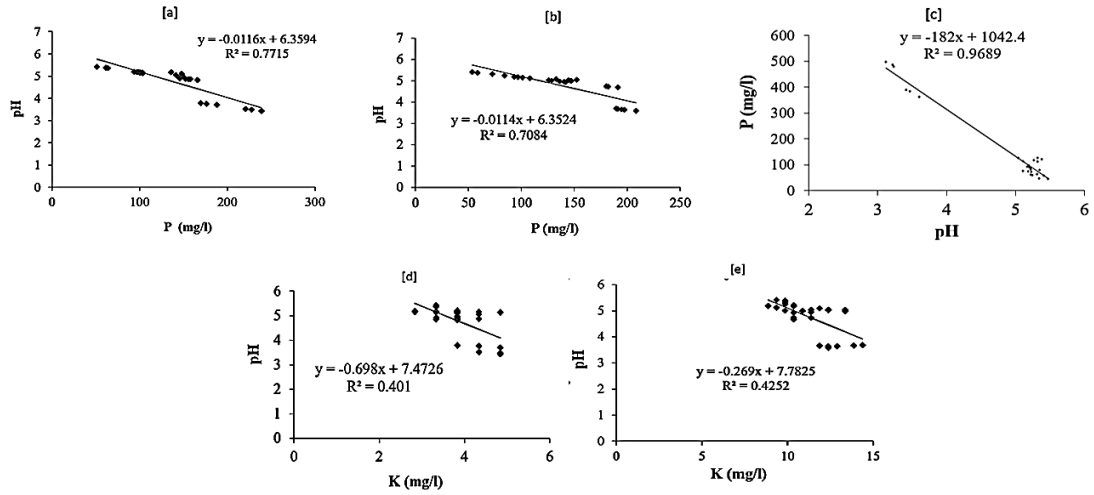
توانستند پتاسیم بیشتری از بیوتیت در مقایسه با موسکویت آزاد کنند. در میکای سیاه (بیوتیت) جدایه‌های Az1 و P1 به ترتیب با ۱۳/۷۰ و ۱۳/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان دادند و در میکای سفید (موسکویت) جدایه‌های Az1، P2 و Az2 به ترتیب با ۴/۶۷، ۴/۵ و ۴/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین توان را در آزادکنندگی پتاسیم نشان دادند (شکل ۱c). در بین جدایه‌ها، جدایه Az1 در حضور هر دو منبع پتاسیم، بیشترین آزادسازی پتاسیم را داشت. کانی بیوتیت نسبت به موسکویت بیشتر مستعد تغییرات زیستی یا هوادیدگی بیولوژیکی از جانب باکتری-هاست. کارایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم با توجه به نوع باکتری و طبیعت کانی‌های حاوی پتاسیم متفاوت می‌باشد. همچنین میزان آزادسازی پتاسیم از این منابع به شرایطی نظیر pH و میزان اکسیژن مرتبط است (مرادی و ساریخانی، ۱۳۹۶).



شکل ۱- حل کنندگی فسفات نامحلول در حالت کمی (a) و نیمه کمی (b) و توان آزادسازی پتاسیم (c)

همبستگی تغییرات pH با فسفر و پتاسیم محلول در محیط اسپربر و الکساندروف

ارزیابی همبستگی بین میزان انحلال فسفات و تغییرات pH نشان داد که بین تغییرات pH محیط کشت حاوی تری‌کلسیم‌فسفات و میزان فسفر محلول، هم‌بستگی معنی‌دار منفی و قوی (R2=0.96) در سطح یک درصد وجود دارد (شکل ۲a) به این معنی که با کاهش pH فسفر قابل جذب خاک به صورت خطی افزایش می‌یابد و در محیط الکساندروف حاوی موسکویت برابر R2=0.71 (شکل ۲b) و الکساندروف حاوی بیوتیت برابر R2=0.77 بود (شکل ۲c). هم در محیط اسپربر هم در محیط الکساندروف این رابطه معکوس مشاهده شد (شکل ۲). در بررسی هم‌بستگی pH با پتاسیم محلول در محیط الکساندروف نیز نتایج نشان داد که بین pH اندازه‌گیری شده و آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتریایی، در مقایسه با هم‌بستگی انحلال فسفر و pH، همبستگی غیرمعنی‌دار منفی و ضعیفی مشاهده شد که برای بیوتیت (R2=0.42) (شکل ۲e) از موسکویت (R2=0.40) (شکل ۲d) بیشتر بود.



شکل ۲- همبستگی pH با فسفر و پتاسیم محلول در محیط های اسپربر (a, b &c) و الکساندروف (d & e)

ارزیابی انحلال فسفات در محیط جدید MS

نتایج نشان داد که در محیط MS به غیر از جدایه‌های Az1 و Az2، هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به ایجاد هاله شفاف نبودند (همانند محیط اسپربر جامد-شکل ۳a). در محیط MS، رنگ محیط کشت پیش از رشد باکتری‌ها زرد متمایل به نارنجی بوده (pH تقریباً خنثی) و پس از رشد باکتری‌ها، اطراف کلنی‌های رشدیافته که توان انحلال فسفات داشتند، هاله قرمزرنگی که ناشی از اسیدی شدن محیط بود تشکیل گردید (شکل ۳a). علت تشکیل رنگ قرمز همان وجود معرف متیل رد بوده که یک شاخص pH است و در محدوده بین pH= 6 (زرد) و pH= 4.4 (قرمز) واکنش نشان می دهد. اسیدیته ای که در آن معرف متیل‌رد قادر است تا تغییر رنگ ایجاد نماید بسیار کمتر از سایر معرفهای بیولوژیکی بوده و تنها در مجاورت اسیدیته بالا، قادر به ایجاد واکنش است. کارایی اسید تولید شده برای این دو جدایه با استفاده از معادله۱ به دست آمد که برای Az1 برابر ۱۳/۸ و برای Az2 برابر ۱۰/۵۲ درصد محاسبه شد (جدول۲).

[a] [b]



شکل۳- ارزیابی انحلال فسفر در محیط جامد MS

جدول۲- ارزیابی کارایی اسید در تشکیل هاله انحلال در محیط MS

جدایه باکتری	%AE	HD/CD	HR-CR(cm)	AR(cm)
Az1	۱۳/۸	۱/۷۹	۰/۲۵	۱/۸
Az2	۱۰/۵۲	۱/۵۷	۰/۲	۱/۹

رابطه منفی بین pH و میزان فسفر حل‌شده توسط پژوهشگران بسیاری گزارش شده است (Awasthi, و همکاران ۲۰۱۱). با افزایش جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، مقدار pH ۳/۲ تا ۴ واحد کاهش می‌یابد که می‌توان گفت انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی نتیجه‌ای از اثر ترکیبی کاهش pH و تولید اسیدهای آلی به ویژه اسید گلوکونیک (Gluconic acid) است (Krishnaveni, 2010). ریزجانداران حل‌کننده فسفات با تولید اسیدهای آلی موجب افزایش حلالیت فسفات‌های کم‌محلول معدنی می‌شوند. pH یکی از عوامل مهم در انحلال فسفر است و باکتریهای حل‌کننده فسفات، pH خاک را از طریق تولید انواع اسیدهای آلی کاهش داده و از این طریق سبب دسترسی بیشتر به عناصری مانند فسفر و پتاسیم می‌شوند و فسفات‌های موجود در مواد فسفردار مختلف را آزاد می‌کنند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که کاهش pH می‌تواند مکانیسم غالب این جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی فسفات باشد (Rodríguez and Fraga 1999).

نتیجه‌گیری

ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای انحلال و آزادسازی فسفات و پتاسیم تجمع یافته در خاک زمانی بیش‌تر احساس می‌شود که بدانیم منابع فسفاته و پتاسه موجود در خاک قابلیت تامین فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد و می‌بایست این منبع عظیم فسفر و پتاسیم را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. استفاده از ریزجانداران خاکزی که توانایی انحلال فسفات‌ها و و آزادسازی پتاسیم را دارند یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر و پتاسیم در خاک‌ها است. ارزیابی کمی و کیفی باکتری‌های حل‌کننده فسفر در مقالات مختلفی ارائه و گزارش شده است ولی در این مقاله بیشتر روی بهبود روش ارزیابی انحلال فسفات کم‌محلول (برای حالت نیمه کمی) و نیز بررسی وجود همبستگی بین تغییرات pH محیط ارزیابی با تغییرات فسفر و پتاسیم محلول (قابل جذب گیاه) تمرکز شد

که نتایج نسبتاً خوبی بدست آمد که نشان دهنده وجود همبستگی قوی و منفی بین pH با غلظت فسفر محلول و نیز ارائه محیط بهبود یافته اسپربر اصلاح شده (MS) بود.

منابع

خوشرو ب.، ساریخانی م ر.، علی‌اصغرزاد ن.، زارع پ. ۱۳۹۴. ارزیابی ویژگی‌های مهم افزایندگی رشد گیاه در باکتری‌های جدا شده از کودهای زیستی بارور۲، بیوسوپرفسفات، سوپرنیتروپلاس و نیتروکسین. تحقیقات کاربردی خاک. جلد۳، شماره۱، ۵۲-۳۹.

ساریخانی، م.ر.، ملبوبی، م.ع.، ابراهیمی، م. ۱۳۹۲. باکتری‌های حل‌کننده فسفات: جداسازی باکتریها و ژنهای رمزکننده حل‌کنندگی فسفات، مکانیسم و ژنتیک انحلال فسفات. بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶(۱)، ۱۱۰-۷۸.

مرادی، ش.، ساریخانی، م.ر. ۱۳۹۶. بررسی اثرات متقابل منابع مختلف فسفر و پتاسیم در رفتار انحلال فسفر و پتاسیم برخی از جدایه‌های باکتریایی. تحقیقات کاربردی خاک، ۵(۱)، ۳۴-۲۵.

Awasthi, R., Tewari, R. and Nayyar, H. 2011. Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. International Journal of Microbiology. 2, 484-503.

Illmer, P. and Schinner. F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry, 27, 257–263.

Keshavarz Zarjani, J., Aliasgharzad, N., Oustan, S., Emadi, M. and Ahmadi, A. 2013. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. Archives of Agronomy and Soil Science, 59, 1713-1723.

Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. Agronomy for sustainable development. Agronomy for Sustainable Development 27, 29-43.

Krishnaveni, M. S. 2010. Studies on phosphate solubilizing bacteria (PSB) in rhizosphere and non-rhizosphere soils in different varieties of foxtail millet (Setariaitalica). International Journal of Agriculture and Food Science Technology, 1, 23-39.

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1), pp.265-270.

Rodriguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, Biotechnology Advances, 17, 319-339.

Sarikhani M.R., Khoshru, B. and Oustan, S. 2016. Efficiency of Some Bacterial Strains in Potassium Release from Mica and Phosphate Solubilization under In-Vitro Conditions. Geomicrobiology Journal, 33(9), 832-838.

Sperber, JI. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Australian Journal of Agricultural Research, 9, 778-781.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Correlation between pH reduction and phosphorus dissolution and potassium release

B Khoshru[1]*, MR Sarikhani[2] and Sh Moradi[1]

[1] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

[2] Associate Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran

Abstract

In this study, 8 isolates (Az1 ،Az2 ،P1 ،P2 ،P3 ،R1 ،R2, R3) from the microbial bank were evaluated for semi-quantitative and quantitative P dissolution, and also a quantitative assessment of the potential of potassium release from muscovite and biotite minerals. In the next step, the correlation between pH changes with two variables of phosphorus solubilizing and potassium releasing was evaluated. The results of the experiment showed that Az1 and Az2 isolates had high ability to dissolve low-soluble phosphate than other isolates, which for the semi-quantitative method were values of 2.34 and 2.27 for the ratio of the diameter of the halo to the colony diameter, and for the quantitative method, the values of 416.07 and 378.84 mg / ml. In assessing the potential for potassium release, the Az1 and P1 isolates were 13.13 and 13.03 mg / l, respectively, of biotite and Az1, P2 and Az2 isolates by 4.67, 4.5 and 4.33 mg / L, respectively from muscovite, showed the highest potassium releasing potential. The results showed that there is a significant negative correlation between the solubility of phosphorus with pH changes in the liquid Speber (R^2=0.96) and Aleksandrov (R^2=0.7). This correlation was non-significant, negative and weak (R^2=0.4) for pH changes and the ability to release potassium from mica minerals. Another result of this experimnt was the introduction of the MS medium for the semi- quantitative evaluation of phosphorus dissolution, and it has advantages over other media used for this method.

Keywords: PGPR, Phosphate solubilizing bacteria, Potassium solubilizing bacteria, Mica

*Corresponding Author: bahmankhoshru@yahoo.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر کاربرد بیوچار و باکتری‌های محرک رشد بر برخی شاخص‌های میکروبیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز در خاک کشت شده با ذرت

*نگار رضائی دانش[۱]، میرحسن رسولی صدقیانی[۲]، محسن برین[۳]، ندا مرادی[۴]

[۱] دانشجوی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۴] استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

به منظور بررسی تأثیر بیوچار حاصل از هرس بقایای سیب و تلقیح باکتری‌های محرک رشد (PGPR) بر برخی از خصوصیات میکروبیولوژیکی خاک آزمایشی به صورت فاکتوریل با دو فاکتور کاربرد باکتری (بدون PGPR و PGPR) و بیوچار (۰ و ۰/۵ درصد وزنی) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در شرایط گلخانه‌ای در دانشگاه ارومیه انجام گرفت. در پایان دوره کاشت ذرت (۶۵ روز)، تنفس میکروبی، تنفس برانگیخته، کربن زیست توده میکروبی، کسرمتابولیکی، شاخص قابلیت دسترسی به کربن و آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی در خاک کشت شده تعیین گردیدند. نتایج نشان داد که افزودن بیوچار و باکتری‌ها به خاک سبب افزایش معنی‌دار شاخص‌های میکروبیولوژیکی و آنزیم فسفاتاز قلیایی نسبت به تیمار شاهد شد و این افزایش در تیمارهای باکتریایی و بیوچار+ باکتری بیشتر بود. تنفس پایه در تیمارهای بیوچار، باکتریایی و بیوچار+ باکتری نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۶۱، ۲/۷۷ و ۲/۷۳ برابر افزایش نشان داد. بیشترین مقدار کربن زیست توده میکروبی در تیمار بیوچار+ باکتری بود. به طور کلی می‌توان گفت که کاربرد بیوچار و تلقیح باکتریایی باعث بهبود خواص میکروبیولوژیکی خاک نسبت به شرایط عدم حضور این تیمارها می‌شود.

کلمات کلیدی: بیوچار، PGPR، شاخص‌های میکروبیولوژیک خاک، فعالیت آنزیمی

مقدمه

حفظ سطح آستانه موادآلی در خاک با توجه به تاثیرات نامناسب تغییر جهانی اقلیم بر سلامت خاک و باروری محصول، برای بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک و همچنین محصولات کشاورزی و عملکرد زیست محیطی ضروری است. وجود ماده آلی علاوه بر اینکه نشان دهنده سلامت و کیفیت خاک است، شاخص مناسبی برای باروری خاک به شمار می‌رود که حاصل برهم کنش فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی است. در یک خاک حاصلخیز میلیون‌ها موجود زنده از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها زندگی می‌کنند. این موجودات نقش مهمی در تجزیه و تخریب مواد آلی خاک و معدنی شدن آن دارند. خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک از جمله ایران به علت نبود پوشش گیاهی کافی و بازگشت مقادیر کم بقایای گیاهی به خاک حاوی ماده‌ی آلی اندکی هستند. برای حل این مشکل چندین راهکار اساسی مطرح شده است که می‌توان بکار بردن بیوچار را به عنوان یک ماده‌ی آلی برای اصلاح ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک پیشنهاد کرد (Lehman و همکاران ۲۰۰۹). کاربرد بیوچار منجر به تغییر در ترکیب و فراوانی جامعه بیولوژیک خاک می‌شود. Karhu و همکاران (۲۰۱۱) گزارشاتی مبتنی بر تأثیر افزودن بیوچار بر افزایش فعالیت میکروبی خاک و در نتیجه تجزیه ماده آلی در خاک‌های جنگلی نیز ارائه دادند. همچنین تنوع جامعه زیستی خاک تأثیر به‌سزایی در کیفیت و باروری آن می‌تواند داشته باشد. یکی از راهکارهای تولید بهینه محصول و حفظ سلامت محیط زیست، فراهم سازی شرایط لازم و ضرورت استفاده بیشتر از ریزجانداران خاکزی و کودهای زیستی (Biofertilizers) می‌باشد. در این میان استفاده از میکروارگانیسم‌های خاک و مخصوصاً باکتری‌ها که با انجام فرآیندهای مختلف زیستی در رشد گیاه و چرخه عناصر غذایی خاک دخالت دارند به‌طور روز افزونی افزایش یافته است. باکتری-های PGPR از طرق مختلفی از جمله تثبیت نیتروژن، تولید سیدروفورهای کمپلکس‌کننده آهن، تولید هورمون‌های گیاهی، سنتز آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات قارچ‌کش رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند (Vanloon, 2007). درجه تأثیر این باکتری‌ها بر رشد و عملکرد تابع عوامل مختلفی چون نوع گیاه (Murty and Ladha, ۱۹۸۸)، سویه باکتری (Baldani و همکاران ۱۹۸۸) و شرایط محیطی (Bhattarai and Hess, 1993) است. به این ترتیب،

[۱]*نویسنده مسئول: negardanesh72@gmail.com

استفاده از باکتری‌های فوق به عنوان کودهای زیستی دارای اثرات ثابتی نبوده و به منظور تولید این محصولات در ابتدا باید ارتباط گیاه، خاک و ریز موجودات خاک مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان ترکیباتی مؤثر و کارآمد از آن‌ها را در جهت بهبود عملکرد گیاهان تولید نمود. با توجه به اینکه اثرات متقابل بیوچار و باکتری بسیار مهم بوده و معمولا اثر افزاینده بر روی شاخص‌های میکروبیولوژیکی و در نتیجه بهبود کیفیت باروری خاک و رشد گیاه دارد و نیز اطلاعات محدودی در رابطه با بررسی اثرات همزمان بیوچار و باکتری‌های محرک رشد بر خواص میکروبیولوژیکی خاک موجود می‌باشد لذا این تحقیق با هدف بررسی تأثیر کاربرد بیوچار و باکتری‌های PGPR بر زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی در خاک کشت شده با ذرت در شرایط گلخانه‌ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۷، در آزمایشگاه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. برای تهیه بیوچار از بقایای هرس سیب استفاده شد. بقایای هرس ابتدا هوا خشک شده و پس از آسیاب کردن، از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و سپس در آون در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (Singh و همکاران ۲۰۱۷). سپس بیوچار سیب در کوره الکتریکی در شرایط گرماکافت آهسته، به مدت ۴ ساعت، در دمای ۳۵۰ درجه سلسیوس و با نرخ افزایش دمای ۵ درجه سلسیوس تهیه شد. سپس برخی ویژگی‌های بیوچار اندازه‌گیری گردید (Singh و همکاران ۲۰۱۷). نمونه خاک مورد مطالعه از اراضی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری تهیه گردید. نمونه خاک پس از انتقال به آزمایشگاه، هوا-خشک شده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک اندازه‌گیری گردید (Sparks et al., 1996) که در جدول ۱ نشان داده شده است تیمارهای بیوچار بر اساس ۰/۵درصد وزنی روی خاک اعمال (۲۰ گرم بیوچار به‌ازای ۴ کیلوگرم خاک) و سپس جهت تهیه مایه تلقیح میکروبی، باکتری‌های سودوموناس فلورسنت (ترکیبی از گونه‌های *P.seudomonas*، *P.aeruginosa* و *P.putida*) در محیط کشت Nutrient Broth شیک شده و یک نمونه محیط کشت (فاقد باکتری) هم برای نمونه‌های شاهد تهیه و شیک شد. برای تلقیح بذرها از روش اضافه کردن محلول باکتری‌ها (۱میلی‌لیتر از سوسپانسیون برای هر بذر) به خاک اطراف بذرها همزمان با کاشت استفاده شد. بذرهای ذرت (*Zea mays* L.) رقم KSC 704 پس از ضدعفونی کردن با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به تعداد شش بذر در مرکز خاک گلدان‌ها کشت گردیدند. پس از جوانه زدن بذرها، چهار بوته سالم‌تر و قوی‌تر از هر گلدان نگه داشته شدند. در طول دوره رشد از آب لوله کشی به منظور آبیاری و برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاهان از محلول غذایی Hoagland استفاده گردید. در پایان دوره پس از گذشت ۶۵ روز عملیات برداشت انجام شده و خاک و گیاه بصورت کامل از هم جدا شدند. کربن زیست توده میکروبی (MBC) (Jenkinson and ladd, 1981)، تنفس پایه (BR) (Anderson, 1982) تنفس برانگیخته با سوبسترا (SIR) (Alef and Nannipieri, 1995)، ضریب متابولیکی (qCO_2) (Anderson و همکاران ۲۰۰۳)، شاخص قابلیت دسترسی به کربن (CAI) (Cheng و همکاران ۱۹۹۳) و آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی (Tabatabai and Bremner, 1969) اندازه‌گیری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور باکتری و بیوچار هر کدام در دوسطح با ۳ تکرار اجرا گردید. تجزیه و تحلیل آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با نرم افزار SPSS و رسم شکل‌ها با نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بیوچار مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. زغال زیستی تهیه شده دارای سطح ویژه و ظرفیت تبادل کاتیونی بالا و درصد کربن آلی زیادی بود.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

بافت خاک	pH	ماده آلی	آهک	نیتروژن کل	EC	فسفر قابل استفاده	پتاسیم قابل استفاده
		(درصد)			$dS\ m^{-1}$	$mg\ kg^{-1}$	
لوم رسی	۸/۳	۰/۴۱	۱۲	۰/۰۲	۰/۰۱۱	۹/۸۱	۳۴۰

جدول ۲-برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بیوچار بقایای هرس سیب

عملکرد	خاکستر	pH	EC	CEC	سطح ویژه	کربن	نیتروژن	هیدروژن	اکسیژن	H/C	O/C
(درصد)			$dS\ m^{-1}$	$cmol_c\ kg^{-1}$	$m^2\ g^{-1}$	(درصد)					
۳۴/۹۴	۱۰/۲۰	۷/۱۱	۰/۰۵	۳۲/۵۳	۲۱۹	۶۴/۰۲	۰/۲۲	۳/۸۹	۲۱/۶۷	۰/۰۶۱	۰/۰۳۴

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی تمامی تیمارها بر روی شاخص‌های میکروبیولوژیکی اندازه‌گیری شده (به غیر از qCO_2) در خاک معنی‌دار بود (جدول ۳). همچنین اثر متقابل بیوچار× باکتری نیز در تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده به غیر از آنزیم اوره‌آز از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر تیمارها بر BR، SIR، MBC، CAI، qCO2 و فعالیت اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		BR	SIR	MBC	qCO_2	CAI	اوره‌آز	فسفاتاز قلیایی
بیوچار	۱	۵۲/۰۸**	۱۸۷۵*	۲۰۷۶۰***	۰/۰۰۰۱ns	۰/۰۰۰۱**	۱۲۵۱۴***	۱۰۹۴۲***
باکتری	۱	۱۰۶۱***	۳۴۷۱۰***	۵۱۹۵۹***	۰/۰۰۰۱***	۰/۰۰۰۲***	۷۴۵۸۹***	۴۰۷۷۳***
بیوچار×باکتری	۱	۶۴/۴۰**	۱۹۹۲**	۷۷۸۵***	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۱۲***	۹/۷۶ns	۱۶۱۸۶***
خطا	۸	۴/۴۸	۱۶۷	۹۳/۴۶	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۱۲۹	۱۹۳
ضریب تغییرات (٪)		۸/۲۹	۴/۰۹	۱/۰۸۷	۸/۳۳	۴/۸۰	۴/۸۰	۳/۵۸

ns ،***، ** و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱، یک و پنج درصد.

تنفس پایه (BR) بیشترین میزان افزایش را در اثر افزودن تیمارها نشان داد و این افزایش در تیمار باکتریایی و بیوچار+باکتری بیشتر از تیمار بیوچار بود، به طوریکه میزان این افزایش در تیمارهای باکتریایی و بیوچار-باکتری ۲/۷ برابر و در تیمار بیوچار ۱/۶ برابر نمونه شاهد بود. نتایج در مورد تنفس برانگیخته (SIR) هم دقیقاً همین‌گونه بود به‌طوریکه میزان آن در تیمارهای باکتریایی و بیوچار+ باکتری ۱/۵ برابر و در تیمار بیوچار ۱/۱ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته بود. در واقع با افزایش جمعیت باکتری‌ها این ریزجانداران باعث افزایش ترشحات ریشه‌ای و به دنبال آن افزایش سوبسترای کربنی در خاک و در نتیجه افزایش تنفس وابسته به سوبسترا شده‌اند. همچنین به دنبال افزودن بیوچار به خاک با افزایش نسبت C/N معدنی شدن رخ داده و این افزایش در معدنی شدن زمان لازم برای بیوچار جهت تجزیه شدن و فراهم شدن عناصر غذایی را کاهش می‌دهد و لذا با افزودن بیوچار، رشد گیاه و ریشه بیشتر شده و جمعیت میکروبی و فعالیت آن‌ها و در نتیجه تنفس پایه و تنفس برانگیخته افزایش می‌یابد (Dehgahn و همکاران ۲۰۱۲) (جدول ۴).

کربن زیست توده‌ی میکروبی قسمتی از کربن آلی خاک است که مربوط به کربن موجود در بدن و دیواره‌ی سلولی ریزجانداران خاک به ویژه باکتری‌ها بوده و در شرایط طبیعی ۵-۱ درصد کربن آلی خاک را تشکیل می‌دهد. مقادیر کربن زیست توده میکروبی (MBC) در تیمارهای بیوچار، باکتری، بیوچار+ باکتری در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱۸/۹۸، ۲۵/۴۰ و ۲۹/۸۱ درصد افزایش یافت (جدول ۴). شاخص قابلیت دسترسی کربن نیز در تیمار باکتری در مقایسه یا تیمار شاهد و بیوچار بیشتر بود. باکتری‌های PGPR با افزایش میزان ترشحات ریشه‌ای باعث افزایش سوبسترای کربنی در خاک و در نتیجه افزایش شاخص دسترسی به کربن می‌شوند. همچنین افزایش کربن زیست‌توده میکروبی و شاخص دسترسی به کربن خاک در اثر افزودن بیوچار می‌تواند به این دلیل باشد که بیوچار با داشتن ساختار متخلخل و سطح ویژه بالا و نیز به عنوان منبعی از کربن آلی می‌تواند زیستگاه مناسبی را برای ریزجانداران خاک به‌ویژه باکتری‌ها فراهم کند (Zhu و همکاران، ۲۰۱۷). مقدار ضریب متابولیکی (qCO_2) در تیمارهای باکتریایی و بیوچار+ باکتری، ۲/۱ برابر و در تیمار بیوچار ۱/۳ برابر نمونه شاهد بود (جدول ۴). به نظر می‌رسد با افزودن بیوچار به خاک جمعیت ریزجانداران و به ویژه باکتری‌ها در خاک افزایش یافته و هنگامی که جمعیت باکتری‌های خاک افزایش یابد، راندمان جذب کربن کاهش و در نتیجه کربن بیشتری صرف تولید انرژی از طریق تبدیل کربن آلی به CO_2 برای زیست توده‌ی میکروبی می‌گردد که مسلما افزایش qCO_2 را به همراه خواهد داشت (Dilly, 2005).

در واقع ریزجانداران خاکزی برای بهبود فعالیت خود به منابع کربن احتیاج دارند، زمانیکه این منابع محدود باشند ریزجانداران و علی‌الخصوص باکتری‌ها از آن بیشتر برای فعالیت‌های حیاتی استفاده کرده و کمتر آن را ذخیره می‌کنند ولی زمانیکه به اندازه کافی سوبسترای کربنی در اختیار داشته باشند (افزودن بیوچار) کمتر آن را به‌صورت تنفس هدر داده و بیشتر آن را ذخیره کرده و صرف ساختن اندام‌های جدید می‌کنند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین تأثیر تیمارها بر مقدار qCO_2 ،CAI ،MBC ،SIR ،BR

تیمارها	BR	SIR	MBC	qCO_2	CAI
	$mgCO_2\ kg^{-1}soil\ day^{-1}$		$mg\ kg^{-1}$	$mgCO_2\ kg^{-1}MBC\ day^{-1}$	
شاهد	۱۲/۷۱ c	۲۴۲ c	۷۴۸ d	۰/۰۱۷ c	۰/۰۵۲ c
باکتری های PGPR	۳۵/۱۷ a	۳۷۰ a	۹۳۸ b	۰/۰۳۷ a	۰/۰۹۵ a
بیوچار	۲۰/۵۳ b	۲۸۷ b	۸۹۰ c	۰/۰۲۳ b	۰/۰۷۱ b
بیوچار+ باکتری	۳۴/۷۱ a	۳۶۹ a	۹۷۱ a	۰/۰۳۶ a	۰/۰۹۴ a

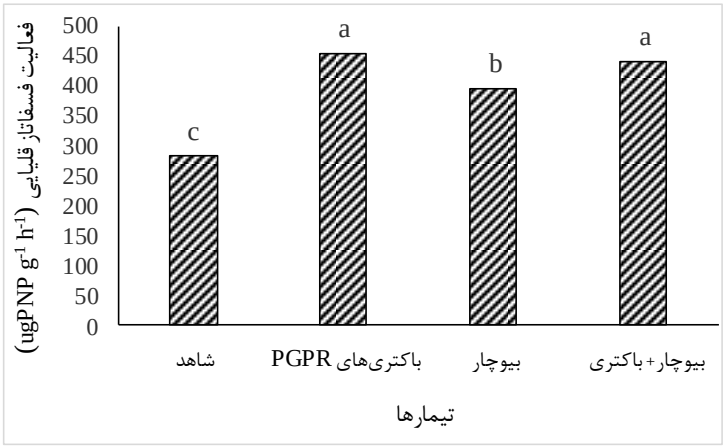
* اعدادی که دارای حروف مشترک در هر ستون هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی بیوچار و باکتری‌های محرک رشد بر روی فعالیت آنزیم اوره‌از

	تیمار بیوچار		تیمار باکتری	
	شاهد	بیوچار	شاهد	باکتری
آنزیم اوره‌آز $\mu gN\ g^{-1}\ 2h^{-1}$	۲۰۴ b	۲۶۹ a	۱۵۷ b	۳۱۵ a

* اعدادی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن معنی‌دار نمی‌باشند.

مقایسه میانگین اثرات اصلی بیوچار و باکتری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نشان داد که فعالیت این آنزیم در تیمار بیوچار و باکتری در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۲ و ۱۰۰ درصد بیشتر بود (جدول ۵). همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل بیوچار و باکتری‌های PGPR بر فعالیت انزیم فسفاتاز قلیایی در شکل ۱ نشان داده شده است. مقدار آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز در تیمارهای باکتریایی و بیوچار+ باکتری به ترتیب ۱/۶ و ۱/۵ برابر نسبت به نمونه شاهد و در تیمار بیوچار ۱/۳ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. افزودن مواد آلی نظیر بیوچار به خاک باعث افزایش زیست توده میکروبی، منابع کربن و عناصر غذایی و بهبود شرایط خاک نظیر افزایش نگهداشت آب در خاک و افزایش تخلخل شده و در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین افزودن ماده آلی به خاک باعث افزایش فعالیت باکتری‌ها و در نتیجه بهبود و افزایش فعالیت آنزیمی می‌شود زیرا آنزیم‌های همراه بیوچار به روش کاهش انرژی برای فعالیت باکتری‌های خاک به منظور سنتز آنزیم‌ها منجر به افزایش فعالیت آن‌ها و سرعت تجزیه بیوچار در خاک شده و همچنین با تجزیه نسبی در خاک با جذب سطحی و حبس فیزیکی آنزیم‌ها سبب حفاظت از آن‌ها در برابر هیدرولیز آنزیمی می‌شوند (Kurtev و همکاران ۲۰۰۲).



شکل ۱- تأثیر بیوچار و باکتری‌های محرک رشد بر روی فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج نشان داد زمانیکه باکتری‌ها همراه بیوچار بودند باعث افزایش بیشتری در شاخص‌ها نسبت به حالتی که فقط بیوچار در خاک بود شدند. بنابراین نتایج این پژوهش بر تأثیر مثبت و معنی‌دار کاربرد بیوچار و باکتری‌های PGPR بر ویژگی‌های کیفی خاک دلالت دارد. واضح است که تأثیر باکتری‌ها بر خصوصیات میکروبیولوژیکی خاک بیشتر از بیوچار بوده و مصرف هم‌زمان این دو باعث افزایش پارامترها نسبت به تیمار بیوچار شد. البته لازم به ذکر است که به جز MBC در بقیه شاخص‌ها بین تیمارهای باکتری و بیوچار+باکتری اختلاف معنی‌دار نبوده و به یک میزان باعث افزایش شاخص‌ها شدند که نشان دهنده این مطلب است که بیوچار اثر حضور باکتری را بر MBC تشدید کرد. به دنبال افزودن بیوچار به خاک فعالیت ریزجانداران خاکزی اعم از باکتری و قارچ و ... افزایش یافته و در نتیجه سبب افزایش کیفیت پارامترهای میکروبیولوژیکی و نهایتا موجب بهبود کیفیت خاک می‌شود. لذا با توجه به اهمیت مواد آلی به ویژه بیوچار و ریزجانداران خاکزی به علی‌الخصوص باکتری‌های محرک رشد در خاک و استفاده از آن‌ها به عنوان راه‌حلی مفید و اقتصادی در جهت بهبود کیفیت خاک و در نتیجه تولید بیشتر محصول توصیه می‌گردد.

منابع

Alef, K. and Nannipieri, P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London.

Anderson, J. P. E. 1982. Soil Respiration. In: Page A. L. et al. (Eds). Methods of Soil Analysis. 2nd ed. Part 2. American Society of Agronomy, U.S.A. PP. 831-872.

Anderson, T. H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. Agriculture. Ecosystems & Environment, 98, 285-293.

Baldani, L. D., Baldani J. I. and Dobereiner. J. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. Biology and Fertility Soils, 4: 37–40.

Bhattarai, T. and Hess. D. 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with Azospirillum spp. of Nepalese origin. Plant & Soil. 151: 67–76.

Dehghan Manshadi, H., Bahmanyar, M. A., Lakzian, A. and Salek Gilani, S. 2012. Effect Application of Sewage Sludge and Sewage Sludge Enriched with Chemical Fertilizer on the Rate of Organic Carbon, Respiration and Enzyme Activity of Soil under Basil Cultivation. Journal of Water and Soil, 554-562.

Dilly, O. 2005. Microbial energetics in soils. In Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 123-138.

Jenkinson, D. S. and Ladd, J. N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Powl, E. A., Ladd, J. N. (Eds) Soil biochemistry.Dekker, New York, pp. 415–417.

Karhu, K, M. Tuomas, B. Irina, and R. Kristiina. 2011. Biochar addition to agricultural soil increased CH_4 uptake and water holding capacity–Results from a short–term pilot field study. Agriculture, Ecosystem & Environment, 140: 309–313.

Kourtev, P. S. Ehrenfeld, J. G. and Huang, W. Z. 2002. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. Soil Biology and Biochemistry, 34, 1207-1218.

Lehmann, J. and Joseph, S. 2009. Biochar for environmental management, Earthscan publishing, London.

Murty, M. G. and Ladha. J. K. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant and Soil, 108, 281-285.

Singh, B., Camps-Arbestain, M. and Lehmann, J. 2017. Biochar: A Guide to Analytical Methods. CSIRO Publishing. 320p.

Sparks, D. L. Page, A. L. Helmke, P. A. Loeppert, R. H. Soltanpour, P. N. Tabatabai, M. A. Johnston, C. T. and Sumner, M. E. 1996. Methods of soil analysis Part 3- Chemical methods. Soil Science Society of America Book Ser. 5, Madison, Wiscons in, USA, p. 1390.

Tabatabai, M. A. and Bremner, J. M. 1969. Use of pnitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry, 1, 301-307.

Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Europen Journal of Plant Pathology, 119, 243–254.

Zhu, X., Chen, B., Zhu, L. and Xing, B. 2017. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. Environmental Pollution, 227, 98-115.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of biochar and PGPR bacteria application on some microbiological indices and activity of urease and alkaline phosphatase in soil grown with corn

Rezaeidanesh[*1], N., Rasouli-Sadaghiyani[2], M. H., Barin, M[3]. Moradi, N[4].

[1] MSc. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

[2] Professors, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

[3] Assistance Prof. Soil Science, Dept. of Soil Science, Urmia University, Urmia, Iran.

[4] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

In order to study the effect of biochar from trees prunnings and inoculation of PGPR on some microbiological properties of soil, a study was carried out as a factorial experiment based on a randomized complete design with two factors including bacteria (without PGPR and PGPR) and biochar (0, 0.5%) in three replications under under greenhouse condition at Urmia University. At the end of the corn planting period (65 days), bacterial respiration (BR), substrate-induced respiration (SIR), microbial biomass carbon (MBC), metabolic quotient index (qCO_2), carbon availability index (CAI), urease and alkaline phosphatase (ALP) enzymes activities were determined in the soil. The results showed that the addition of biochar and bacteria to soil significantly increased the microbiological indices and the enzymes of alkaline phosphatase compared to the control treatment. This increase was higher in bacterial and biochar + bacterial treatments. Basal respiration (BR) in biochar, bacterial and biochar + bacteria treatments was 1.61, 2.77 and 2.73 fold compared with control, respectively. The highest amount of microbial biomass (MBC) and urea enzyme was in Biochar + bacterial treatment. In general, it can be said that biohazard application and bacterial inoculation improve the microbiological properties of the soil relative to the absence of these treatments.

Keywords: Biochar, PGPR, Soil microbiological indices, Enzyme activity

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

نقش باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر رشد و جذب عناصر غذایی کم‌مصرف در قلمه‌های انار

فرهاد آذرمی آتاجان[۱*]

[۱] استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

چکیده

انار یکی از محصولات مهم و با ارزش باغبانی ایران است. به‌دلیل آهکی بودن و pH بالای خاک در بسیاری از باغات انار در ایران، جذب عناصر کم‌مصرف توسط درختان و نهال‌های انار پایین بوده و این امر کاهش رشد و عملکرد آن را در پی داشته است. یکی از راهکارهای نوین برای افزایش جذب عناصر کم‌مصرف در گیاهان، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشد. در این پژوهش تأثیر ۴ سویه باکتری *Pseudomonas* sp. (شاهد (B_0)، B_1، B_2، B_3 و B_4) با توانایی تولید سیدروفور بر رشد و جذب عناصر آهن، روی، منگنز و مس توسط قلمه‌های انار در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از این باکتری‌ها موجب افزایش وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار شد. بیشترین وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار به‌ترتیب برابر با ۲/۵۷ و ۲/۰۴ گرم بر نهال از کاربرد سویه B_4 بدست آمد. هم‌چنین تلقیح با این باکتری‌ها موجب افزایش جذب عناصر آهن، روی، منگنز و مس در برگ قلمه‌های انار شد که نقش سویه‌های B_1 و B_4 در این افزایش بیشتر از دیگر سویه‌ها بود. بنابراین استفاده از باکتری‌های تولید کننده سیدروفور می‌تواند نقش مهمی در بهبود وضعیت تغذیه‌ای و رشد قلمه‌های انار داشته باشد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های محرک رشد گیاه، تغذیه انار، جذب آهن، ریشه‌زایی

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. از خانواده *Punicaceae* به‌صورت گسترده‌ای در مناطق گرمسیری و نیم‌گرمسیری کشت می‌شود. در بسیاری از منابع از ایران به‌عنوان منشاء این گیاه نام برده شده و کشور ایران از لحاظ تنوع، کیفیت و سطح زیر کشت اولین تولید کننده انار در دنیا می‌باشد. سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۹۰ هزار هکتار و تولید سالیانه آن حدود یک میلیون تن می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۵). یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و عملکرد محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک، فراهمی پایین عناصر غذایی کم‌مصرف در خاک می‌باشد (Hajiboland and Amirzad, 2010). عمده‌ترین دلایل این امر شامل مقدار زیاد کربنات کلسیم، pH بالا، کود دهی نامتعادل، مواد آلی کم و شوری خاک و آب و آبیاری می‌باشد. با وجود مشخص شدن ضرورت عناصر غذایی کم‌مصرف مانند آهن، روی، منگنز و مس برای رشد و عملکرد گیاهان، کمبود این عناصر از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده اختلالات تغذیه‌ای در گیاهان در بیشتر نقاط جهان می‌باشد (Alloway, 2008).

روش‌های مختلفی برای افزایش فراهمی عناصرغذایی به‌خصوص عناصر کم‌مصرف برای گیاه وجود دارد. اگرچه افزودن کودهای محتوی این عناصر می‌تواند تا حدودی کمبود آن‌ها را برای گیاه جبران کرده و موجب افزایش رشد و عملکرد گیاه شود، اما مطالعات نشان داده است که بخش اعظم این کودها به‌ویژه در خاک‌های آهکی تثبیت شده و از دسترس گیاه خارج می‌شوند. در سال‌های اخیر استفاده از ریزجانداران مفید خاکزی یک راهکار نوین برای افزایش فراهمی عناصرغذایی در ناحیه ریزوسفر مورد توجه قرار گرفته است. باکتری‌های محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های ریزوسفری هستند که با سازوکارهای مختلفی مانند انحلال ترکیبات کم‌محلول و نامحلول عناصرغذایی و در نتیجه افزایش فراهمی آن‌ها، تثبیت نیتروژن، کنترل بیمارگرهای گیاهی با تولید سیانید هیدروژن، ترکیبات ضد میکروبی و رقابت برای جذب عناصرغذایی، تولید سیدروفور، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و سمیت عناصر و تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول‌استیک‌اسید (IAA) رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Glick, 2014). برخی از PGPRها مواد کلات کننده‌ای با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور ترشح می‌کنند که تمایل زیادی به جذب آهن دارند. سیدروفور ترشح شده توسط باکتری‌ها با بخش اعظم آهن فریک موجود در خاک کمپلکس‌های پایدار تشکیل می‌دهد که این امر می‌تواند به تغذیه آهن گیاه کمک نموده و از طرف دیگر آهن را از دسترس قارچ‌های بیماری‌زا خارج نماید (Glick, 1995). این ترکیبات توسط سلول‌های میکروبی و به‌منظور مقابله با تنش حاصل از کمبود فرم قابل جذب آهن ترشح می‌شوند. بدین طریق آهن برای سلول‌هایی که دارای پذیرنده‌های غشایی اختصاصی باشند، قابل دسترس می‌گردد. ریزجانداران خاک در شرایط کمبود آهن ($Fe^{+3}<10\mu M$) با ترشح سیدروفور که کمپلکس پایداری با آهن (III) می‌دهد، آن‌را به‌صورت محلول و قابل دسترس درمی‌آورند (Leoni و همکاران ۲۰۰۲). سودوموناس‌های تولید کننده سیدروفور مانع جذب آهن توسط بیمارگرهای گیاهی شده و رشد گیاه را

* ایمیل نویسنده مسئول: farhadazarmi@birjand.ac.ir

بهبود می‌بخشند. سیدروفور ترشح شده توسط باکتری‌ها، با آهن فریک خاک تشکیل کمپلکس پایدار داده و با جلوگیری از تثبیت و غیرفعال شدن آن در خاک، تغذیه آهن گیاه را بهبود می‌بخشد. نقش سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه در جذب عناصر کم‌مصرف در گندم (رسولی صدقیانی و همکاران،۱۳۸۷)، ذرت (Ghavami و همکاران، ۲۰۱۶) و پسته (Azarmi و همکاران، ۲۰۱۶) گزارش شده است.

با توجه به غلظت پایین فرم قابل‌جذب عناصر غذایی کم‌مصرف در خاک و هم‌چنین آهکی بودن خاک‌های باغات انار در منطقه مرکزی ایران، هدف از این پژوهش بررسی نقش باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر رشد و جذب عناصر غذایی کم‌مصرف در قلمه‌های انار بود.

مواد و روش‌ها

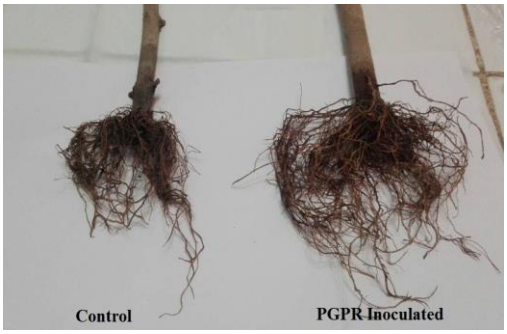
به‌منظور بررسی نقش باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر رشد و جذب عناصر غذایی کم‌مصرف در قلمه‌های انار، چهار سویه باکتری *Pseudomonas* sp. جداسازی شده از ریزوسفر درختان پسته با توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS-Agar (جدول ۱) انتخاب و در آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارها شامل سطوح باکتری تولید کننده سیدروفور و نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری (شاهد (B_0)، B_1، B_2، B_3 و B_4) با سه تکرار بود. برای این پژوهش یک نمونه خاک مناسب انتخاب و پس از اندازه‌گیری برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن (جدول ۲)، در هر گلدان ۲ کیلوگرم خاک عبور داده شده از الک ۴ میلی‌متری ریخته شد. برای تهیه نهال‌ها ابتدا قلمه‌های انار تهیه و بعد از ریشه‌دار شدن آن‌ها، قلمه‌های هم‌اندازه و هم‌شکل انتخاب و در هر گلدان یک قلمه کشت گردید. برای تلقیح، به محیط ریشه هر قلمه دو میلی‌لیتر سوسپانسیون آماده شده باکتری با جمعیت 10^8 سلول در میلی‌لیتر در زمان کشت اضافه شد. آبیاری قلمه‌ها با آب مقطر انجام شده و ۱۰ هفته بعد قلمه‌ها برداشت و شاخص‌های مختلف شامل وزن خشک برگ، وزن خشک ریشه و جذب عناصر آهن، روی، منگنز و مس در برگ‌ها اندازه‌گیری شد. غلظت عناصر کم‌مصرف در برگ قلمه‌های انار پس از خاکستر کردن نمونه‌ها و عصاره‌گیری با اسید کلریدریک ۲ نرمال، با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها به‌روش LSD و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel انجام شد.

جدول ۱- تولید سیدروفور و دیگر خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش در محیط CAS-Agar

نام باکتری	B_1	B_2	B_3	B_4
سیدروفور (قطر هاله به قطر کلونی)	۲/۸۶	۲/۴۷	۲/۰۹	۲/۳۴
ایندول استیک اسید (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۵/۱۵	۶/۵۹	۲/۹۹	۱۰/۲
انحلال فسفر (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۴۹۸	۴۹۹	۷۰۵	۵۲۰

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

بافت	اسیدیته	قابلیت هدایت الکتریکی	آهن	روی	منگنز	مس
		$dS\ m^{-1}$	$mg\ kg^{-1}$			
لومی	۷/۸	۱/۴۲	۲/۶۸	۰/۳۱	۳/۸۱	۱/۲۲



شکل ۱. تأثیر باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر ریشه‌زایی قلمه‌های انار

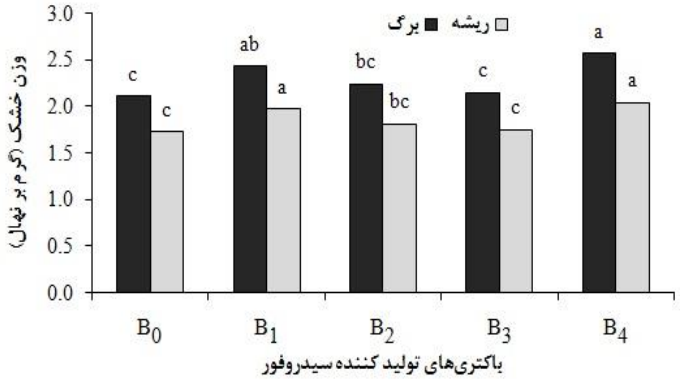
نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، کاربرد باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار معنی‌دار شد (جدول ۳). براساس نتایج، باکتری‌های استفاده شده موجب افزایش رشد قلمه‌های انار مانند ریشه شد (شکل ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فقط باکتری‌های B_1 و B_4 تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار داشتند، به‌طوری‌که تلقیح با این دو باکتری وزن خشک برگ را به‌ترتیب ۱۵ و ۲۲ درصد و وزن خشک ریشه را به‌ترتیب ۱۰ و ۱۸ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند (شکل ۲). یکی از مهم‌ترین اثرات باکتری‌های مفید خاک افزایش رشد رویشی گیاه از قبیل طول و تعداد ریشه‌ها و تکثیر ریشه‌های جانبی است. پژوهشگران مختلف نیز افزایش وزن تر و خشک گیاهان را در اثر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه گزارش کرده‌اند (Kumar و همکاران ۲۰۱۸).

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر رشد و جذب عناصر کم‌مصرف در قلمه‌های انار

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک برگ	وزن خشک ریشه	جذب آهن	جذب روی	جذب منگنز	جذب مس
باکتری	۴	۰/۱۱۴**	۰/۰۴۹**	۱۲۶۳۲**	۳۱۸۴**	۷۰۵۱**	۲۶۵ **
خطای آزمایشی	۱۰	۰/۰۱۰۷	۰/۰۰۵	۳۹۶	۱۰۱	۶۴/۹	۱۳/۷
ضریب تغییرات		۴/۵۱	۳/۷۴	۷/۷۶	۱۳/۵	۵/۱۸	۱۱/۵

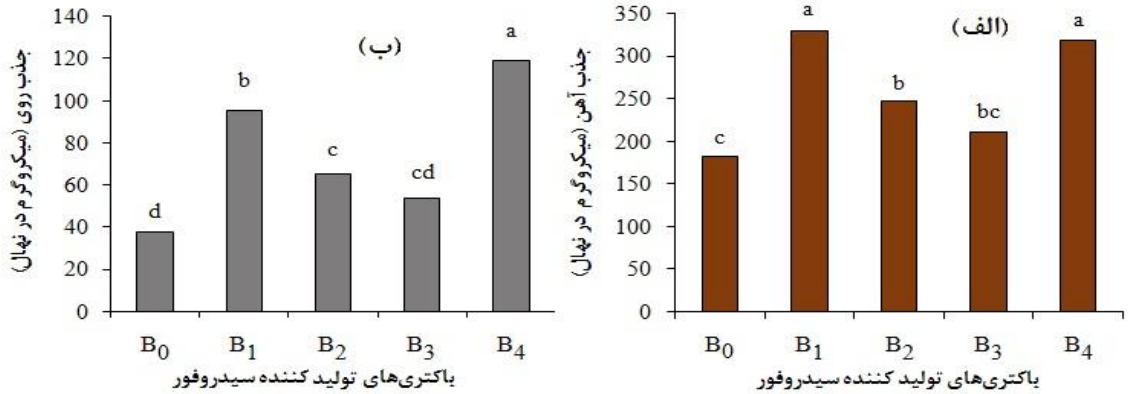
**: معنی‌دار در سطح یک درصد.



شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار ($p<0.05$)

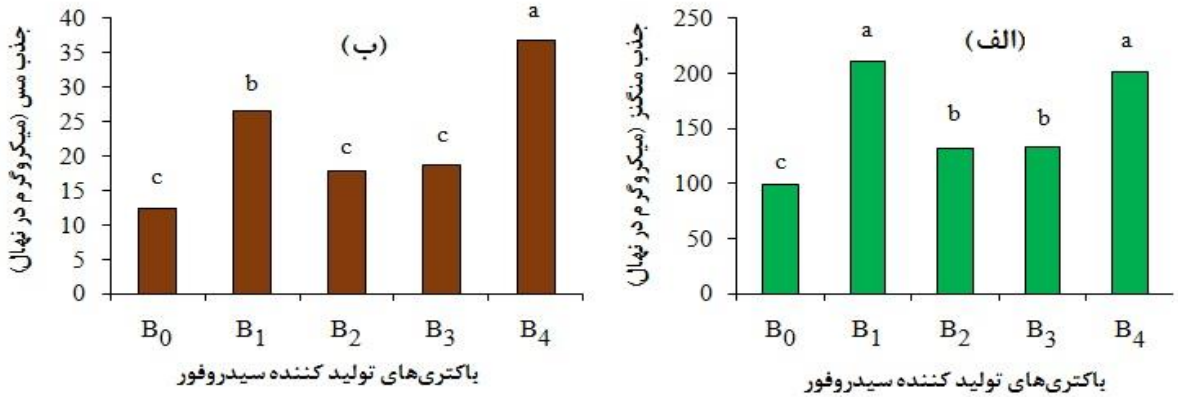
B_0، B_1، B_2، B_3 و B_4 به‌ترتیب شاهد بدون تلقیح و باکتری‌های تولید کننده سیدروفور

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تلقیح با باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر جذب عناصر آهن، روی، منگنز و مس در برگ قلمه‌های انار معنی‌دار شد (جدول ۳). براساس نتایج بدست آمده همه سویه‌ها به‌غیر از سویه B_3، موجب افزایش معنی‌دار جذب آهن در برگ شدند. تلقیح با باکتری‌های B_1، B_2 و B_4 جذب آهن در برگ قلمه‌های انار را به‌ترتیب ۸۰، ۳۶ و ۷۴ درصد نسبت به تمار شاهد بدون تلقیح افزایش داد (شکل ۳- الف). در مورد جذب روی نیز نتایج مشابه جذب آهن بود. به‌طوری‌که کمترین مقدار جذب روی در برگ متعلق به تیمار شاهد (۳۷/۸ میکروگرم در نهال) و بیشترین مقدار آن مربوط به باکتری B_4 (۱۱۹ میکروگرم در نهال) بود (شکل ۳- ب). براساس نتایج مطالعات Saha و همکاران (۲۰۱۶)، سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌ها تمایل بیشتری نسبت به سیدروفورهای گیاهی برای جذب آهن دارند. پژوهشگران مختلفی نقش باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر رشد و جذب عناصر آهن، روی و مس توسط گیاهان مختلف را گزارش کرده‌اند (Gouda و همکاران، ۲۰۱۸).



شکل ۳. مقایسه میانگین تأثیر باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر جذب آهن (الف) و روی (ب) در برگ قلمه‌های انار ($p<0.05$)
B_0، B_1، B_2، B_3 و B_4 به‌ترتیب شاهد بدون تلقیح و باکتری‌های تولید کننده سیدروفور

از طرفی نتایج نشان داد که همه باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش موجب افزایش معنی‌دار جذب منگنز در برگ قلمه‌های انار نسبت به تیمار شاهد شدند. به‌طوری‌که تلقیح با باکتری‌های B_1، B_2، B_3 و B_4 جذب منگنز در برگ را به‌ترتیب ۱۲۱، ۳۳، ۳۵ و ۱۰۳ درصد نسبت به تیمار شاهد بدون تلقیح افزایش دادند (شکل ۴- الف). در رابطه با جذب مس نیز فقط باکتری‌های B_1 و B_4 نقش معنی‌داری در افزایش جذب این عنصر نشان دادند. کمترین مقدار جذب مس مربوط‌به تیمار شاهد (۱۲/۵ میکروگرم در نهال) و بیشترین آن مربوط به باکتری B_4 (۳۶/۷ میکروگرم در نهال) بود (شکل ۴- ب). Chen و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که سیدروفور سودوباکتین ترشح شده توسط *Pseudomonas putida* حلالیت آهن، روی، منگنز و مس را افزایش داد. هم‌چنین کاربرد باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس باعث افزایش منگنز برگ‌های گیلاس شد (Esitken *et al.*, 2006).



شکل ۴. مقایسه میانگین تأثیر باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بر جذب منگنز (الف) و مس (ب) در برگ قلمه‌های انار ($p<0.05$)
B_0، B_1، B_2، B_3 و B_4 به‌ترتیب شاهد بدون تلقیح و باکتری‌های تولید کننده سیدروفور

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری‌های تولید کننده سیدروفور توانست وزن خشک برگ و ریشه قلمه‌های انار را افزایش دهد. همچنین جذب عناصر غذایی آهن، روی، منگنز و مس در برگ قلمه‌های انار تلقیح شده با باکتری‌ها نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، استفاده از باکتری‌های تولید کننده سیدروفور یا باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند جذب عناصر غذایی کم‌مصرف بویژه در خاکهای آهکی با pH بالا در گیاه را افزایش داده و با بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه رشد و عملکرد آن را افزایش دهد. از طرفی، با توجه به توانایی باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه در تولید ایندول استیک اسید و انحلال ترکیبات فسفاتی نامحلول، افزایش رشد ریشه و

ریشه‌زایی قلمه‌ها را می‌توان به کمک باکتری‌ها افزایش داد. استفاده از باکتری‌های تولید کننده سیدروفور می‌تواند علاوه‌بر بهبود کیفیت محصولات تولیدی به حفظ محیط زیست از آلودگی‌های کودهای شیمیایی نیز کمک کند.

منابع

رسولی صدقیانی، م.ح.، ملکوتی، م.ج.، خاوازی، ک. و قنادی مراغه، م. ۱۳۸۷. نقش سیدروفور سودوموناسهای فلورسنت در جذب روی توسط گندم با استفاده از ایزوتوپ Zn^{65}. مجله علوم و فنون هسته‌ای، ۴۳، ۳۰-۲۰.

Alloway, B. J. 2008. Micronutrients and crop production. In: Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production. pp. 1-39, Springer Science Business Media BV.

Azarmi, F., Mozaffari, V., Hamidpour, M. and Abbaszadeh-dahaji, P. 2016. Interactive Effect of Fluorescent Pseudomonads Rhizobacteria and Zn on the Growth, Chemical Composition, and Water Relations of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Seedlings under NaCl Stress. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 47, 955-972.

Chen, Y., Jurkevitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. Soil Science Society of America Journal, 58, 390-396.

Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M. and Sahin, F. 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria on yield, growth and nutrition of sweet cherry. Scientia Horticulturae, 110, 324-327.

Ghavami, N., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A. and Besharati, H. 2016. Study the Effects of Siderophore-Producing Bacteria on Zinc and Phosphorous Nutrition of Canola and Maize Plants. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 47, 1517-1527.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 41, 109-117.

Glick, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research, 169, 30-39.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S. and Patra, P. J. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiol. Res. 206, 131–140.

Hajiboland, R. and Amirazad, F. 2010. Growth, photosynthesis and antioxidant defense system in zn-deficient red cabbage plants. Plant Soil Environment, 5, 209-217.

Kumar, P., Thakur, S., Dhingra, G. K., Singh, A., Kumar Pal, M., Harshvardan, K., Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K. 2018. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 264–269.

Leoni, L., Amborsi, C., Petrucca, A. and Visca, P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth promoting pseudomonas B10. FEMS Microbiology Letter, 208, 219-225.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 3984–3999.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The role of siderophore producing bacteria on the growth and uptake of micronutrient in the pomegranate cuttings

Azarmi-Atajan*[1], F.

[1] Assistant Prof., Soil Science and Engineering Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

Abstract

Pomegranate is one of the most important and valuable horticultural products of Iran. Due to the high pH and carbonate calcium content in soils of Iranian pomegranate gardens, the uptake of micronutrient is low. One of the novel ways to increase the uptake of micronutrient in plants is the use of plant growth promoting bacteria. In this study, the effect of 4 *Pseudomonas sp.* strains (Control (B_0), B_1, B_2, B_3 and B_4) with siderophore production ability on growth and uptake of Fe, Zn, Mn and Cu by pomegranate cutting under greenhouse condition were investigated. The results showed that the use of bacteria increased the leaf and root dry weight of pomegranate cuttings. The highest leaf and root dry weight of pomegranate cuttings was obtained from B_4 strain which were 2.57 and 2.04 grams per seedlings, respectively. Also, inoculation with these bacteria increased the uptake of Fe, Zn, Mn and Cu in the leaves of pomegranate cuttings. The role of strains B_1 and B_4 in this increase was more than other strains. Therefore, the use of siderophore producing bacteria can play an important role in improving the nutritional status and growth of pomegranate cuttings.

Keywords: Fe uptake, Plant growth promoting bacteria, Pomegranate nutrition, Rooting

* Corresponding author, Email: farhadazarmi@birjand.ac.ir

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر تفاله پسته، کمپوست و بایوچار بر کربن آلی و تنفس میکروبی در خاک آهکی کرمان

ابوالفضل خادمی جلگه نژاد*[۱]

[۱]کارشناسی ارشد، مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی شهید باهنر کرمان

چکیده

تبدیل بقایای گیاهی به بایوچار و استفاده از آن به منظور ترسیب کربن و کاهش آلودگی هوا می‌تواند سبب اصلاح برخی ویژگی‌های خاک‌های آهکی شود. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تفاله پسته، کمپوست و بایوچار حاصل از آنها در دو دمای مختلف آماده سازی بر برخی ویژگی‌های شیمیایی و تنفس میکروبی خاک بود. تیمارها شامل نمونه خاک بدون ماده آلی به عنوان شاهد، تفاله پسته، کمپوست و بایوچار حاصل از آن در دو دمای ۳۰۰ و ۶۰۰ درجه سلیسیوس در سطح ۵ درصد وزنی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد کمترین میزان کربن آلی با کاربرد تفاله پسته در طی ۹۰روز و بیشترین میزان کربن آلی با کاربرد بایوچار تولید شده در دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس بدست آمده است. کاربرد کمپوست منجر به بیشترین میزان تنفس میکروبی در خاک شد. با کاربرد بایوچار میزان تنفس میکروبی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین بایوچار تولیدی در دمای ۳۰۰ نسبت به دمای ۶۰۰ میزان تنفس میکروبیبیشتری را نشان داده است و کمترین میزان تنفس میکروبی نیز با کاربرد تفاله پسته بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: بایوچار و تفاله پسته، تنفس میکروبی، کمپوست

مقدمه

تولید محصول به منظور پاسخگویی به تقاضای موادغذایی، وابسته به کاربرد کودهای شیمیایی به خصوص N و P می‌باشد که به دلیل استفاده بیش از حد از آنها و تلفات عناصر غذایی می‌تواند منجر به اثرات منفی زیست محیطی شود (Cameron و همکاران ۲۰۱۳). از طرفی با توجه به شرایط اقلیمی و نیز مدیریت ناصحیح، میزان ماده آلی خاک‌های زراعی کشور بسیار کم است. این در حالی است که برخی کشاورزان پس از برداشت محصول مبادرت به سوزاندن بقایای گیاهی نظیر کاه و کلش نموده که این موضوع باعث حذف ماده آلی خاک و اثرات جبران ناپذیری در ارتباط با عوامل زیستی می‌گردد. بنابراین، به منظور کاهش زیست محیطی کودها و بهبود کیفیت خاک در طولانی مدت نیاز به استفاده از اصلاح کننده‌های آلی می‌باشد (Lal، ۲۰۱۵).

اخیرا مطالعاتی در زمینه استفاده از بایوچار به عنوان ماده با ارزش در کشاورزی به بیان جامع علمی انجام شده است (Barrow، ۲۰۱۲). بایوچار یک ماده جامد غنی از کربن است که در اثر تجزیه گرمایی زیست توده‌های گیاهی و ضایعات کشاوزی و جنگلی به دست میآید (Wang و همکاران ۲۰۱۰). هر چند بایوچار یک اصطلاح جدید است اما یک ماده جدید نیست خاک‌های سراسر جهان از طریق بقایای طبیعی مانند آتش‌سوزی جنگل و مرتع دارای بایوچار هستند (O'Neill و همکاران ۲۰۰۹). امروزه افزودن بایوچار به خاک‌ها به عنوان روشی جهت ترسیب کربن درون خاک و کاهش غلظت دی اکسیدکربن هوا توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Lehmann J, Joseph، ۲۰۰۹). در کشور ما، پسته یکی از محصولات مهم اقتصادی محسوب می‌شود و شهر کرمان قطب تولید پسته در کشور است. به طور تقریبی، سالانه مقادیر زیادی بقایای حاصل از برداشت محصول به صورت تفاله‌های پسته تولید می‌شود که می‌تواند به عنوان یک منبع آلی مناسب به خاک برگردانده شود (شیرانی و همکاران ۱۳۹۰). تاکنون پژوهشی در خصوص اثر بایوچار تفاله‌های پسته بر ویژگی‌های خاک انجام نگرفته است. به همین منظور، این تحقیق با هدف بررسی اثر تفاله پسته، کمپوست تفاله پسته و بایوچار حاصل از آن بر برخی خواص شیمیایی و تنفس میکروبی خاک انجام شده است.

همکاران ۱۳۹۰). تاکنون پژوهشی در خصوص اثر بایوچار تفاله‌های پسته بر ویژگی‌های خاک انجام نگرفته است. به همین منظور، این تحقیق با هدف بررسی اثر تفاله پسته، کمپوست و بایوچار حاصل از آن بر برخی خواص شیمیایی و تنفس میکروبی خاک انجام شده است.

* ایمیل نویسنده مسئول: a.khademianar@gmail.com

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های خاک

خاک مورد استفاده از اراضی کشاورزی پسته شهرستان انار (شمال استان کرمان) و از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری جمع آوری گردید این خاک دارای مقدار بالای کربنات کلسیم و pH قلیایی می‌باشد. نمونه خاک پس از هوا خشک شدن، از الک ۲ میلیمتری عبور داده شد. آزمایش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی شامل توزیع اندازه ذرات خاک،pH (Thomas، ۱۹۹۶)، قابلیت هدایت الکتریکی (Rhoades،۱۹۹۶) ظرفیت تبادل کاتیونی (Chapman، ۱۹۶۵)، میزان کربن آلی خاک از روش Walkley و Black (۱۹۳۴) و تنفس میکروبی خاک به روش Anderson (۱۹۸۲) انجام گردید. فسفر قابل استفاده با عصاره‌گیری با بیکربنات سدیم و اندازه‌گیری پتاسیم محلول و تبادلی انجام شد. اندازه گیری شکل‌های مختلف پتاسیم به روش Helmke و Sparks (۱۹۹۶) انجام شد. پتاسیم محلول در عصاره اشباع خاک و پتاسیم تبادلی خاک با استات آمونیوم یک نرمال pH=7اندازه‌گیری گردید.

تهیه کمپوست و بایوچار تفاله پسته

برای تهیه کمپوست تفاله، ماده اولیه را شسته و با آب داغ فنول تفاله را خارج کرده، سپس تفاله‌های پسته را داخل سطل بزرگی ریخته و به منظور تسریع در فرایند پوسیده شدن مقدار کمی کود اوره اضافه کرده و در نهایت رطوبت مورد نیاز را اعمال نمودیم و بعد از فرایند پوسیده شدن به مدت دوماه کمپوست تهیه و مورد استفاده قرار گرفت و برای تهیه بایوچار، تفاله‌های پسته پس از جمع آوری، با آب مقطر شستشو داده شده و هوا خشک شدند و سپس آنها را آسیاب نموده و داخل کروزه‌های چینی ریخته و داخل کوره قرار داده دمای شرایط تولیدی بایوچار از قبیل شرایط خلأ (استفاده از گاز نیتروژن با درصد خلوص ۹۹/۹۹ درصد به عنوان عاری کننده از اکسیژن)و همچنین تنظیم دما و حرارت در کوره (یکسان بودن دما در قسمت‌های مختلف کوره) در دو دمای ۳۰۰ و ۶۰۰ درجه به مدت ۳ ساعت قرار داده شد تا فرایند پیرولیز صورت گیرد. همچنین مقادیر pH، هدایت الکتریکی،فسفر وپتاسیم محلول به روش مشابه گفته شده در مورد خاک و میزان کربن و نیتروژن بایوچار با استفاده از دستگاه CHSNO اندازه‌گیری گردید. برخی از ویژگی‌های مواد آلی و بایوچار تولیدی در جدول (۱) آورده شده است.

تیمارها و انکوباسیون

تیمارها شامل تفاله پسته، کمپوست و بیوچار و نمونه خاک بدون ماده آلی به عنوان شاهد در سه تکرار بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. نمونه‌های خاک ۲۰۰ گرمی به همراه تیمارها با درصد وزنی ۵ درصد به مدت ۹۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت درحد ظرفیت مزرعه نگهداری شد. پس از پایان ۹۰ روز نمونه‌ها هو اخشک شده و مقدار pH، قابلیت هدایت الکتریکی، ظرفیت تبادل کاتیونی و کربن الی و پتاسیم محلول و تبادلی و فسفر تبادلی به روش‌های بیان شده برای خاک اولیه اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

جزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماریSPSS انجام شد و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح آماری پنج درصد انجام شد. همچنین نمودارهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

جدول۱- برخی خصوصیات شیمیایی بایوچار، کمپوست و تفاله پسته مورد استفاده در آزمایش

ویژگی	بایوچار ۳۰۰	بایوچار ۶۰۰	کمپوست	تفاله پسته
pH	۷/۴۳	۱۱/۳	۸/۱	۷/۷۴
EC (dS/m)	۴/۵۲	۷/۷۶	۷/۹۳	۳/۹۲
C (%)	۵۲/۵	۵۸/۳۲	۴۳/۴۶	۳۳/۲۴
N (%)	۲/۳۴	۱/۹۳	۸/۵	۲/۳۸
P (%)	۰/۰۴۸	۰/۰۸۶	۰/۱۲	۰/۰۹۸
K (%)	۷/۳	۱۳/۲	۱/۹۸	۵ /۳۸

نتایج و بحث

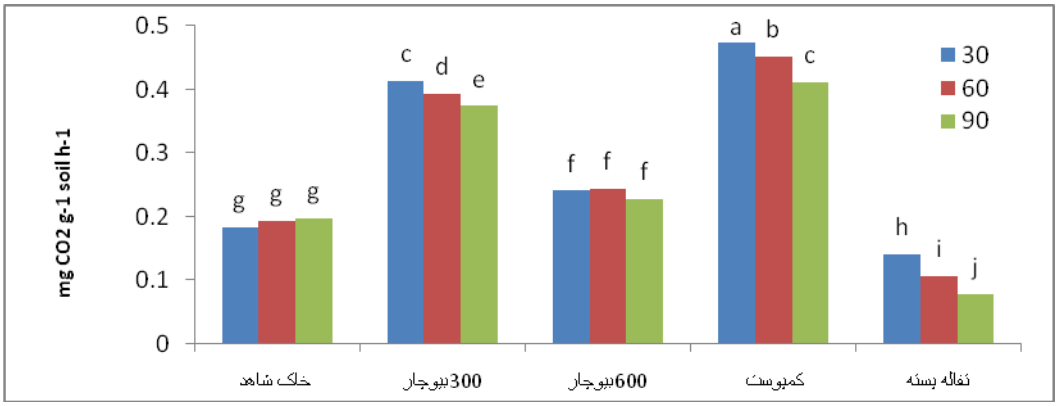
تنفس میکروبی

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول (۲) مشاهده شد که کاربرد تفاله پسته، بایوچار و کمپوست و همچنین اثرات مقابل تیمارها در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نسبت به یکدیگر در سطح ۰/۰۱ بر میزان تنفس میکروبی خاک نشان دادند. به طوریکه بیشترین میزان تنفس میکروبی با مصرف کمپوست نسبت به سایر تیمارها بدست آمده و همچنین با گذشت زمان میزان تنفس خاک کاهش یافته است. همچنین بایوچار تولید شده در دمای ۳۰۰ نسبت به دمای ۶۰۰ میزان تنفس میکروبی بیشتری را نشان داده است و کمترین میزان تنفس میکروبی نیز در تیمار تفاله پسته در زمان ۹۰ روز بدست آمد(شکل ۳). Jeffrey و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که با افزایش میزان کاربرد بایوچار میزان CO_2 تولید شده در خاک افزایش یافته است. با کاربرد بایوچار میزان تخلخل و تهویه خاک افزایش می‌یابد (Verheijenو همکاران۲۰۱۰) که ممکن است تاثیر مثبتی بر ریشه و تنفس میکروبی خاک داشته باشد.

جدول۲- تجزیه واریانس میانگین مربعات اثر تیمارهای بایوچار، کمپوست و تفاله پسته در زمان‌های مختلف بر میزان تنفس میکروبی و کربن آلی خاک

منابع تغییرات	درجه آزادی	تنفس میکروبی	کربن آلی
تیمار	۴	۰/۱۷۸**	۶/۱۸۴**
زمان	۲	۰/۰۰۴**	۰/۰۵۸۷**
تیمار×زمان	۸	۰/۰۰۱**	۰/۰۸۶**
خطا	۳۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵

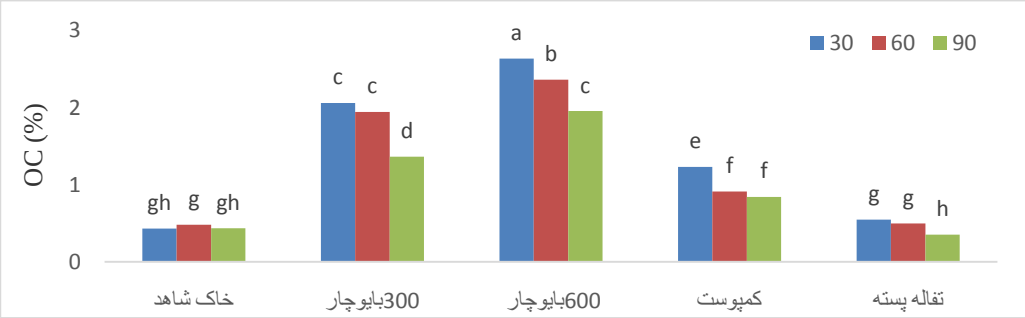
**- معنی‌دار در سطح ۱ درصد *- معنی‌دار در سطح ۵ درصد ns- عدم تفاوت معنی‌دار



شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تاثیر تیمارهای بایوچار، کمپوست و تفاله پسته در زمان‌های مختلف بر میزان تنفس میکروبی

کربن آلی

مطابق جدول (۴) اثر تیمارهای بایوچار، کمپوست و تفاله پسته در زمان‌های مختلف و همچنین اثرات متقابل آنها بر میزان کربن آلی خاک تاثیر معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ درصد داشته است. بایوچار تولید شده در دمای ۶۰۰ نسبت به بایوچار تولید شده در دمای ۳۰۰ میزان کربن آلی بیشتری را نشان داده است. با گذشت زمان میزان کربن آلی خاک کاهشیافت، بطوریکه کمترین میزان کربن آلی با کاربرد تفاله پسته در طی ۹۰روز که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت و بیشترین میزان کربن آلی با کاربرد بایوچار تولید شده در دمای ۶۰۰ درجه سلیسیوس در طی ۳۰ روز (۲/۶۳۷درصد) بدست آمده است (شکل ۴). کاربرد بایوچار باعث بهبود کیفیت خاک و افزایش میزان کربن آلی خاک شده است.



شکل۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل تاثیر تیمارهای بایوچار، کمپوست و تفاله پسته در زمان‌های مختلف بر میزان کربن آلی خاک

نتیجه‌گیری

فزودن بایوچار به خاک با توجه به نقش کربن در فرایندهای شیمیایی، زیستی و فیزیکی خاک، می‌تواند مهم باشد. بطور کلی می‌توان نتیجه گیری کرد که افزودن بایوچار سبب تغییرات در برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک مانند مقدار کربن آلی می‌گردد. بایوچارهای تولیدی در دمای پایین‌تر بیشترین تاثیر را بر میزان تنفس میکروبی داشته است.بنابراین خاکهای تیمار شده با بایوچار دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس میزان کربن آلی بیشتری را در مقایسه با بایوچار دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس به خود اختصاص دادند.

منابع

شیرانی، ح.، ا، ریزهبندی.، ح، دشتی.، م، مصداقی و م. افیونی، ۱۳۹۰. اثر تفاله پسته بر برخی خواص فیزیکی و تراکم پذیری دو نوع خاک علوم وفنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک جلد پانزدهم شماره ۵۵، ۸۵ تا ۹۷.

Anderson, J. P E, 1982. Soil respiration. PP. 831-871. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (Ed.), Methods ofSoil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI, USA.

Barrow CJ, 2012. Biochar: potential for countering land degradation and for improving agriculture. ApplGeogr 34:21–28.

Cameron KC, Di HJ,Moir JL, 2013. Nitrogen losses from the soil/ plant system: a review. Ann ApplBiol 162:145–173.

Chapman, H.D. 1965. Cation-exchange capacity.Methods of soil analysis Part 2 Chemical and microbiological properties. (methodsofsoilanb):891-901.

Helmke, P., D. Sparks, A. Page, R. Loeppert, P. Soltanpour, M. Tabatabai, et al. 1996.Lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium. Methods of soil analysis Part 3-chemical methods.551-74.

Jeffrey, L. Smith, Harold, P. Collins, Vanessa, L. Bailey, 2010. The effect of young biochar on soil respiration.Soil Biology and Biochemistry, 42 2345-2347.

Lal R, 2015. Restoring soil quality to mitigate soil degradation. Sustainability, 7:5875–5895.

Lehmann J, Joseph S, 2009. Biochar for environmental management: an introduction. In: Lehmann J, Joseph S (eds) Biochar for environmental management: science and technology. Earthscan, London, pp. 1–12.

O'Neill, B., J. Grossman, M. T. Tsai, J. E. Gomes, J. Lehmann, J. Peterson and J. E. Thies. (2009). Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. Microbial Ecology. 58(1): 23-35.

Rhoades, J. D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. In: Methods of Soil Analysis. D. L. Sparks et al. (eds.). Part 3. 3rd ed. American Society of Agronomy, Inc: Madison, WI. pp: 417-436.

Thomas, G. W. 1996. Soil pH and soil asidity. In: Methods of Soil Analysis D. L. Sparks et al. (eds.) part 3. 3rd ed. American Scoiesty of Agronomy.Inc: Madison, WI. pp: 475-490.

Verheijen, F., Jeffery, S., Bastos, A. C., van der Velde, M. and Diafas, I. 2010. Biochar Application to Soils–A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties Processes and Functions. EUR 24099 EN.Office for the Official Publications of the European Communities. Luxembourg, 149 pp

Walky, A and Black, I.A. 1934. An examination of degtareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid in soil analysis. 1. Experimental. Soil Sci., 79: 456-465.

Topic for submission: Soil genesis and classification

Effect of pistachio pulp, compost and Biocharon organic carbon and Microbial respiration in a calcareous soil of Kerman

Abolfazl Khademi JolgehNezhad[1,*1]

[1,]MSC, Soil Science Engineering, Shahid Bahonar agricultural faculty, Kerman

The conversion of plant residues in to Biocharand its use in order to carbon sequestration and reduction of air pollution can improve some characteristics of calcareous soils. The aim of this study was to investigate the effect of pistachio pulp, compost and biochar produced in two different temperatures on some chemical properties and microbial respiration of the soil. The treatments consisted of soil samples without organic matter as control, pistachio pulp, compost and biocharin two temperatures of 300 and 600 ºC at 5 wt% as factorial experiment in a completely randomized design with three replications. The results showed that the lowest amount of organic carbon with pistachio pulp application in 90 days and the highest amount of organic carbon was obtained with the application of biochar produced at temperature of 600 ºC. Compost application resulted in the highest level of microbial respiration in the soil. With the application of biochar increased microbial respiration rate compared to control treatment. Also, theBiocharproducedat300 °C compared to 600 °C showed the highest microbial respiration rate and the lowest microbial respiration rate was obtained by pistachio pulp application.

Keywords: Biocher, Pistachio pulp, Microbial respiration, Compost

* Corresponding author, Email: a.khademianar@gmail.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر کرم خاکی بر خصوصیات شیمیایی کود گاوی و برگ چنار در فرآیند ورمی‌کمپوست سازی

سارا واعظی*[۱] حسینعلی علیخانی[۲]، حسن اعتصامی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۲] استاد گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۳]استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

چکیده

افزایش تولید محصولات کشاورزی به شدت به نوع و مقدار کودهای مورد استفاده گیاه بستگی دارد. ورمی کمپوست کردن ضایعات کشاورزی علاوه بر کاهش آلودگی محیط زیست، با افزودن آن به خاک به دلیل داشتن مقدار بالایی از عناصر غذایی، موجب افزایش بهبود و حاصلخیزی خاک نیز می‌شود. این مطالعه به صورت طرح کاملا تصادفی جهت تعیین خصوصیات شیمیایی ماده آلی تیمار شده با کرم خاکی (ورمی‌کمپوست شده) و تیمار نشده (مواد خام اولیه) در سه تکرار و به مدت چهار ماه انجام شد. پس از پایان چهار ماه، نمونه برداری از ظروف حاوی تیمار انجام و ویژگی‌های شیمیایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین خصوصیات اندازه‌گیری شده در مواد اولیه و ورمی کمپوست وجود داشت. پارامترهای قابلیت هدایت الکتریکی ۸۳/۶۴ درصد، غلظت سدیم و پتاسیم به ترتیب برابر ۷۱/۳۴ درصد و ۶۲/۹۵ درصد و همچنین نسبت کربن به نیتروژن در ورمی کمپوست ۴۰/۵۷درصد نسبت به مواد اولیه کاهش را نشان دادند و پارامترهای pH ۴/۰۲ درصد، نیتروژن ۱۵/۵۷درصد، فسفر ۷۱/۷۶درصد، آهن ۶۳/۸۱ درصد، روی ۱۰۹/۰۱ درصد، مس ۳۶۳/۶۵ درصد و منگنز ۱۶۴/۲ درصد افزایش نسبت به شاهد را نشان دادند. لذا پارامترهای pH ، قابلیت هدایت الکتریکی، نسبت کربن به نیتروژن، نیتروژن، فسفر، سدیم، پتاسیم، آهن، روی، مس و منگنز معیار مناسبی برای بیان پایداری و بلوغ ورمی کمپوست می‌باشند.لذا نتایج مختلف از پارامترهای pH ، قابلیت هدایت الکتریکی، نسبت کربن به نیتروژن، نیتروژن، فسفر، سدیم، پتاسیم، آهن، روی، مس و منگنز نشان داد که کرم‌خاکی بر خصوصیات شیمیایی کود گاوی و برگ چنار اثر داشته و این اثر در جهت بهبود کود زیستی بوده است که با مصرف خاکی آن اثرات مطلوب‌تری نسبت به کود اولیه بر رشد گیاه خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: کشاورزی پایدار، آلودگی محیط زیست، عناصر غذایی، بلوغ ورمی کمپوست

مقدمه

افزایش تولید محصولات کشاورزی به شدت به نوع و مقدار کودهای مورد استفاده گیاه بستگی دارد. استفاده از کودهای آلی با هدف جایگزینی عناصر غذایی مصرف شده توسط گیاهان در کشت قبلی و با حداکثر رشد و بازده اقتصادی می‌باشد. امروزه تاکید بسیار زیادی درباره عدم استفاده بی رویه کودهای شیمیایی در محیط خاکی شده است. اثر سوء استفاده بی رویه از کودهای شیمیایی بر اراضی کشاورزی نه تنها از لحاظ کاهش کیفیت خاک بلکه بر حیات موجودات خاک‌زی دیده می‌شود. کرم‌های خاکی از مهم‌ترین اجزای فون خاک در شرایط متنوع خاکی، آبی و هوایی هستند و به طور مستقیم یا غیر مستقیم در تجزیه و تثبیت مواد آلی نقش دارند (Munnoli و همکاران ۲۰۱۰؛ Jordan و همکاران ۲۰۰۴). کرم‌های خاکی بخش کوچکی از زیست توده خاک را تشکیل داده ولی نقش حیاتی در ساخت و افزایش مواد غذایی گیاه دارند، بنابراین می‌توانند به عنوان شاخص زیستی برای ارزیابی خطرات سمیت زنوبیوتیک‌ها[1] در اکوسیستم خاکی باشند (Reinecke, A. J. & Reinecke, S. A. ۲۰۰۴) نقش مهم کرم‌های خاکی در تجزیه مواد آلی مربوط به جامعه میکروبی درون سیستم گوارش کرم خاکی است. زمانی که مواد آلی از روده کرم خاکی عبور می‌کند موجب افزایش سطح ویژه آن می‌گردد. مواد هضم نشده یا مدفوعات کرم، دارای خاصیت باروری اند و از نظر مواد غذایی غنی بوده و به راحتی در دسترس گیاه قرار می‌گیرند (Hansen ۲۰۰۷). کرم‌های خاکی ممکن است به طور مستقیم بر تجزیه مواد از طریق بلع، هضم و جذب مواد آلی و

1-xenobiotion

ریزسازواره‌ها، که به روده کرم آزاد می‌شوند اثر بگذارند (Monroy و Dominguez ۲۰۰۸؛ Aira و Dominguez ۲۰۰۹) و یا غیر مستقیم که بیشتر در ارتباط با مواد تجزیه نشده و تغییر فیزیکی مواد مورد تجزیه است (Aira. و همکاران، ۲۰۱۰). این تاثیرات غیر مستقیم از اثرات مستقیم پیروی می‌کنند و شامل فرآیندهایی نظیر مدت زمان فعالیت کرم بر روی مواد (هفته یا ماه) و مخلوط چنین موادی با بستر که توسط کرم‌های خاکی تجزیه نشده اند می‌باشد (Aira و همکاران، ۲۰۱۱). در طول فرآیند تولید ورمی‌کمپوست توسط کرم‌ها سرعت تجزیه مواد آلی افزایش یافته و خواص فیزیکی و شیمیایی این مواد تغییر می‌کند و این مواد ناپایدار به طور هوازی اکسید شده و به حالت پایدار در می‌آیند. نیتروژن و فسفر پسماند و مواد دفعی کرم‌های کمپوستی، اغلب به میزان پنج تا ۱۱ برابر بیش از خاک بوده و سایر عناصر غذایی کم مصرف و پر مصرف نیز در آن بیش از خاک معمولی می باشد، از طرفی ترشحات درون سیستم گوارش کرم‌ها، قادر است عناصر غذایی با قابلیت فراهمی پایین را به صورت عناصر قابل دسترس برای جذب گیاه تبدیل کند (Arancon و Edwards ۲۰۰۵). ورمی‌کمپوست دارای مزایای فراوانی از جمله سبک و فاقد هرگونه بو بودن، عاری از بذور علف‌های هرز، حاوی ریز جانداران هوازی مفید مانند *ازتوباکترها*، مقادیر زیاد عناصر پر مصرف و کم مصرف، دارای مواد محرک رشدگیاهی نظیر هورمون‌ها و ویتامین‌ها، قابلیت بالای نگهداری آب و موادغذایی، عاری از قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و کمک کننده به بهبود وضعیت ساختمان خاک هستند (Farmohamadi و Zandian ۲۰۱۷). کود ورمی کمپوست مواد غذایی بیشتری نسبت به کود دامی در خود دارد و اثرات آن نیز بر عملکرد محصولات زراعی بیشتر است و در تحقیقات مختلفی این برتری به اثبات رسیده است (Malakooti & Baybordi ۲۰۰۷؛ Zimny وSniady ۲۰۰۱). با توجه به اهمیت حفظ خاک از آلودگی زیست محیطی و افزایش بهره‌وری از خاک، پژوهش حاضر با بررسی میزان تغییر ویژگی‌های شیمیایی کود آلی تیمار نشده پس از تیمار با کرم خاکی و میزان کیفیت آن برای استفاده از کودهای آلی مناسب جهت استفاده خاکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش جهت تعیین خصوصیات شیمیایی از مخلوط کود گاوی و برگ چنار با نسبت ۱:۲۰ (وزنی/ وزنی) درون جعبه‌های پلاستیکی (۱۷×۲۰ سانتی متر) به عنوان مواد خام اولیه استفاده شد. دو تیمار مواد خام و تیمار ورمی کمپوست در سه تکرار انجام و آن‌گاه به مدت یک ماه تا رسیدن به رطوبت ۶۰-۷۰ درصد (رطوبت بهینه) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد و در فواصل زمانی ۱۰ روز نمونه‌ها جهت هوادهی هم‌زده شد. فرآیند پری کمپوستینگ[۲] در تیمار ورمی کمپوستی جهت رفع آب گریزی در بستر انجام شد، بدین صورت که نمونه‌ها به مدت سه روز با آب شهری در حد اشباع آبیاری شد.

پس از آماده سازی بستر، ۱۰۰ جفت کرم خاکی گونه *Eisenia foetida* به جعبه‌ها افزوده و فرآیند تهیه ورمی کمپوست به مدت چهار ماه در گلخانه گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. بعد از ۴ ماه نمونه برداری در سه تکرار از دو تیمار انجام شد. جهت تعیین خصوصیات شیمیایی مقداری از ماده خام اولیه در دمای ۱۰۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت درون آون خشک شده و از الک یک میلی متری عبور داده شد.

جهت تعیین رطوبت به روش وزنی ۱۰ گرم از نمونه آون خشک گردید و در آون دمای ۷۰-۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها وزن شدند و جهت محاسبه رطوبت وزنی از رابطه ۱ استفاده گردید (Jackson ۱۹۶۷).

رابطه ۱

$$\text{رطوبت وزنی}\% = \frac{\text{وزن مرطوب} - \text{وزن خشک}}{\text{وزن مرطوب}} \times 100$$

برای اندازه گیری pH و EC دو تیمار ماده اولیه و ورمی کمپوست از عصاره ۱:۵ کود به آب استفاده شد و به ترتیب با دستگاه‌های pH متر و EC متر اندازه گیری شد (Page,A.L و Keeney ۱۹۸۷

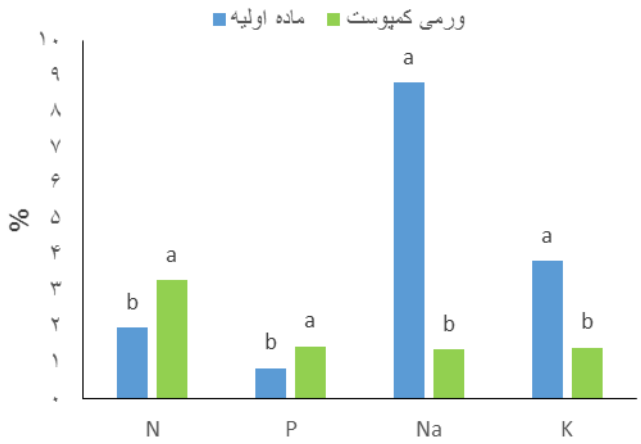
). جهت اندازه گیری مقدار کل سدیم، پتاسیم و آهن، روی، مس و منگنز یک گرم کود آون خشک در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت پنج ساعت قرار داده شد و خاکستر حاصله با اسید HCl دو نرمال عصاره گیری شد. جهت اندازه گیری عناصر غذایی؛ نیتروژن از روش کجلدال (

2- Pre composting

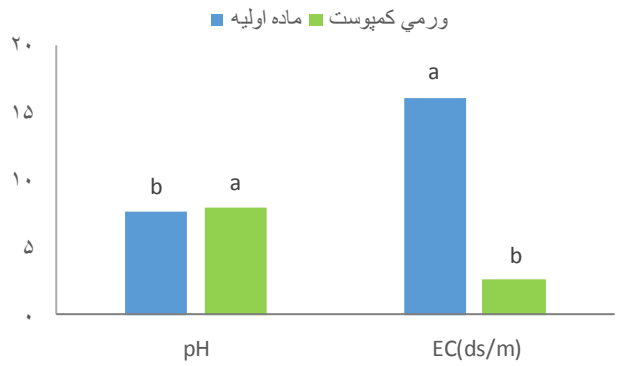
۱۸۸۳Kjeldahl)، فسفر به روش زرد (Jackson ۱۹۶۷)، کربن به روش والکلی و بلک (Walkely وBlack ۱۹۳۴)، سدیم و پتاسیم به روش فلیم فوتومتری (Page,A.L وMiller ۱۹۸۲) و عناصر آهن، روی، مس و منگنز به روش جذب اتمی قرائت شد (Yadav و Garg ۲۰۰۹). تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون Duncan در سطح پنج درصد انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

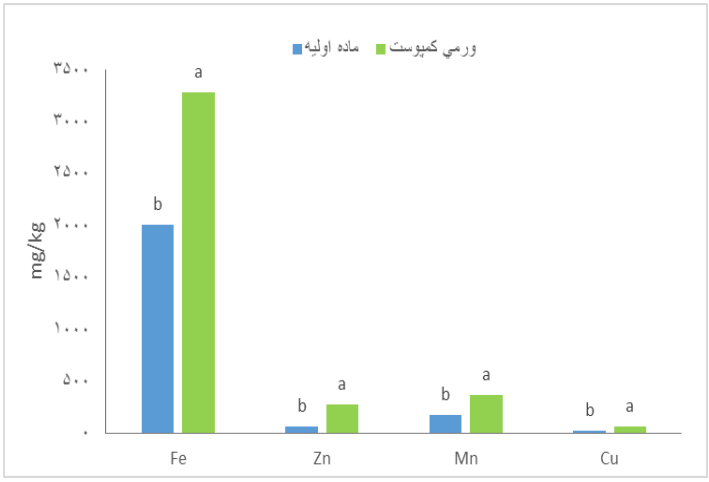
در طی آنالیز ویژگی‌های شیمیایی تفاوت معنی داری بین تیمارها دیده می‌شود. مقدار نیتروژن و فسفر به ترتیب ۱/۹۹ درصد و ۰/۸۵ درصد در مواد خام اولیه و ۳/۳۱ درصد و ۱/۴۶ درصد در ورمی کمپوست تولیدی بود که این میزان افزایش مقدار این دو عنصر در کود تیمار شده را نشان می‌دهد. مقدار سدیم و پتاسیم نیز بعد از تیمار شدن کود کاهش معنی داری داشت به طوری که به ترتیب از ۸/۸۳ درصد و ۳/۸۶ درصد در مواد خام اولیه و ۱/۳۷ درصد و ۱/۴۳ درصد در ورمی کمپوست تولیدی می‌باشد (نمودار ۱). از لحاظ میزان pH و EC نیز تفاوت معنی داری بین دو نوع ماده آلی وجود دارد که مقادیر pH، ۷/۶۸ در موادخام اولیه و ۸/۰۴ در ورمی کمپوست تولیدی بود و مقادیر EC، ۱۶/۰۸دسی زیمنس بر متر در موادخام اولیه و ۲/۶۳ دسی زیمنس بر متر در ورمی کمپوست تولیدی می‌باشد (نمودار ۲) که نشان دهنده شوری بسیار بالا در ماده اولیه می‌باشد. در مورد عناصر کم مصرف شامل؛ آهن، روی، مس و منگنز نیز تفاوت معنی داری بین این دو نوع تیمار وجود داشت که مقادیر آن‌ها به ترتیب ۲۰۰۳/۶۹، ۵۸/۹، ۲۴/۹۵، ۱۷۵/۷۹ mg/kg در مواد خام اولیه و به ترتیب همین عناصر با مقادیر ۹۱ /۳۲۸۱، ۲۷۲/۷۲، ۱۰۴/۹۳، ۴۰۴/۷۶ mg/kg در ورمی کمپوست تولیدی بود (نمودار ۳).



نمودار۱- مقایسه درصد نیتروژن، فسفر، سدیم و پتاسیم اندازه‌گیری شده در مواد خام اولیه و ورمی کمپوست (حروف کوچک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال پنج درصد بین ماده اولیه و ورمی‌کمپوست می‌باشد).



نمودار۲- مقایسه pH و EC اندازه‌گیری شده در مواد خام اولیه و ورمی کمپوست (حروف کوچک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال پنج درصد بین ماده خام اولیه و ورمی‌کمپوست می‌باشد).



نمودار ۳- مقایسه مقادیر آهن، روی، مس و منگنز اندازه‌گیری شده در مواد اولیه و ورمی‌کمپوست (حروف کوچک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال پنج درصد بین ماده خام اولیه و ورمی‌کمپوست می‌باشد).

نسبت کربن به نیتروژن نیز بین مواد اولیه و کود ورمی کمپوست شده تفاوت معنی داری داشته است و مقادیر آن به ترتیب ۱۸/۸۴ و ۶/۹۳ بوده است.

بحث

با آزمایشات انجام شده نتیجه شد که مقدار EC در کود کمپوست شده به طور معنی داری کاهش یافت، قابلیت هدایت الکتریکی نشان دهنده شوری مواد آلی است. غلظت بالای نمک ممکن است موجب مشکلات مربوط به مسمومیت گیاه شود. بنابراین قابلیت هدایت الکتریکی نشان‌گر خوبی برای پایداری و مطمئن بودن ورمی کمپوست یا کمپوست تهیه شده برای اهداف کشاورزی است (Soumaré ۲۰۰۲). در طی ورمی‌کمپوست سازی تولید جزئی متابولیت‌های محلول مانند آمونیوم و همین طور رسوب نمک‌های محلول ممکن است منجر به کاهش مقادیر هدایت الکتریکی گردد (Mitchell 1997). مقدار pH در این مطالعه در محدوده بهینه برای رشد و توسعه قرار دارد (Zorpas ۲۰۰۳). افزایش مقدار pH از ۷/۶۸ به ۸/۰۴ در ورمی کمپوست به دلیل تولید آمونیوم در طی فرآیند آمونیفیکاسیون در طی فرآیند تولید ورمی‌کمپوست و تجزیه اسیدهای آلی است (Liu ۲۰۱۱). مقدار پتاسیم در فرآیند ورمی کمپوست سازی کاهش یافته است که این کاهش می‌تواند در اثر شستشو و به دلیل تحرک بالای نمک‌های پتاسیم که به راحتی در آب حل می‌شوند باشد (Petersen. و همکاران ۱۹۹۸) علت کاهش سدیم را هم می‌توان به این دلیل نسبت داد. در اثر معدنی شدن سریع مواد آلی پتاسیم تمایل کمی به مشارکت در ساختمان مواد آلی داشته و به راحتی با آب شسته می‌شود، لذا این نتایج لزوم به کار گیری کودها شیمیایی نیتروژنی و پتاسیمی به همراه ورمی کمپوست در زمان‌های توصیه شده را ضروری می‌سازد. علت کاهش نسبت کربن به نیتروژن از مقدار ۱۸/۸۴ در موادخام اولیه به ۶/۹۳ در ورمی کمپوست تولیدی ممکن است به دلیل کاهش کربن که مشخصاً به دلیل آزاد سازی دی اکسید کربن در طی تجزیه مواد آلی است و افزایش نیتروژن به دلیل معدنی شدن ترکیبات آلی باشد (Brito و همکاران ۲۰۰۸). Felton و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که مقدار فسفر کل در طی ورمی کمپوست سازی به دلیل خرد شدن مواد آلی توسط کرم‌های خاکی افزایش میابد. آهن اولین عنصر ضروری برای زندگی گیاه است و نقش مهمی در سنتز کلروفیل (II) دارد. حضور آنزیم‌ها و کوفاکتورها در روده کرم موجب افزایش مقدار آهن در ورمی کمپوست می‌شود. مقدار بالای مس در ورمی کمپوست تولیدی نسبت به مواد خام اولیه به دلیل حضور آنزیم‌های اکسید کننده حاوی مس است (Prabha و همکاران ۲۰۱۵). به طور کلی افزایش مقدار عناصر میکرو به دلیل افزایش فعالیت ریز سازواره‌ها مربوط به معدنی شدن مواد غذایی یا گذر زمان موجب افزایش فرآیند معدنی شدن می‌گردد. نتایج مشابهی توسط Chowdappa و همکاران (۱۹۹۹) به دست آمد و آن‌ها بیان داشتند که زائدات آلی مهره آرکاسا و کاکائو با استفاده از گونه *Eudrilus eugineae* دارای مقادیر بالایی از عناصر ماکرو و میکرو نسبت به کمپوست‌های معمولی است.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که پارامترهای pH، قابلیت هدایت الکتریکی، کربن، نیتروژن، فسفر، سدیم، پتاسیم، آهن، روی، مس و منگنز معیار مناسبی برای بیان پایداری و بلوغ ورمی کمپوست می‌باشند. این پژوهش نشان دهنده اثر کرم خاکی بر خصوصیات شیمیایی کود گاوی و برگ چنار بود و نشان داد که کود گاوی تیمار نشده دارای شوری و ارزش غذایی کم‌تری نسبت به ورمی‌کمپوست داراست لذا در تیمار کردن کود گاوی و برگ چنار با کرم خاکی این کود حاوی عناصر غذایی بیشتر و شوری کم‌تر خواهد بود که به تبع با افزودن آن به خاک باعث افزایش حاصلخیزی و رشد گیاه می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در صورت استفاده از کود دامی خام بهتر است تیمار گردد تا ارزش کودی بیشتری با افزودن آن به خاک داشته باشد.

منابع

Aira, M., Monroy, F. & Dominguez, J.2009. Changes in bacterial numbers and microbial activity of pig slurry during gut transit of epigeic and anecic earthworms. J. Hazard. Mater. **162,** 1404–1407.

Aira, M., Lazcano, C., Gómez-Brandón, M. & Dominguez, J.2010. Ageing effects of casts of Aporrectodea caliginosa on soil microbial community structure and activity. Appl. soil Ecol. **46,** 143–146.

Aira, M. & Dominguez, J.2011. Earthworm effects without earthworms: inoculation of raw organic matter with worm-worked substrates alters microbial community functioning. PLoS One **6,** e16354.

Arancon, N. Q. & Edwards, C. A.2005. Effects of vermicomposts on plant growth. Soil Ecol. Lab. Ohio State Univ. Columbus, OH **43210,** 16–18.

Baybordi, A. and Malakooti, M.J. 2007.Effect of different sources of organic fertilizers (manure, compost and vermicompost) on the quantity and quality of Red onion of Azar Shahr in Bonab and Khosrow Shahr regions. Journal of Soil and Water Sciences. Vol. 21, No. 1: 33-43.

Baker, G., Buckerfield, J., Grey-Gardner, R., Merry, R. & Doube, B.1992 The abundance and diversity of earthworms in pasture soils in the Fleurieu Peninsula, South Australia. Soil Biol. Biochem. 24, 1389–1395.

Brito, L. M., Coutinho, J. & Smith, S. R.2008. Methods to improve the composting process of the solid fraction of dairy cattle slurry. Bioresour. Technol. **99,** 8955–8960.

Chowdappa, P., Biddappa, C. C. & Sujatha, S.1999.Efficient recycling of organic wastes in arecanut (Areca catechu) and cocoa (Theobroma cacao) planta.

Edwards, C. A., Bohlen, P. J. & Linden, D. R. S. Subler .1995. Earthworms in agroecosystems. Earthworm Ecol. Biogeogr. North Am. Lewis Publ. Boca Rat. 185–214.

Farmohamadi,S. and Zandian F. 2017. Nature care with earthworm help. Taghbostan Publisher. Pp. 223. (In Persian).

Felton, G. K., Carr, L. E., Prigge, C. E. & Bouwkamp, J. C.2004. Nitrogen and phosphorous dynamics in cocomposted yard trimmings and broiler litter. *Compost* Sci. Util. **12,** 349–355.

Hansen, D.2007.Vermicomposting:innovative kitchen help. [Online] Available: http://www.dnr.mo.gov/env/swmp/docs/vermicomposting.pdf .April, 12.

Jackson, M.L. 1967.Soil Chemical Analysis. 1st Edn., Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Jordao, C. P., Nascentes, C. C., Cecon, P. R., Fontes, R. L. F. & Pereira, J. L. 2006. Heavy metal availability in soil amended with composted urban solid wastes. Environ. Monit. Assess. **112,** 309–326.

Kjeldahl, C. 1883.A new method for the determination of nitrogen in organic matter. Z Anal Chem **22,** 366.

Lee, K. E. & 1985.others. Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use. (Academic Press Inc).

Liu, D. *et al.* 2011.Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. Bioresour. Technol. **102,** 9040–9049.

Mitchell, A. (1997). Production of Eisenia fetida and vermicompost from feed-lot cattle manure. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*(3-4), 763-766.

Munnoli, P. M., Da Silva, J. A. T., Saroj, B. & others.2010. Dynamics of the soil-earthworm-plant relationship: a review. Dyn. soil, Dyn. plant 1–21.

Monroy, F., Aira, M. & Dominguez, J.2008. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta). *Appl. soil Ecol.* **39,** 127–132.

Nattudurai, G., Vendan, S. E., Ramachandran, P. V & Lingathurai, S.2014. Vermicomposting of coirpith with cowdung by Eudrilus eugeniae Kinberg and its efficacy on the growth of Cyamopsis tetragonaloba (L) Taub. J. Saudi Soc. Agric. Sci. **13,** 23–27.

Norbu, T. 2002.Pretreatment of municipal solid waste by windrow composting and vermicomposting. A thesis degree Master Sci. 1–103.

Page, A. L., Miller, R. H. & Keeney, D. R.1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy, No. 9. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI 1159.

Petersen, S. O., Lind, A.-M. & Sommer, S. G. 1998.Nitrogen and organic matter losses during storage of cattle and pig manure. J. Agric. Sci. **130,** 69–79.

Prabha, L. M., Nagalakshmi, N. & Priya, S. M. 2015.Analysis of nutrient contents in vermicompost. Eur. J. Mol. Biol. Biochem. **2,** 42–48.

Reinecke, A. J. & Reinecke, S. A. 2004.Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. Earthworm Ecol. 299–320.

Soumaré, M., Demeyer, A., Tack, F. M. G. & Verloo, M. G. 2002.Chemical characteristics of Malian and Belgian solid waste composts. Bioresour. Technol. **81,** 97–101.

Walkley, A. & Black, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. **37,** 29–38.

Xiao, H., Zhou, Q. X. & Liang, J. D. 2004.Single and joint effects of acetochlor and urea on earthworm Esisenia foelide populations in phaiozem. Environ. Geochem. Health **26,** 277–283.

Yadav, A. & Garg, V. K. 2009. Feasibility of nutrient recovery from industrial sludge by vermicomposting technology. J. Hazard. Mater. **168,** 262–268.

Zimny, L., Malak, D. & Sniady, R. 2001.Yielding of sugar beet cultivated after manure and vermicompost in the background of increasing doses of nitrogen fertilization. Arch. Agron. Soil Sci. **47,** 473–480.

Zorpas, A. A., Arapoglou, D. & Panagiotis, K.2003. Waste paper and clinoptilolite as a bulking material with dewatered anaerobically stabilized primary sewage sludge (DASPSS) for compost production. Waste Manag. **23,** 27–35.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Evaluation and comparison of chemical changesof raw material and vermicompost produced from cow material and platanus leaves

Vaezi,S[*1]..Alikhani,H.A[2]. Etesami,H[3]

[1] M.Sc student of soil Biology and Biotechnology , Department of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

[2]Full professor, Departmant of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

[3] Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University

Abstract

The increase in agriculture products is largely depends on the type of fertilizer used to supply the nutrients required by the plant. Vermicomposting of agriculture wastes in addition to reducing environmental pollution by increasing of nutrients, also improves soil fertility and its improvements. In this experiment study a completely randomized design was carried out to determine the chemical properties of organic matter treated with or not the earth worms in three replicates for four month. After end of four months, samples were taken from the containers containing organic matter and their chemical characteristics were studied. Statical analysis showed that there was a significant difference between the measured parameters in control and vermicompost. Electrical conductivity, sodium, potassium and carbon to nitrogen ratio in vermicompost comparison to control was respectively 511.4%, 544.5%, 16.99%, 17.18% lower and another parameters like acidity, nitrogen, phosphorus, iron, zinc, copper and manganese was respectively 38.14%, 7.40%, 76.22%, 56.56% higher than control.therefore, electrical conductivity, acidity, carbon to nitrogen, nitrogen, phosphorus, sodium, potassium, iron, zinc, copper and manganese parameters are a suitable criterion for expression of vermicompost stability and its maturity.

Keywords: Sustaiable agriculture, Environmental pollution, Nutritional elements, Vermicompost maturity

محور مقاله: بیولوژی خاک

مقایسه تنفس قارچی وباکتریایی خاک درکاربری های گوناگون زمین (مطالعه موردی: بیستون، کرمانشاه)

سحر مهرنوش[۱] ، علی بهشتی آل آقا[۲]، مرتضی پور رضا[۳]، علی اکبرصفری سنجانی [۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[۲] استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[۳] استادیار،گروه منابع طبیعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[۴] استاد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

چکیده

پیدایش و ویژگی های خاک در بوم‌سازه های جنگلی با گونه های درختی‌گوناگون، ناهمانند می‌باشد. بنابراین گونه‌های درختی بر ویژگی‌های زیستی خاک به گونه راست و ناراست پیامد دارد. پژوهش کنونی با هدف بررسی پیامدهای خوب و بد این توده‌های گیاهی جنگلی بر کیفیت بیولوژی خاک انجام شد. یافته‌ها نشان داد که اندازه تنفس نسبی باکتری در کاربری زمین چراگاه بیشترین و اندازه تنفس نسبی قارچ در کاربری درخت کاج (سایه انداز و دور از گیاه) بیشترین بود. همانند با اندازه تنفس نسبی قارچ، اندازه تجمعی تنفس پایه نیز در کاربری های زمین کشاورزی و زمین چراگاه کمترین بود و کاربری درخت سرو در بخش سایه اندازه گیاه بیشترین اندازه تجمعی تنفس پایه را داشت. روهمرفته یافته های پژوهش نشان داد که جنگل کاری در بیستون مایه افزایش معنی دار تنفس خاک و بویژه تنفس قارچی آن در برابر کاربری های زمین کشاورزی و زمین چراگاه شده است که می تواند وابسته به انباشتگی لاشبرگ فراوان و خاستگاه کربن آلی برای ریزجانداران در این کاربری ها باشد.

کلمات کلیدی: خاک، تنفس، کربن آلی، زیتوده

مقدمه

دانش نگهداری از جنگل‌های کاشته شده در سرزمین های خشک و نیمه خشک وابسته به بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک با جنگل‌داران است .امروزه نیاز به ارزیابی ویژگی‌های خاک برای بررسی و شناخت پیامد دگرش مدیریت بر کیفیت خاک افزایش یافته است (Schrijver و همکاران، ۲۰۱۲). در رابطه با پیامدهای مستقیم گونه‌های گیاهی بر لابه های گوناگون خاک، می‌توان از بیشترین دگرگونی pH لایه‌های بالایی خاک یاد نمود که مایه دگرش فراوانی و گوناگونی ریزجانداران خاک و ترکیبات میکروبی می شود. تعیین پیامد گونه و پوشش گیاهی بر ویژگی های زیستی خاک را می‌توان با اندازه‌گیری کربن آلی، نیتروژن و فسفر خاک ارزیابی نمود (Thoms و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین بررسی کمی و کیفی ویژگی جوامع مختلف جنگلی و آگاهی از این ویژگی‌ها می‌تواند به خوبی ویژگی‌های خاک را نشان دهد (Paz-Ferreiro, 2013؛ Grove و همکاران، ۲۰۱۲). به دلیل اختلاف گونه‌های جنگلی در جذب مواد معدنی، کیفیت لاشبرگ‌ها و تندی رشد گونه‌ها، ویژگی‌های خاک زیر آنها ناهمانند است. گونه‌های جنگل کاری شده می‌تواند برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک را دگرگون کنند (Hobbie و همکاران، ۲۰۱۵). در همین راستا، درباره پیامد گونه های درختی گوناگون بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژی خاک پژوهش‌های بسیاری انجام شده است. یافته های این پژوهش ها بیانگر آن است که گونه‌های درختی پهن‌برگ در افزایش حاصلخیزی و باروری خاک بسیار کاراتر است (Vesterdal و همکاران، ۲۰۱۳).

متین‌کیا و همکاران (۱۳۹۰)، اثر جنگل‌کاری با گونه‌های سوزنی برگ و پهن‌برگ بر برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیک خاک را در پارک جنگلی شهرستان درود بررسی کردند. در این پژوهش اثر جنگل‌کاری با گونه‌های نابومی سوزنی برگ و پهن‌برگ بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در

منطقه پارک جنگلی دورود با نمونه برداری از سه تیپ جنگل‌کاری شده اقاقیای خالص، تیپ خالص کاج بروسیا و تیپ آمیخته بروسیا- اقاقیا و یک توده طبیعی بلوط را به عنوان شاهد آزمون شد. پژوهش آنان نشان داد که برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بسته به گونه و پوشش گیاهی دگرگون شده است، به گونه ای که گونه سوزنی‌برگ کاج بروسیا مایه افزایش اندازه فسفر فراهم، رسانندگی الکتریکی، درصد لوم خاک و کاهش اندازه کربن آلی، ازت و pH در برابر خاک منطقه شاهد شده است. گونه اقاقیا نیز مایه افزایش اندازه ازت، کربن آلی و پتاسیم خاک شده است. بنابراین پس از ۳۶ سال، جنگل‌کاری پیامدهای ویژه‌ای بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک داشته است.

بر پایه گزارش دیکسترا (۲۰۱۰)، افزون بر مواد آلی مرده گیاهی، ریشه، پوشش برگی درختان و تاج آنها نیز می تواند بر دگرش اکوسیستم پیامد داشته باشند. وی بیان می کندکه درختان از راه ساخت اسیدهای آلی در برگ یا دیگر تراوش ها می‌توانند بر اسیدیته یازیست فراهمی کلسیم خاک نشان بزرگی داشته باشند. درختان از راه رها کردن اندازه فراوانی از مواد آلی با ترکیبات شیمیایی گوناگون با خزان یا لاشبرگ روی خاک، بر آن نشانه می-گذارند. تجزیه و پوسیدن شاخ و برگ درختان در کف جنگل مایه دگرگونی هایی در اکوسیستم خاک می‌شود (Binkley, 2010). پوشش گیاهی گوناگونی و فراوانی جانداران خاک مانند انواع باکتری‌ها و قارچها را که خاستگاه بسیاری از آنزیم‌ها و فرآیندهای آلی خاک هستند، را دگرگون می‌کنند (Deharveng و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به جنگلکاری‌های انجام شده در۱۰ سال گذشته با گونه‌های جنگلی بومی و نابومی در منطقه بیستون در استان کرمانشاه (اداره حفاظت از محیط زیست استان کرمانشاه، ۱۳۹۲)، هدف از این پژوهش بررسی پیامدهای خوب و بد این توده‌های جنگلی بر کیفیت بیولوژیک خاک و شناسایی چگونگی پاسخ تنفس میکروبی خاک به گونه درختان است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش پس از انجام نمونه‌برداری میدانی به گونه آزمایشگاهی انجام شد که طرح آماری نمونه‌برداری این پژوهش میدانی، به گونه کاملا تصادفی بود که در آن گونه درخت (جنگل نمونه‌برداری شده در منطقه بیستون) کرت اصلی، لایه نمونه‌برداری کرت فرعی، دوری از درخت کرت فرعی-فرعی بود. دو نوع جنگل (سوزنی برگ و پهن برگ) و زمین کشاورزی شده و نشده که بر روی یک گونه مواد مادری خاک با یک درجه شیب و یک راستایی شیب است، در ۵ تیمار (زمین کشاورزی، زمین چراگاه، گونه اقاقیا، سرو نقره ای، درخت کاج) گزینش و در ۳ تکرار از لایه ۰تا ۵ سانتی متری در دو جایگاه سایه انداز و دور از درخت به گونه بختانه ای نمونه گیری شد. سپس نمونه‌های لایه خاک در آزمایشگاه از الک ۲ و ۴ میلی متری گذر داده شدند و به ۲ بخش که بخش یکم خاک تازه و دارای رطوبت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای بهره‌گیری در آزمایش‌های بیولوژیک (Alef and Nannipieri, 1995) بهره‌گیری شدند و بخش دیگر خاک هوا خشک شده در هوای آزاد که در بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مانند بافت، ماده آلی بهره‌گیری می‌شود، بکاررفت. برای اندازه گیری و برآورد تنفس نسبی باکتری و قارچ، به ترتیب به اندازه ۰/۲۵۳ گرم سیکلوهگزامید ویا پادزیست استرپتومایسین سولفات۰/۳گرم در ۱۰میلی لیتر آب مقطر حل شده و به ۲۵ گرم خاک اسپری گردید و پس از انکوباسیون در زمان ۱۶ ساعت، اندازه تنفس نسبی باکتری و قارچ با اندازه گیری مقدار تنفس آنها و در خاک گواه (بدون بازدارنده قارچ و باکتر) برآورد شد. همچنین تنفس پایه هر یک از خاک ها در یک دوره ۱۹۷ روزه با نگهداری آنها در نم نزدیک گنجایش زراعی و تاریکی در دمای آزمایشگاه اندازه گیری شد. افزون بر آن برای شناخت کارکرد ریزجانداران تند رشد و زیتوده ریزجانداران در هر نمونه خاک، تنفس برانگیخته شده با سوبسترا (SIR) نیز اندازاه گیری شد (ضفری سنجانی و همکاران، ۱۳۸۹). یافته های بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک ها در جدول ۱ گزارش شده است. ابزارهای گردآوری داده‌ها شامل یافته های تجزیه‌های آزمایشگاهی است که پردازش و تحلیل داده هاو همچنین رسم نمودارها به کمک نرم افزار های‌آماری SPSS ، Excel انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک های بررسی شده در این پژوهش را نشان می دهد.

جدول ۱- ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک های بررسی شده در هر کاربری

ویژگی	زمین چراگاه	کشاورزی	اقاقیا	کاج	سرو
pH عصاره ۱:۵	۷/۹۶	۷/۹۰	۷/۸۶	۷/۸۵	۷/۹۷
EC عصاره ۱:۵ (دسی زیمنس بر متر)	۰/۳	۰/۲۵	۰/۳	۰/۴	۰/۳
کربن آلی (درصد)	۰/۹۷	۰/۴۶	۱/۷۵	۲/۹۳	۲/۳۴
فسفر فراهم (میلی گرم بر کیلوگرم)	۱۲/۹	۱۲/۱	۱۵/۷	۳۶/۸	۲۶/۴
بافت خاک	CL	L	CL	SCL	L

یافته های تحلیل واریانس تنفس نسبی باکتری و قارچ در جدول (۲) نشان می دهد که پیامد شیوه کاربری زمین یا گونه خاک از دیدگاه آماری بر تنفس نسبی باکتری ($P<0.05$) معنی دار است ولی پیامد آن بر تنفس نسبی قارچ ها معنی دار نبود (جدول۲). یافته های آزمون میانگین پیامد شیوه کاربری زمین بر اندازه تنفس نسبی باکتری و قارچ در شکل (۱) آمده است. یافته ها نشان می دهد که بیشترین اندازه تنفس نسبی باکتری در کاربری زمین چراگاه و بیشترین اندازه تنفس نسبی قارچ نیز در کاربری درخت کاج (بخش سایه انداز و دور از گیاه) دیده شده است. کمترین اندازه تنفس نسبی باکتری و قارچ نیز به ترتیب در کاربری درخت اقاقیا (دور از گیاه) و زمین کشاورزی به دست آمد (شکل ۱).

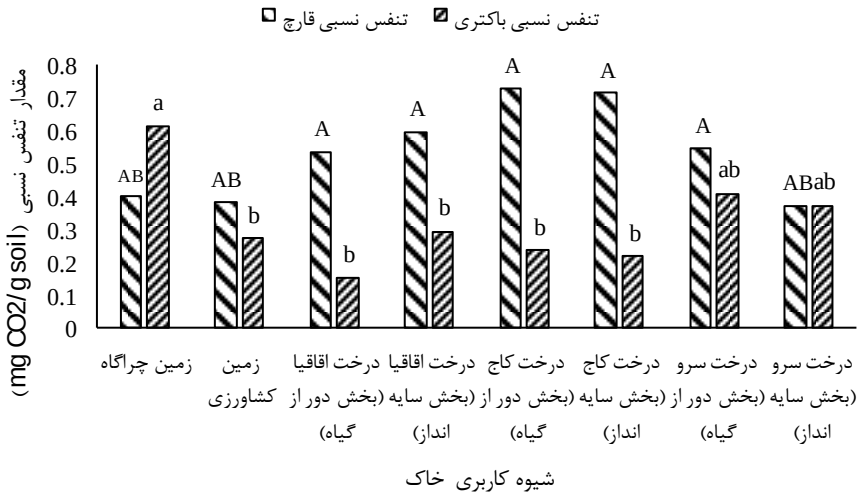
شکل (۲) اندازه تجمعی تنفس پایه خاک ها را در دوره بررسی را نشان می دهد. یافته های این بخش از پژوهش نشان می دهد که کمترین اندازه تنفس تجمعی در دوره پژوهش در کاربری زمین کشاورزی به دست آمد و پس از آن زمین چراگاه کمترین اندازه تجمعی تنفس را دارا بود. همان گونه که در شکل نیز نشان داده شده است، تفاوت چشمگیری از دیدگاه اندازه تنفس در میان کاربری های درخت کاج (بخش سایه انداز)، درخت اقاقیا (بخش سایه انداز) و درخت سرو (دور از گیاه) وجود نداشت و این کاربری ها اندازه تنفس بالایی در از خود نشان دادند. بیشترین اندازه تجمعی تنفس در دوره ازمایش نیز در کاربری درخت سرو بخش سایه انداز به دست آمد. گوناگونی اندازه تنفس برانگیخته با سوبسترا در شکل (۳) آمده است.

یافته های بدست آمده از اندازه گیری و آزمون تنفس بر انگیخته در شکل ۳ آمده است. بیشترین اندازه تنفس برانگیخته با سوبسترا در کاربری درخت اقاقیا در بخش سایه اندازه گیاه به دست آمد ولی ناهمانندی چشمگیری میان تنفس برانگیخته در کاربری های درختی دیده نشد. همانند با تنفس قارچی و تنفس پایه تجمعی کمترین اندازه های تنفس برانگیخته در کاربری های زمین کشاورزی و زمین چراگاه دیده شد (شکل ۳).

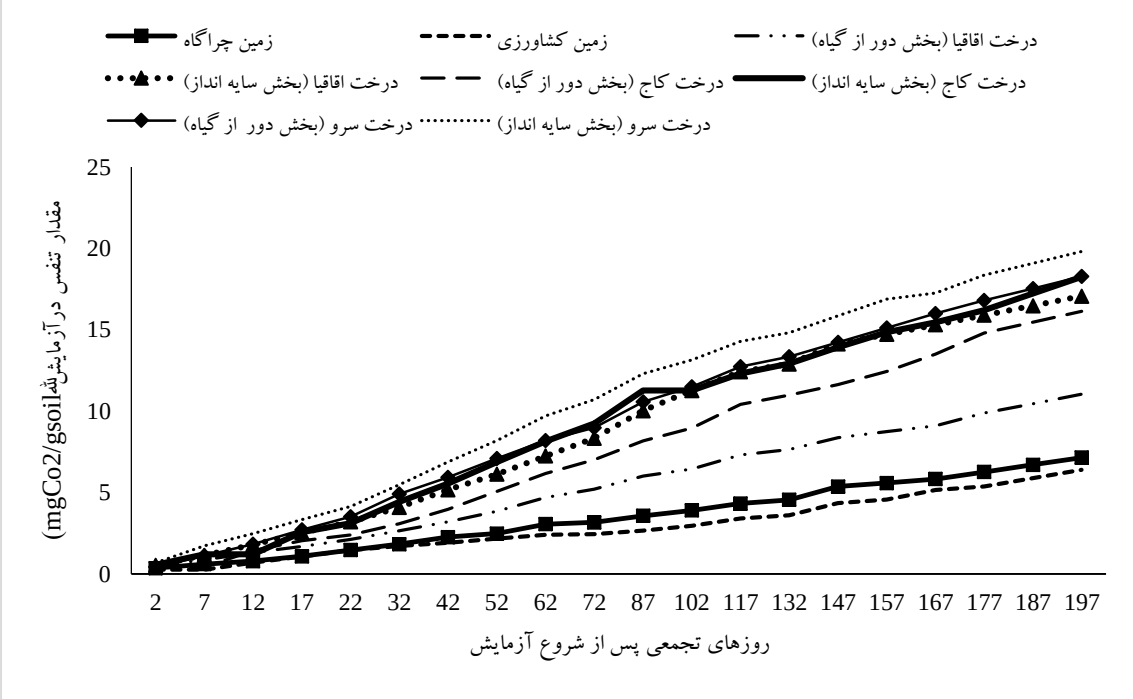
جدول ۲-تجزیه واریانس (میانگین مربع‌ها) تنفس نسبی باکتری و قارچ و تنفس برانگیخته در خاک‌های بررسی شده

منابع دگرگونی	درجه آزادی	تنفس نسبی باکتری	تنفس نسبی قارچ	تنفس برانگیخته شده با سوبسترا
شیوه کاربری زمین	۷	۰/۰۶۲*	۰/۰۶۱ns	۰/۰۰۰۵**
خطا	۱۴	۰/۰۲۳	۰/۰۴۳	۰/۰۰۰۰۲

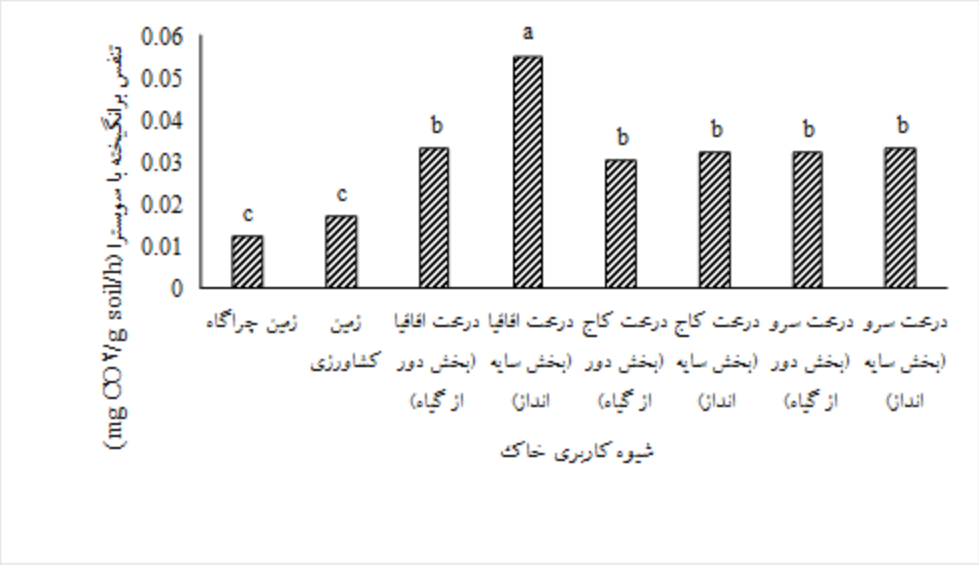
** و * به ترتیب نشان‌دهنده چشمگیر بودن پیامد تیمارها در پایه آماری ۱ و ۵ درصد است.



شکل ۱- آزمون میانگین اندازه تنفس نسبی باکتری و قارچ در کاربری های گوناگون



شکل ۲- اندازه تجمعی تنفس پایه خاک های نمونه برداری شده از کاربری های گوناگون در آزمایش انکوباسیون خاک



شکل ۳- اندازه تنفس برانگیخته با سوبسترا در شیوه های گوناگون کاربری خاک

زیتوده میکروبی از بخش پویای کربن آلی خاک می باشد و به دگرش کاربری زمین و شیوه بهره وری از خاک بسیار پاسخ دهنده است (صفری سنجانی ۱۳۹۴). زیتوده میکروبی به گونه نمایانی در جذب و دگرگونی مواد آلی تازه افزوده شده به خاک کارایی دارد (صالحی و همکاران، ۱۳۹۱). Petterson و Hogbom (۲۰۰۴) گزارش کرده‌اند که شناسه‌های کیفی خاک یکی از مهمترین عوامل بررسی شده در ارزیابی مدیریت خاک و پایداری قلمرو زیستی خاک است. خرمالی و شمسی (۲۰۰۹) نشان دادند که تنفس میکروبی خاک در زمین های کشت نشده و بدون پوشش گیاهی به گونه چشم گیری کمتر از رویشگاه‌های جنگلکاری شده است. ناهیدان و نوربخش (۲۰۰۹) نیز نشان داند که جنگل زدایی و لخت شدن خاک، اندازه تنفس میکروبی خاک را به گونه چشم گیری کاهش داده است. در پژوهش کنونی دیده شده که تنفس نسبی قارچ ها و اندازه تجمعی تنفس در زمین های درختکاری شده بسیار بالاتر از زمین های چراگاهی و کشاورزی بود. کیفیت لاشبرگ یکی از پارامترهای بسیار کارا بر کارکرد ریزجانداران خاک است و با افزایش نسبت کربن به نیتروژن لاشبرگ از فراوانی و کارکرد باکتری ها در خاک کاسته می‌شود (Kooch, 2012). در این پژوهش هر چند تنفس نسبی قارچ ها در زمینهای درخت کاری شده بیشتر بود ولی تنفس برانگیخته به گونه چشم گیری در زمینی که درخت اقاقیا (از خانواده لگوم ها) داشت، بیشترین بود. این یافته وابسته به ناهمانندی ترکیب مواد آلی رسیده به خاک در توده‌های سوزنی‌برگ (لیگنین، سلولز و پلی فنل) و تجزیه کند لاشبرگ در این رویشگاه ها است که زیستگاه شایسته تری برای قارچ ها فراهم می کنند. در برابر آن توده‌های گیاهی پهن برگ (Kooch and Zoghi, 2014) و در این پژوهش اقاقیا که مواد آلی شایسته تر برای ریزجانداران تند رشد خاک فراهم می کند مایه افزایش تنفس برانگیخته شده با سوبسترا در خاک شده است.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که درختکاری زمین های بیستون در استان کرمانشاه پیامد سودمندی بر تنفس ریزجانداران بویژه قارچ ها داشته است. بیشترین اندازه تنفس نسبی باکتری در کاربری زمین چراگاه و بیشترین اندازه تنفس نسبی قارچ نیز در کاربری درخت کاج (در هردو بخش سایه انداز و دور از گیاه) دیده شد. کاربری زمین به گونه کشاورزی و چراگاه کمترین اندازه تجمعی تنفس پایه را دارا بودند و کاربری درخت سرو در بویژه در بخش سایه انداز درخت بیشترین اندازه تجمعی تنفس پایه را داشت. روهمرفته یافته های این پژوهش نشان داد که جنگل کاری در این سرزمین مایه افزایش تنفس خاک و کیفیت بیولوژیک خاک در برابر کاربری های زمین کشاورزی و زمین چراگاه شده است که این می تواند وابسته به ترکیب های آلی رها شده و لاشبرگ فراوان این کاربری ها باشد. به هر گونه پیامد کاشت درخت اقیاقا بر بهبود زیتوده ریزجانداران در این خاکها بسیار نمایان تر است.

منابع

حق و وردی، ک. ۱۳۹۶. اثر پوششهای درختی بر شاخصهای میکروبیولوژی و تصاعد گاز دی اکسیدکربن خاک. نشریه پژوهش های حفاظت آب و خاک. ۲۴(۴): ۸۱-۶۳.

صالحی، ع.، متینی زاده، ع.، تمجیدی، ج. ۱۳۹۱. تاثیر جنگل کاری با گونه های توسکا قشلاقی و کاج تدا روی فعالیت و زیتوده میکروبی خاک. تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۲(۲): ۳۴۵-۳۳۴.

صفری سنجانی، ع.ا.؛ شریفی، ز.؛ صفری سنجانی، م. ۱۳۸۹. روش های آزمایشگاهی در میکروبیولوژی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. ۵۲۵ صفحه.

صفری سنجانی، ع.ا.۱۳۹۴. مواد آلی خاک. چاپ نخست. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. ۳۶۴ صفحه.

متین کیا.م،پیله ور. ب، متین فر. ح. (۱۳۹۰). اثر جنگلکاری با گونه های سوزنی برگ و پهن برگ بر برخی از خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک (مطالعه موردی: پارک جنگلی شهرستان دورود)، فصلنامه اکوسیستم های طبیعی ایران، زمستان، ۲(۲):۹۷-۸۹.

Alef K. and Nannipieri P. (1995). methods in applied soil microbiology and Biochemistry. (1n 5. Gee, G. W. and Bauder, J. W. (1990). Particle sizeanalisis. P. 383-411. In: A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part d Ed.). Academic press.

Binkley, D. , (2010). The influence of tree species on forest soils, processes and patterns. In: Proceedings of the trees and soil workshop9 Mead, D. J. , and I. S. Cornforth, Eds. . . Agronomy Society of New Zealand Special Publication#10, Lincoln University Press, Canterbury.

Deharveng, L., (2011). Soil collembola diversity, endemism and reforestation: A case study in the Pyrenees (France). Conservation Biology, 10: 74-84.

Paz-Ferreiro, J., Fu, S., (2013). Biological indices for soil quality evaluation: perspectives and limitations. Land Degrad. Develop.

Schrijver, A., Frenne, P., Staelens, J. , Verstraeten, G. , Muys, B. , Vesterdal, L. , and Verheyen, K. (2012). Tree species traits cause divergence in soil acidification during four decades of postagricultural forest development. *Global Change Biology*, *18*(3), 1127-1140.

Thoms, C., Gattinger, A., Jacob, M. , Thomas, F. M. , and Gleixner, G. (2010). Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(9), 1558-1565.

Vesterdal, L., Clarke, N. , Sigurdsson, B. D. , and Gundersen, P. (2013). Do tree species influence soil carbon stocks in temperate and boreal forests? *Forest Ecology and Management*, *309*, 4-18.

Pettersson, F., and Hogbom, L. 2004. Long-term growth effects following forest nitrogen fertilization in Pinus sylvestris and Picea abies stands in Sweden. Scandinavi. J. For. Res. 19: 339-347.

Yadav, R.S., Yadav, B.L., Chipa, B.R., Dhyani, S.K., and Ram, M. 2010. Soil biological properties under different tree based traditional agroforestry systems in a semi - arid region of Rajasthan, India. Agroforestry System. 81: 195-202.

Nahidan, S., and Noorbakhsh, F. 2009. The impact of management History of soil organic carbon on Btaglvkvzydaz enzyme sensitive to heavy metals. 11th Soil Science Congress of Iran. Gorgan Univ. (In Persian)

Khormali, F., and Shamsi, S. 2009. Micromorphology and quality attributes of the loess derived soils affected by land use change: a case study in Ghapan watershed, northern Iran. J. Moun. Sci. 6: 197-204

Kooch, Y., and Zoghi, Z. 2014. Comparison of soil fertility of Acer insigne, Quercus castaneifolia and Pinus brutia stands in the Hyrcanian forests of Iran. Chine. J. Appl. Environ. Biol. 20: 899-905.

Kooch, Y. 2012. Soil variability related to pit and mound, canopy cover and individual trees in a Hyrcanian Oriental Beech stand. Ph.D. Thesis, Tarbiat Modares University, 203p. (In Persian)

Sagar, S., Hedley, C.B., and Salt, G.J. 2001. Soil microbial biomass, metabolic quotient and carbon and nitrogen mineralization in 25-year-old Pinus radiata agroforestry regimes. Austr. J. Soil Res. 39: 491-504.

Topic for submission: Soil Biology

Comparing the soil fungal and bacterial respiration in different landuses (Case study: Bisetoon, Kermanshah)

Sahar Mehrnoosh*[1] ،Ali Beheshti ale agha[2], Morteza Pourreza[3], Ali akbar Safari Sinegani[4]

[1] M. Sc. Student, Department of Soil Science, Razi University, kermanshah, Iran

[2] Assistant Prof, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah

[3] Assistant Prof, Department of Natural Resources, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah

[4] Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan

Abstract

The emergence of soil in forest ecosystems with tree species is unclear. Also, tree species has a direct and indirect effect on the biological and non-toxic properties of the soil. The present study was conducted to study the positive and negative effects of forest vegetation on the quality of soil biology (with particular attention to the biological quality of soil). The results showed that the highest amount of respiration of the bacteria was observed in the pasture land and the highest relative respiration rate of the fungus have been observed in the use of pine (shade and open air).for cumulative basal respiration, agricultural land use and pasture land had the lowest cumulative basal respiration and the use of the cypress tree in the shade recorded the highest aggregate basal respiration. In total, the findings showed that plantation in the area caused a significant increase in the microbial population, soil respiration and, consequently, the biological quality of the soil, rather than the use of agricultural land and pasture land, which can be due to the presence of abundant litters and rich resources Carbon in these land-uses.

Keywords: Biomass, Organic Carbon, Soil respiration

* Corresponding author, Email : sahar.mehrnoosh71@gmail.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی اثر باکتری‌های حل‌کننده روی و پتاسیم بر صفات رویشی برنج (رقم طارم هاشمی)

فضه قلی‌تبار فرامرزی[۱]، همت‌اله پیردشتی[۲]، اسماعیل بخشنده[*]

[۱] دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۲] پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده

با توجه به اهمیت و ضرورت کشاورزی پایدار در حال حاضر استفاده از کودهای زیستی جهت تعدیل مصرف کودهای شیمیایی امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. این آزمایش با هدف بررسی اثر دو باکتری افزاینده رشد *Rahnella aquatilis* و *Burkholderia cenocepacia* بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) در اوایل دوره رشد به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. تیمارها شامل تلقیح جداگانه‌ی هر یک از باکتری‌ها *R. aquatilis*، *B. cenocpacia*، ترکیبی *R. aquatilis+B. cenocpacia* و شاهد (عدم تلقیح) بودند. طبق نتایج استفاده تلفیقی از دو باکتری *R. aquatilis* و *B. cenocpacia* بیشترین تأثیر را بر رشد رویشی برنج داشت. کاربرد این باکتری‌ها سبب افزایش تمامی صفات از قبیل ارتفاع بوته (۲۴/۰ درصد)، طول ریشه (۵۰/۳ درصد)، حجم ریشه (۲/۸ برابر)، وزن خشک ساقه (۵۵/۹ درصد)، وزن خشک برگ (۷۲/۷ درصد) و وزن خشک ریشه (۵۶/۷ درصد) نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین بیشترین تأثیر این ریزجانداران به‌ترتیب در ریشه، برگ و ساقه مشاهده گردید. بنابراین، استفاده از این باکتری‌ها و مخصوصا روش تلفیقی می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب جهت افزایش رشد گیاهچه برنج و تولید نشاء قوی‌تر در شرایط خزانه پیشنهاد گردد.

کلمات کلیدی: باکتری افزاینده رشد، گیاهچه برنج، خزانه، *Rahnella aquatilis*، *Burkholderia cenocepacia*

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) پس از گندم دومین منبع غذایی بشر به‌شمار می‌آید. سطح زیر کشت این گیاه در ایران حدود ۵۹۷ هزار هکتار با تولید متوسط ۵۳۶۶ کیلوگرم در هکتار بوده که حدودا ۰/۴ درصد سطح زیرکشت و تولید دنیا را شامل می‌گردد (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۷). بیش از ۷۰ درصد از اراضی شالیزاری کشور در دو استان گیلان و مازندران قرار دارد (امیری‌لاریجانی، ۱۳۸۹). عنصر پتاسیم پس از نیتروژن و فسفر یکی از مهمترین عناصر پرمصرف در رشد گیاه برنج می‌باشد که از جمله اثرات مثبت آن می‌توان به افزایش تعداد پنجه، تعداد خوشه، سطح برگ، طویل شدن ریشه و ضخیم شدن ساقه برنج اشاره نمود (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ گیلانی و همکاران، ۱۳۹۷؛ شهسوارپورلنده و همکاران، ۱۳۹۷). علاوه بر این، عنصر روی در فعال‌سازی آنزیم‌های مختلف نقش دارد. به عنوان مثال، آنزیم کربنیک‌آنهیدراز اختصاصا توسط روی فعال می‌گردد (محمودی و همکاران، ۱۳۸۳). این عنصر در فرایندهای اکسیداسیون سلول‌های گیاهی تأثیرگذار می‌باشد و در انتقال کربوهیدرات‌ها نقشی حیاتی ایفا نموده و به تولید کلروفیل و تشکیل اکسین نیز کمک می‌کند (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۲). کمبود عنصر روی یکی از مشکلات جهانی در تولید غلات محسوب می‌شود و پس از کمبود نیتروژن و فسفر یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد در گیاه برنج تلقی می‌گردد (محمودی و همکاران، ۱۳۸۳؛ رمضانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Yaghoubi Khanghahi و همکاران، ۲۰۱۸). امروزه جهت دسترسی گیاه به عناصر مورد نیاز و عملکرد بهینه استفاده از کودهای شیمیایی امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. افزایش قیمت، اتمام منابع اولیه و آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی

*ایمیل نویسنده مسئول: e.bakhshandeh@sanru.ac.ir & bakhshandehesmail@gmail.com

محققین را بر آن داشته تا راهکار مناسبی جهت کاهش مصرف این نهاده‌ها ارائه نمایند. یکی از این راهکارها استفاده از کودهای زیستی می‌باشد که می‌تواند سبب بهبود وضعیت خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی شوند (محمدی‌کشکا و همکاران، ۱۳۹۶). در واقع، کود زیستی به ترکیبی اطلاق می‌گردد که حاوی یک یا چند گونه ریزجاندار بوده و اثرات مثبتی بر رشد گیاه میزبان دارد. ریزجانداران موجود در کودهای زیستی معمولا به دو روش مستقیم (تثبیت نیتروژن اتمسفری، تولید برخی هورمون‌های رشد مانند اکسین و سیتوکنین، انحلال برخی ترکیبات نامحلول حاوی فسفر، پتاسیم و روی) و غیرمستقیم (تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید، خصوصیت بیوکنترلی و فعال‌سازی مکانیزم‌های القای مقاومت) در گیاه سبب بهبود رشد آن‌ها خواهد شد (شهسوارپورلنده و همکاران، ۱۳۹۷). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم و روی به صورت جداگانه و یا ترکیبی بر رشد گیاه برنج در شرایط خزانه جهت دستیابی به گیاهچه‌های قوی‌تر اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرکز جهاد کشاورزی لاله‌آباد واقع در زرگرمحله شهرستان بابل به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ انجام شد. تیمارها شامل تلقیح جداگانه‌ی هر یک از باکتری‌ها *Rahnella aquatilis*، *Burkholderia cenocpacia*، ترکیبی *R. aquatilis*+ *B. cenocpacia* و شاهد (عدم تلقیح) بودند. این ریزجانداران از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شدند. توانایی انحلال پتاسیم نامحلول (از منبع میکا) باکتری *R. aquatilis* در شرایط آزمایشگاهی حدود ۱۵/۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش گردید (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۷). همچنین، کارایی انحلال اکسید روی نامحلول توسط باکتری *B. cenocpacia* پس از ده روز کشت در محیط کشت جامد برابر ۴۳۱ درصد ((قطر هاله/قطر کلونی)×۱۰۰) بود (اطلاعات منتشر نشده). جهت تلقیح بذرهای جوانه‌دار (با طول ریشه‌چه حدود سه میلی‌متر) به مدت چهار ساعت در ۴/۵ لیتر از سوسپانسیون حاوی هر یک از باکتری‌ها (۱۰۰ میلی‌لیتر از باکتری با جمعیت 10^7 سلول زنده در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب) غوطه‌ور شدند. در تیمار ترکیبی، ۵۰ میلی‌لیتر از باکتری *R. aquatilis* و ۵۰ میلی‌لیتر از باکتری *B. cenocpacia* با جمعیت 10^7 سلول زنده در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و سوسپانسیون تهیه شد. سپس بذرها به کمک آبکش از سوسپانسیون خارج و در کرت‌هایی به ابعاد ۱×۴ متر پخش گردیدند. بلافاصله خزانه با پلاستیک سفید پوشیده شد. کلیه‌ی عملیات خزانه تحت شرایط مطلوب مدیریتی انجام شد. صفات رویشی ۳۰ روز پس از بذرپاشی اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ارتفاع گیاه با خط‌کش و حجم ریشه با استفاده از استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک به تفکیک اندام‌ها، نمونه‌ها در آون و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن خشک ثابت قرار گرفتند. تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) و در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تمامی صفات رویشی از قبیل ارتفاع بوته، تعداد کل برگ در بوته، طول ریشه، حجم ریشه، وزن خشک برگ، ساقه و ریشه به صورت معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای مختلف باکتری قرار گرفت (جدول ۱). از نظر ارتفاع بوته بین تیمارهای مختلف باکتری و شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت، اما بین تیمارهای مختلف باکتری اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). به طور مشابه، کاربرد باکتری *Entrobacter* sp. در گندم سبب افزایش ارتفاع بوته شد (محمدی‌کشکا و همکاران، ۱۳۹۵). در آزمایشی دیگر، کاربرد باکتری افزاینده رشد *R. aquatilis* و *Enterobacter* sp. موجب افزایش ارتفاع بوته برنج گردید که علت آن به توانایی تولید ایندول استیک اسید توسط این باکتری‌ها نسبت داده شد (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ شهسوارپور و همکاران، ۱۳۹۷).

طول ریشه، حجم ریشه، تعداد کل برگ در بوته، وزن خشک ساقه، برگ و ریشه در زمان کاربرد باکتری حل‌کننده روی به‌ترتیب ۲۸/۱، ۱۵۶/۵، ۵/۸۹، ۵۳/۱، ۶۸/۸ و ۲۱/۶ درصد، در زمان کاربرد باکتری حل‌کننده پتاسیم به‌ترتیب ۳۳/۶، ۳/۰۴، ۴/۷۵، ۳۳/۸، ۴۶/۷ و ۲۹/۷ درصد و در زمان کاربرد ترکیبی باکتری حل‌کننده روی+پتاسیم به‌ترتیب ۵۲/۳، ۲۰۸/۷، ۱۵/۹، ۵۵/۹، ۷۲/۷ و ۵۶/۷ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (جدول ۱).به طور مشابه، حضور باکتری‌های *R. aquatilis*، *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* با بهبود رشد ریشه که نتیجه آن تسهیل در جذب آب و عناصر غذایی می‌باشد سبب افزایش وزن خشک ساقه، برگ و ریشه و شاخص سطح برگ در برنج گردید (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۵). در گندم، کاربرد تلفیقی باکتری *Entrobacter* sp. و قارچ *Trichoderma hamatum* سبب افزایش صفاتی همچون طول سنبله، عملکرد

دانه و زیست توده شد (محمدی‌کشکا و همکاران، ۱۳۹۵). در واقع، این ریزجانداران از طریق سازوکارهای مختلف نظیر تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های رشد مانند ایندول استیک اسید، سیتوکنین و جیبرلین، حل‌کردن ترکیبات نامحلول حاوی فسفر، پتاسیم و روی، تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید، القای مقاومت به طور مستقیم و غیرمستقیم بر رشد گیاهان اثر می‌گذارند (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) و مقایسه میانگین هر یک از صفات مورد مطالعه سی روز پس از بذرپاشی برنج (رقم طارم هاشمی) تحت تأثیر باکتری‌های افزاینده رشد

صفات	تجزیه واریانس		تیمارباکتری			
	باکتری	ضریب تغییرات (درصد)	شاهد	*R. aquatilis*	*B. cenocpacia*	*R. aqatillis + B. cenocpacia*
درجه آزادی	۳					
ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	۴۳/۲**	۴/۶۱	۳۶/۲۳b	۴۳/۱۶(+۱۹/۱۳)a	۴۴/۹۳(+۲۴/۰۲)a	۴۲/۵۴(+۱۷/۴۳)a
تعداد کل برگ در بوته	۰/۴۷*	۶/۱۵	۵/۸۸۷b	۶/۱۶۷(+۴/۷۷۵)ab	۶/۲۳۳(+۵/۸۸۶)ab	۶/۸۲۷(+۱۵/۹۷)a
وزن خشک برگ در بوته (گرم)	۰/۰۰۰۸**	۸/۸۶	۰/۰۵۱۳b	۰/۰۷۵۳(+۴۶/۷۳)a	۰/۰۸۶۶۷(+۶۸/۸۳)a	۰/۰۸۸۷(+۷۲/۷۳)a
وزن خشک ساقه در بوته (گرم)	۰/۰۰۰۴*	۱۱/۸	۰/۰۴۵۳b	۰/۰۶۰۷(+۳۳/۸۲)a	۰/۰۶۹۴(+۵۳/۱۸)a	۰/۰۷۰۷(+۵۵/۸۹)a
وزن خشک ریشه در بوته (گرم)	۰/۰۰۰۱*	۱۶/۲	۰/۰۲۴۷b	۰/۰۳۲۰(+۲۹/۷۲)ab	۰/۰۳۰۰(+۲۱/۶۲)ab	۰/۰۳۸۷(+۵۶/۷۶)a
طول ریشه (سانتی‌متر)	۱۲/۱*	۱۳/۱	۹/۲۹۳b	۱۲/۴۱(+۳۳/۵۷)ab	۱۱/۹۱(+۲۸/۱۳)ab	۱۴/۱۵(+۵۲/۳۰)a
حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب)	۰/۰۷*	۱۸/۷	۰/۱۵۳۳b	۰/۲۰۰۰(+۳/۰۴۴)b	۰/۳۹۳۳(+۱۵۶)a	۰/۴۷۳۳(+۲۰۸)a

** و * به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد می‌باشد.

اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده درصد افزایش هر یک از صفات نسبت به تیمار شاهد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، در اکثر صفات تیمار تلفیقی باکتری حل‌کننده روی+پتاسیم بهتر از استفاده جداگانه هر یک از باکتری‌ها و یا عدم کاربرد این ریزجانداران بود. بنابراین، کاربرد این باکتری‌ها به‌ویژه به صورت تلفیقی می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب جهت افزایش رشد گیاهچه برنج و تولید نشاء قوی‌تر در شرایط خزانه پیشنهاد گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی ساری بابت حمایت‌های مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

آمارنامهٔ وزارت جهاد کشاورزی(۱۳۹۷). آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵(محصولات زراعی). دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

امیری‌لاریجانی، ب. ۱۳۸۸. آماده سازی زمین و کاشت برنج. جلد ۱. نشر آموزش کشاورزی. کرج. ایران. ۱۷۹ص.

رمضانی، ا.، سروش زاده، ع و صلحی، م. ۱۳۹۵. اثر سیستم‌های کشت و تغذیه برگی با کود روی بر عملکرد، اجزای عملکرد و آب مصرفی برنج. تحقیقات غلات ، ۶(۱): ۵۵-۴۳.

شهسوارپورلنده، خ.، پیردشتی، ه. و بخشنده، ا . ۱۳۹۷. اثر باکتری های بومی افزاینده رشد بر صفات رویشی و عملکرد برنج (رقم طارم هاشمی) تحت تاثیر سطوح مختلف کود پتاسیم. مجله به زارعی کشاورزی، ۲۰(۱): ۲۴۷-۲۳۵.

قاسمی، م.، مبصر، ح.ر.، اسدی منش، ح و قلی زاده، ع. ۱۳۹۳. بررسی اثرات پتاسیم، روی و سیلیسیم بر عملکرد، اجزای عملکرد و جذب آنها در دانه برنج(*Oryza sativa* L). نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۴(۲): ۲۴-۱.

گیلانی، ز.، پیردشتی، ه و بخشنده، ا. ۱۳۹۷. اثر کود پتاسیم به همراه قارچ *Piriformospora indica* و باکتری *Pantoea ananatis* بر عملکرد، اجزای عملکرد و جذب پتاسیم در برنج رقم طارم محلی . نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، ۲۸(۳): ۵۴-۴۳.

محمدی‌کشکا، ف.، پیردشتی، ه.، یعقوبیان، ی و بخشنده، ا. ۱۳۹۵. ارزیابی صفات رشدی و پایداری عملکرد گندم با کاربرد تریکودرما و اینتروباکتر. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، ۲۶(۴): ۱۵-۱.

محمدی‌کشکا، ف.، پیردشتی، ه و یعقوبیان، ی. ۱۳۹۶. مایه زنی قارچهای *Trichoderma virens* و *Piriformospora indica* جهت بهبود صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مرتبط با عملکرد برنج در مقادیر مختلف کود فسفر. مجله اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، ۱۱(۴): ۸۷۴-۸۵۷.

محمودی، م.، ملکوتی، م.م.، رمضان پور، م.ر و ولی نژاد، م. بررسی تاثیر سولفات روی بر عملکرد ۲ رقم برنج در شرق مازندران. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۱(۲)، ۶۳-۵۵.

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H., and Nematzadeh, G. A. 2015. Evaluation of phosphate solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. Journal of Applied Microbiology, 119:1371-1382.

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H., and Nematzadeh, G. A. 2014. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30:2437-2447.

Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., and Shahsavarpour Lendeh, K. 2017. Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. Ecological Engineering, 103:164-169.

Yaghoubi Khanghahi, M., Ricciuti, P., Allegretta, I., Terzano, R., and Crecchio, C. 2018. Solubilization of insoluble zinc compounds by zinc solubilizing bacteria (ZSB) and optimization of their growth conditions. Environmental Science and Pollution Research, 25:25862-25868.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of zinc and potassium solubilizing bacteria on vegetative characteristics of rice (cv. Tarom Hashemi)

Gholitabar Faramarzi, F., Pirdashti, H., Bakhshandeh[*1], E.

[1] Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[2] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan and Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

Considering the importance and necessity of sustainable agriculture, it is now inevitable to use biofertilizers to reduce the use of chemical fertilizers. This experiment was carried out based on a randomized completed block design with three replicates, to investigate the effect of two plant growth promoting bacteria (PGPB) including *Rahnella aquatilis* (Ra) and *Burkholderia cenocepacia* (Bc) on some vegetative physiological characteristics of rice (cv. 'Tarom Hasheni') during early stages of growth in 2019. Treatments were the single (Ra and Bc) and co-inoculation of this PGPB (Ra + Bc) plus a control (non-inoculation). Results indicated that the co-inoculation treatment (Ra + Bc) was the best among all treatments. Application of this treatment increased the amount of all studied traits such as plant height (24.0%), root length (50.3%), root volume (2.8-fold), stem dry weight (55.9%), leaves dry weight (72.7%), root dry weight (56.7%) compared to the control (non-inoculation). In addition, among the rice plant tissues root > leaves > stem were affected by PGPB. Therefore, the application of PGPB, particularly as a co-inoculation treatment, could be suggested to enhance rice seedling growth and to produce stronger seedling in seedbed condition.

Keywords: Plant growth promoting bacteria; rice seedling; *Rahnella aquatilis; Burkholderia cenocepacia*; seedbed.

[*] Corresponding author, Email: bakhshandehesmail@gmail.com & e.bakhshandeh@sanru.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

استفاده از شاخص مارگالف در تعیین گوناگونی کرمهای خاکی سطح‌زی در اکوسیستم‌های مختلف

مجتبی یحیی‌آبادی*

عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

چکیده

کرم‌های خاکی سطح زی توانایی زیادی در مصرف، هضم و تبدیل مواد آلی داشته و سیکل کوتاه زندگی و نرخ تکثیر زیاد این کرم‌ها، موجب پتانسیل زیاد آنها در فرآیند تولید ورمی‌کمپوست شده است. در این تحقیق، تنوع کرم‌های خاکی سطح زی در ۱۰ اکوسیستم (شامل ۲۰ زیستگاه) استان اصفهان بررسی شدند. از شاخص تنوع گونه‌ای مارگالف برای تعیین شاخص تنوع استفاده گردید. در مجموع چهار گونه کرم‌های خاکی، متعلق به خانواده‌ی Lumbricidae شامل *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886)، *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)، *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1826) و *Dendrobaena hortensis* (Michaelsen, 1890) و بر اساس خصوصیات مارکرهای مورفولوژیک مانند طول بدن، قطر بدن، تعداد حلقه‌های بدن (segment)، تعیین تعداد خارهای حرکتی (setae) در هر حلقه، رنگ بدن، شماره حلقه‌های محل استقرار کمربند جنسی و تعیین محل قرار گیری غده شکمی در کمربند جنسی (Tubercle)، شناسایی شدند. بیشترین فراوانی به گونه‌ی *Dendrobaena veneta* اختصاص یافت و کمترین فراوانی در گونه‌ی *Dendrobaena hortensis* مشاهده شد. بیشترین عدد شاخص غنای گونه‌ای مارگالف به میزان ۰/۹۱۰ در اکوسیستم چادگان مشاهده شد که حاکی از شرایط بهینه‌ی زیست کرم‌ها در زیستگاه‌های این منطقه بود در حالی‌که کمترین میزان شاخص مارگالف به میزان صفر در منطقه انارک ثبت شد.

کلمات کلیدی: کرم‌های خاکی، مارگالف، اصفهان، اپی‌جییک

مقدمه

فراوانی نسبی و ترکیب جمعیتی جانوران بومی خاکی بطور کلی بستگی به خاک، آب و هوا، پوشش گیاهی، نوع کاربری خاک و همچنین هجوم گونه‌های غیر بومی دارد(Hale و همکاران، ۲۰۰۰). انتخاب و گسترش برخی از گونه‌های خاص کرم‌های خاکی(بمنظور تولید ورمی‌کمپوست) و به ویژه گونه‌های غیر بومی موجب کاهش تنوع زیستی گونه‌های بومی در زیستگاه‌های خود شده و نقش مثبت آنها را کمرنگ می‌کنند. اولین تحقیقات شناسایی کرم‌های خاکی در ایران توسط عمرانی (۱۹۷۳) انجام شد. در سال‌های اخیر نیز تحقیقاتی توسط لطیف و همکاران (۲۰۰۹) و عزت پناه و همکاران (۲۰۱۰) به انجام رسیده است. در ایران، کرم‌های خاکی عمدتاً به منظور تولید ورمی‌کمپوست استفاده شده و برای این کار از کرم‌های گونه *Eisenia fetida* استفاده می‌شود. از نظر تاکسونومی، کرم‌های خاکی متعلق به شاخه *Annelida* راسته *Haplotaxina*، رده *Clitellata* و زیر رده *Oligochaeta* هستند. خانواده‌های *Megscolecidae* و *Lumbricidae* از مهمترین خانواده کرم‌های خاکی می‌باشند که در اروپا، شمال آمریکا، استرالیا و آسیا غالب هستند(Edwards و Bohlen، ۱۹۹۶). در خانواده *Lumbricidae*، نزدیک به۳۰۰ گونه کرم خاکی وجود دارد. از نظر محیط اکولوژیک ، کرم‌های خاکی را به سه دسته عمده، Anecic, Endogeic, Epigeic تقسیم‌بندی می‌کنند (Lee، ۱۹۸۵). کرم‌های Epigeic، عمدتاً از توده‌های کمپوست، لاشبرگ‌های سطحی و کودهای دامی و بقایای گیاهی و حیوانی تازه فاسد شده تغذیه می‌کنند. از کرم‌های خاکی این گروه اپی‌جییک، می‌توان به گونه‌های *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* اشاره کرد. کرم‌های خاکی گروه Endogeic، انواعی هستند که در قسمتهای عمقی خاک زندگی می‌کنند و از خاک تغذیه کرده و عناصر غذایی را از مواد آلی تجزیه شده تأمین می‌کنند. در این گروه می‌توان به گونه‌ی *Allolobofora calginosa* اشاره کرد. کرم‌های خاکی گروه Anecic، از کرم‌های حفار هستند و در شب برای تغذیه بقایای تازه فاسد شده به

* ایمیل نویسنده مسئول: yahyabadi@gmail.com

سطح می‌آیند یعنی از سطح تا عمق خاک رفت و آمد می‌کنند. از این گروه می‌توان به گونه *Allolobofora longa* اشاره کرد. گونه‌های مهم دیگری که در بازیافت ضایعات آلی بکار برده شده‌اند، شامل کرم‌های *Euderilus eugeniae* و کرم‌های آبی *Perionyx excavatus* هستند که بومی مناطق گرم آسیا و آفریقا هستند و در دماهای پایین غیر فعال میشوند (Reineck و همکاران، ۱۹۹۲). Edwards و همکاران (۱۹۸۸) معتقدند که هریک از گونه‌های کرمهای اپی‌جئیک از نظر قدرت تولید مثل، شرایط دمایی و تبدیل مواد آلی به ورمی کمپوست با هم متفاوت می‌باشند. در استرالیا، مهمترین گونهٔ مورد استفاده برای تولید ورمی‌کمپوست، گونهٔ *Eisenia fetida* است که بدلیل سرعت رشد و تکثیر و پتانسیل کافی برای مصرف انواع مواد آلی زاید، بیش از سایر گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. Edwards (۱۹۹۵)،گزارش کرد که حداکثر سرعت تکثیر گونه *Eisenia fetida* در فضولات حیوانی ۳/۸ کرم به‌ازای هر کرم در هفته است(۸). Reinecke و همکاران (۱۹۹۲)، نیز رقم ۰/۳۵ کرم به ازای هر کرم در روز را گزارش کردند. هاشمی مجد(۱۳۸۲)، در برخی از مناطق شمالی ایران اقدام به شناسایی گونه‌های *Eisenia fetida* کرده و توان این گونه در تولید ورمی‌کمپوست را مورد ارزیابی قرار داد. Paoletti (۱۹۹۹)، به‌منظور بررسی نقش کرم‌های خاکی در ارزیابی پایداری خاک ، اقدام به شناسایی کرم‌های خاکی در تمام گروههای اکولوژیک کرد. وی تأثیر فعالیت‌های کشاورزی را بر تعداد و انواع کرم‌های خاکی با اهمیت تلقی نمود و بر استفاده از کرم‌های اپی‌جییک در تبدیل بقایای گیاهی تأکید نمود. Suthar (۲۰۱۱)، اقدام به تعیین تنوع زیستی کرمهای خاکی در غرب هند کرد و موفق به شناسایی یازده گونه کرم خاکی در این مناطق شد. وی حضور این کرمها را وابسته به عوامل اقلیمی و فعالیت‌های انسانی دانست. در سالهای اخیر تمایل محققین علوم خاک و محیط زیست به کار روی کرمهای خاکی اپی‌جئیک، افزایش یافته است؛ از این رو تحقیق حاضر با هدف شناسایی این گروه از کرم‌های خاکی در اکوسیستم‌های مختلف استان اصفهان انجام شد.

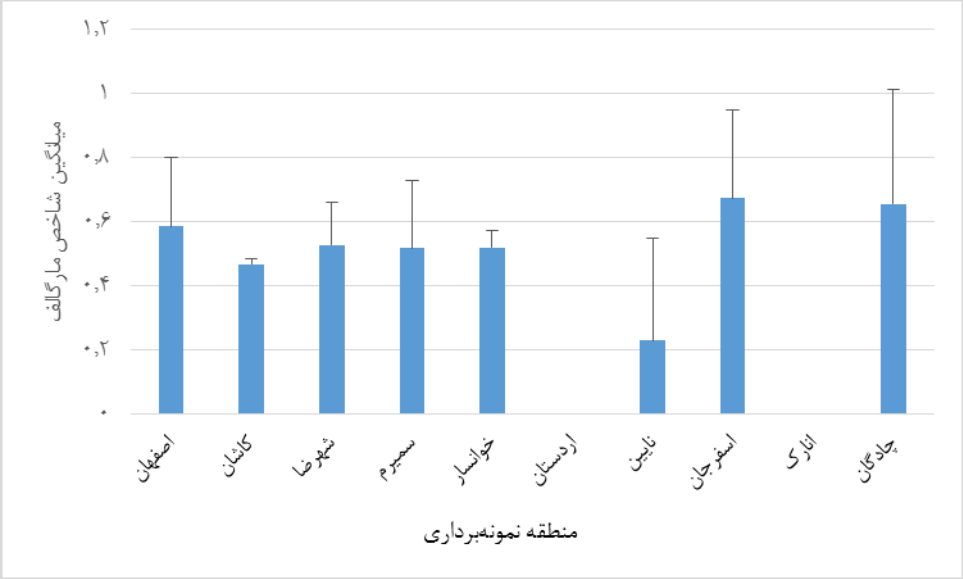
مواد و روش‌ها

ابتدا ده نقطه از استان به منظور انجام نمونه‌برداری انتخاب شدند. ده منطقه به گونه‌ای انتخاب شدند تا بیانگر اکثر اقلیم‌های استان باشند. همچنین بیست کد محل نیز به نحوی انتخاب شدند که بتوان بیشترین گونه کرمهای خاکی اپی‌جئیک را یافت و از سویی دیگر بتوان بیشترین تنوع زیستگاه کرمهای خاکی را در این تحقیق مورد بررسی قرار داد همچنین در هر کدمحل، سه بار نمونه‌برداری از کرم‌ها انجام شد. به منظور شناسایی و انتخاب کرمهای مورد نظر ، اقدام به نمونه برداری به روش دستی از کرمهای خاکی موجود در خاکهای سطحی و لاشبرگهای باغات، فضاهای سبز شهری، محل تجمع کودهای حیوانی در مزارع، کنار رودخانه‌ها و برکه‌ها شد. کرم‌ها و بخشی از محیط بستر آنها به آزمایشگاه منتقل گردیدند و در مخلوط الکل و استون تثبیت شدند و با استفاده از بایئوکولار، برخی از مشخصات مورفولوژیک (مارکرهای مورفولوژیک) آنها ثبت گردید تا در شناسایی گونه‌ی کرم، مورد استفاده قرار گیرد. برای شناسایی کرمها از کلید Csuzdi وZicsi (۲۰۰۳) و کلید شناسایی Blakemore (۲۰۰۲) استفاده شد. به منظور محاسبه تنوع زیستی گونه‌های مختلف کرمهای خاکی گروه اپی‌جئیک در زیستگاه‌های مختلف، از یکی از شاخص‌های غنای گونه‌ای استفاده گردید. از معتبرترین شاخص های اندازه‌گیری غنای گونه‌ای، شاخص مارگالف است. هر چه مقدار این شاخص بیشتر باشد حاکی از تعداد بیشتر گونه‌ها می باشد و این بیانگر این مطلب می باشد که در محیط، آشفتگی و استرس پایین است، زیرا در شرایط نامطلوب محیطی، گونه‌های حساس از بین رفته و گونه‌های مقاوم جایگزین می‌شوند، در این حالت غنای گونه‌ای در جامعه کاهش یافته است. در این بررسی، میانگین شاخص غنای گونه ای با استفاده از کوادرات به مساحت یک صد سانتیمتر مربع بدست آمد. برای محاسبه این شاخص از نرم افزار Paleontological Statistics (PAST 1.93) استفاده شد.

نتایج و بحث

در مجموع چهار گونه از کرمهای خاکی گروه سطح‌زی شناسایی شدند. در منطقه شهرستان اصفهان، دو کد محل (فضای سبز شهری و ساحل رودخانه) مورد بررسی قرار گرفت و در فضای سبز شهری دو گونه‌ی *D. veneta* و *E. fetida* شناسایی شدند. در زیستگاه ساحل زاینده رود نیز گونه‌های *D. veneta* و E. fetida شناسایی شدند. همچنین امکان شناسایی یک گونه متمایز دیگر نیز در این محل میسر نشد. شاخص مارگالف در فضای سبز شهری برابر ۰/۴۳۴ و در ساحل رودخانه معادل ۰/۷۳۸ محاسبه شد؛ بنابراین غنای گونه‌ای در ساحل رودخانه بیشتر بوده است. در منطقه کاشان، دو کد محل فضای سبز شهری و باغ گل محمدی برای بررسی تنوع کرمهای خاکی گروه اپی جییک انتخاب شدند. در زیستگاه فضای سبز شهری گونه‌ی *Dendrobaena veneta* و گونه‌ی *Dendrodrilus rubidus* نمونه‌برداری و شناسایی شدند. در زیستگاه خاک باغ، گونه‌ی *E.*

fetida و *D. rubidus* شناسایی شدند. شاخص غنای گونه‌ای مارگالف برای فضای سبز شهری ۰/۴۵۵ و در خاک باغ معادل ۰/۴۸۰ محاسبه شد. در منطقه شهرضا واقع در جنوب اصفهان، دو کد محل مزرعه یونجه و یک گاوداری برای بررسی انتخاب شدند. در خاک مزرعه یونجه، دو گونه‌ی *D. veneta* و *D. rubidus* شناسایی شدند. در محل انباشت کود، سه گونه شامل گونه‌ی *D. veneta*، گونه‌ی *E. fetida* و گونه‌ی *Dendrobaena hortensis* شناسایی شدند و به همین دلیل بود که شاخص غنای مارگالف در این زیستگاه، برابر ۰/۶۲۱ و بیش از میزان اندازه‌گیری شده در مزرعه یونجه (۰/۴۳۴) بدست آمد. در منطقه سمیرم واقع در جنوبی ترین نقطه استان اصفهان، دو کد محل باغ سیب و ساحل دریاچه به منظور نمونه‌برداری انتخاب شدند. در خاک باغ، دو گونه‌ی *D. veneta* و *D. hortensis* شناسایی شدند و یک گونه‌ی متمایز دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفت اما با اطلاعات موجود قابل شناسایی نبود. در زیستگاه ساحل یک دریاچه در این منطقه نیز گونه‌های *E. fetida* و *D. veneta* شناسایی شدند. شاخص مارگالف در زیستگاه اول برابر ۰/۶۷۷ و در زیستگاه دوم برابر ۰/۳۶۹ محاسبه شد. در منطقه خوانسار، فضای سبز شهری و مرتع به عنوان زیستگاه کرمهای خاکی اپی‌جییک انتخاب شدند. در فضای سبز شهری، دو گونه‌ی کرم خاکی *D. veneta* و *D. rubidus* شناسایی شدند. در مرتع مورد بررسی نیز گونه‌ی *D. veneta* شناسایی شد اما گونه‌ای دیگر قابل شناسایی نبود. شاخص مارگالف در زیستگاه اول، ۰/۴۸۰ و در زیستگاه مرتع معادل ۰/۵۵۸ محاسبه شدند . در منطقه‌ی اردستان، فضای سبز شهری و باغ سیب به عنوان دو زیستگاه انتخاب شدند. در خاک فضای سبز شهری، فقط گونه‌ی D. veneta و در خاک باغ نیز فقط گونه D. veneta شناسایی شدند و به همین علت شاخص مارگالف در هر دو زیستگاه برابر صفر محاسبه شدند. در منطقه نایین، در فضای سبز شهری، گونه‌های *E. fetida* و *D. veneta* شناسایی شدند و شاخص مارگالف در این زیستگاه برابر ۰/۴۵۵ محاسبه شد. در خاک باغ، فقط گونه‌ی *D. hortensis* رویت شد و به همین دلیل شاخص مارگالف در این زیستگاه، صفر شد. در منطقه اسفرجان، دو کد محل باغ آلبالو و ساحل یک نهر آب مورد بررسی قرار گرفت. در زیستگاه باغ، سه گونه کرم خاکی شامل *D. veneta*، *E.fetida* و *D. hortensis* شناسایی شدند و شاخص غنای مارگالف نیز در این زیستگاه برابر ۰/۸۶۸ محاسبه شد. در ساحل نهر آب در این منطقه نیز گونه‌ی *D. veneta* و گونه‌ی*Dendrodrilus rubidus* حضور داشتند و شاخص غنای این محل نیز ۰/۴۸۰ بدست آمد. در منطقه‌ی انارک، به علت خشک و کویری بودن منطقه، فقط یک زیستگاه و در دو محل مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در یک محل، یک گونه کرم خاکی دیده شد و آن هم قابل شناسایی نبود و در محل دیگر نیز هیچ گونه‌ای یافت نشد بنابراین شاخص مارگالف در هر دو محل صفر بود. در منطقه چادگان، دو زیستگاه انتخاب شدند. زیستگاه خاک فضای سبز، حاوی دو گونه‌ی کرم اپی‌جییک بود که شامل گونه‌های *E. fetida* و *D. veneta* بودند. در ساحل رودخانه، سه گونه شامل گونه‌ی *E. fetida*، گونه‌ی *D. veneta* و گونه‌ی *D. hortensis* شناسایی شدند. شاخص مارگالف در زیستگاه اول برابر ۰/۴۰۲ و در زیستگاه دوم برابر ۰/۹۱۰ محاسبه شدند. شکل۱، نمودار میانگین شاخص مارگالف برای تعیین تنوع زیستی در مناطق مختلف نمونه‌برداری شده نشان میدهد. نتایج نشان می‌دهند که بیشترین تنوع در کرمهای خاکی مربوط به زیستگاه‌هایی با شاخص مارگالف بالاتر می‌باشد و در مجموع بیشترین تنوع بترتیب در مناطق: چادگان، اسفرجان، اصفهان، شهرضا و سمیرم مشاهده شد. با توجه به فراهمی مواد آلی خاک در این مناطق که عمدتاً ناشی از بارندگی بیشتر و رطوبت بالای خاک و رشد مناسب گیاهان بوده و موجب تجمع مواد آلی در سطح خاک میشود، نتایج حاصله دور از انتظار نمی‌باشد. میزان بالای انحراف معیار (SD)در برخی مناطق حاکی از تاثیر بسیار زیاد نوع زیستگاه‌ها در این مناطق بر تنوع کرمهای گروه اپی جییک می‌باشد. کمترین تنوع گونه کرمهای مورد مطالعه، در اردستان و انارک مشاهده شد. به نظر میرسد میزان بارندگی کم و دمای نسبتاً بالا در این مناطق و کاهش پوشش گیاهی موجب کاهش تنوع گونه‌ها (شاخص مارگالف صفر) در این مناطق شده است.



شکل ۱- نمودار میانگین شاخص مارگالف کرمهای خاکی اپی جییک برای مناطق مختلف نمونه‌برداری

در شکل ۲، چهار گونه از کرم‌های خاکی سطح‌زی (اپی جئیک) شناسایی شده در مناطق مختلف نشان داده شده است. گونه های مختلف، ممکن است در زیستگاه‌های مختلف و در سنین مختلف از زندگی خود، شکل‌های مورفولوژیک مختلفی از خود نشان دهند.



شکل۲-گونه‌های کرم‌های خاکی سطح‌زی شناسایی شده

نتیجه‌گیری

در مجموع، بررسی نتایج بدست آمده نشان میدهند که حضور و فراوانی گونه‌های مختلف کرمهای خاکی گروه اکولوژیک اپی‌جییک در اکوسیستم‌های مختلف به ترتیب زیر است:

Dendrobaena veneta> Eisenia fetida> Dendrodrilus rubidus≥ Dendrobaena hortesi

همچنین نتایج نشان میدهند که بیشترین تنوع در کرمهای خاکی مربوط به زیستگاه‌هایی با شاخص مارگالف بالاتر میباشد و در مجموع بیشترین تنوع بترتیب در اکوسیستم‌های چادگان، اسفرجان، اصفهان، شهرضا و سمیرم مشاهده شد. ذکر این نکته ضروریست که اگرچه سعی شده بود تا نقاط انتخاب شده و زیستگاه‌های مورد بررسی عمدتاً بیانگر شرایط کلی استان باشند؛ با این حال در یک مطالعه جامع، باید مناطق بسیار بیشتری مورد بررسی قرار گیرند تا جامعیت نتایج، حصول شود. اکثر تولید کنندگان ورمی کمپوست و یا فروشندگان کرمهای تولید کننده ورمی‌کمپوست، به دلیل آشنا نبودن به گونه‌های کرم خاکی سطح‌زی، فقط تمایل زیادی به استفاده از کرمهای آیزنیا فتیدا دارند و دیده میشود که برخی حتی مبادرت به واردات این کرمها از خارج از کشور کرده و هزینه زیادی نیز متحمل میشوند. از سویی دیگر با این عمل، تنوع زیستی کرمهای خاکی در داخل کشور کاهش می‌یابد و گونه‌ی وارداتی ممکن است در آینده به یک گونه‌ی مهاجم تبدیل شود؛ بنابراین میتوان اقدام به تکثیر از کرمهای گونه‌ی *D. veneta* که تفاوت زیادی نیز از نظر خصوصیات زیستی با گونه‌ی *E. fetida* ندارد؛ کرد و از این کرمها نیز در تولید ورمی کمپوست استفاده نمود.

منابع

هاشمی مجد، ک.، ۱۳۸۲. شناسایی گونهٔ Eisenia fetida برخی از مناطق شمالی ایران. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ، سال هفتم، شماره چهارم.

Blakemore, R.J. 2002. Cosmopolitan Earthworms – an Eco-Taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World. (First CD Edition). VermEcology, PO BOX 414 Kippax, ACT 2615, Australia. Pp. 426.

Birundha, M., Paul, J.A.; and Mariappan P.; 2013. Growth and reproduction of Perionyx excavatus in different organic wastes. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 2(2):28-35.

Csuzzdi, Cs. and Zicsi, A.; 2003. Earthworms of Hungary (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae). In: Csuzdi, Cs. and Mahunka, S. (Eds). Budapest: Natural History museum.

Dominguez, J. and Edwards, C.A., 2010. Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting. CRC press, 575 pages.

Edwards ,C.A. and Bohlen J. P.; 1996. Biology and Ecology of earthworms 3th ed. Chapman and Hall, London.

Edwards, C. A. and Neuhauser, E. F.; 1988. Earthworms in waste and environmental management. Academic publishing, Nether Lands, 391 P.

Edwards, C. A.; 1995. Historical overview of vermicomposting. Biocycle. 36(6): 56-58.

Ezzatpanah, s. 2010. Earthworms of the Markazi province, Iran Annelida: ligochaeta: Lumbricidae. Calodema, 122: 1-9.

Grant, W. C.; 1955. Temperature relationships in the megascolecid earthworm, pheretima hupeiensis. Ecology, 36 (3), 412-417.

Hale, CM.; Frelich. L.e.; and Reich, Pb.; 2000. Impact of invading Europian earthworms on understory plant communities in previously worm-free hard wood forest of Minnesota. Abstract of the Ecological Society of America 85: 112.

Latif, R., Ezzatpanah, S., Malek, M.; and Parsa, H.; 2009. Earthworms of the Central Elburz Mountains, Iran. Iranian Journal of Animal Biosystematics(IJAB). Vol.5, No.2, 1-15.

Lee, K. E., 1985. Earthworms. Their Ecology and relationships with soils and Land use. Academic press, Sydney , 411 PP.

Margalef, R.; 1958. Information Theory in Ecology, General Systematics, 3: 36-71.

Mirmonsef, H.; Malek, M. and Latif, R. 2011. The Earthworm Fauna of Tehran Province, Iran: an cological CharacterizationIranian. Journal of Animal Biosystematics (IJAB). Vol.7, No.2, 89-97.

Omrani, G.A.; 1973. Bodenozoologische Untersuchungen über Regenwürmer im Zentral- und Nordiran. Inaugural Dissertation. Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung und ropeninstitut der Justus Liebig-Universität Giessen.

Paoletti, M. G.; 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystem and environment. (74), 137-155.

Reinecke, A. J.; Viljoen A. A.; and Saayman. R. J.; 1992. The suitability of Eudrilus Eugeniae, Perionyx excavatus and Eisenia foetida (Oligichaeta) for vemicomposting in southern Africa in the term of their temperature requirements. Soil Biol. Biochem. 24(12): 1295-1307.

Suthar, s.; 2012. Earthworm biodiversity in western in arid and semiarid lands of India. Environmentalist. 31: 74-86.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Use of Margalef index to determine the diversity of epigeic earthworms in different ecosystems

Mojtaba Yahyaabadi*

[1] Member of scientific board, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran

Abstract

Soil-surface dweller species of earthworms have high rates of consumption and digestion of organic matter. Short life cycles and high-reproductive rates, show high potential of them for vermicomposting process. In this study, these species earthworms of Isfahan Province were investigated. Species were collected from 10 locations and 20 habitats. During the study, four epigeic earthworm species based on morphological markers including earthworm length and diameter, number of segments, number of setae in each segment, color and location of clitellum and tubercles were identified, including: *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1826) and *Dendrobaena hortensis* (Michaelsen, 1890). Dendrobaena veneta had the highest abundance and Dendrobaena hortensis had the lowest. Greatest number of Margalef richness index (0.910) was measured in Chadegan due to optimum conditions for ecological habitats and the lowest was recorded at a rate of zero in the region of Anarak.

Keywords: : Earthworms, Margalef, Esfahan, Epigeic

* Corresponding author, Email: yahyabadi@gmail.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تأثیر کاربرد بیوچار باگاس نیشکر و کود زیستی بر زیست توده میکروبی خاک پس از برداشت گیاه جو

سید الیاس حسینی[۱]، مهدی زارعی*[۲]

[۱] دانشجوی دکتری بخش علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۲] دانشیار، بخش علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

چکیده

کاربرد بیوچار سبب بهبود برخی خصوصیات فیزیکوشیمیای و زیستی در خاک می شود که در نتیجه ی آن افزایش جذب عناصر غذایی و رشد بهتر محصولات کشاورزی می باشد. به علاوه کاربرد کودهای زیستی باعث بهبود سلامت میکروبی خاک و کاهش نیاز به استفاده بیش از حد از کوهای شیمیایی می گردد. در این راستا پژوهشی به منظور بررسی کاربرد بیوچار باگاس نیشکر و کود زیستی بر روی زیست توده میکروبی خاک در شرایط گلخانه‌ای و به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای مورد آزمایش شامل: بیوچار در سه سطح (۰، ۱ و ۲ درصد) و کود زیستی در شش سطح (شاهد، قارچ ریزوفاگوس اینترادیسز(Ri)، قارچ فونیلفورمیس موسه (Fm)، باکتری میکروکوکوس یوناننسیس (My)، Ri+My و Fm+My) می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که بین تیمارهای کود زیستی کمترین زیست توده میکروبی مربوط به تیمار شاهد و بیشترین میزان آن مربوط به تیمارهای Ri+My و Fm+My است علاوه بر این کاربرد بیوچار به ویژه در سطح ۲ درصد باعث افزایش معنی دار زیست توده میکروبی خاک گردید.

واژه های کلیدی: کود زیستی، بیوچار، زیست توده میکروبی

مقدمه:

ریزجانداران خاک خاک، عمدتاً باکتری ها و قارچ ها نقش مهمی در ساخت مواد مغذی موجود در گیاهان دارند (Ros. و همکاران ۲۰۰۶). بنابراین تغییرات در یک جامعه میکروبی می تواند عامل مهمی برای نشان دادن تغییر در کیفیت خاک استفاده شود. (Breure and Nielsen, 2004 و Winding 2002) . تنفس میکروبی خاک (SMR)، کربن بیوماس میکروبی (MBC) و فاکتور متابولیکی (qCO2) جز پارامترهای خاک هستند که عمدتاً بر اساس فعالیت های میکروبی برای ارزیابی کیفیت خاک پیشنهاد شده است (Ros. و همکاران ۲۰۰۶). جمعیت میکروبی خاک مهم‌ترین بخش زنده خاک هستند که نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی، حاصلخیزی دراز مدت و جریان انرژی در خاک دارند (Ghollarata and Raiesi, 2007). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به دلیل اینکه می‌توانند ۴ تا ۲۰ درصد کربن تثبیت شده توسط گیاهان را مصرف کنند، به عنوان مهمترین تنظیم کننده-های جریان کربن از گیاهان به خاک، به شمار می‌آیند (Zhu and Miller, 2003). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های مفید هستند که در ریزوسفر تعدادی از گیاهان حضور داشته و توانایی استقرار و ساکن شدن یک رابطه مداوم با گیاهان برای افزایش زیست توده میکروبی، رشد ریشه و گیاه و را دارند (Y., Kaleem and Li, 2010). ویژگی های ساختاری و فیزیکوشیمیایی بیوچار: مانند سطح ، ساختارهای منفذ، گروه های عاملی سطحی و ترکیب عناصر، می توانند تحت تأثیر تغییر شرایط پیرولیزیز (تجزیه حرارتی بقایای گیاهی) مانند دمای پیرولیزیز، سرعت گرمایش و مدت زمان نگهداری می باشد. بیوچار، همانند دیگر اصلاح کننده‌های آلی خاک، فرآیندهای فیزیکی و شرایط شیمیایی خاک را تغییر می‌دهد (Herath و همکاران، ۲۰۱۳) و در نتیجه بر خصوصیات و فعالیت جانداران خاک مؤثر است (Lehmann و همکارن، ۲۰۱۱؛ Masto و همکاران،۲۰۱۳).

* نویسنده مسئول: mehdizarei@shirazu.ac.ir

Warnock و همکاران (۲۰۱۰)، نشان دادند: وجود خلل و فرج و توزیع اندازهٔ آنها در بیوچار موجب حفاظت میکروب‌ها در مقابل شکار شدن و تنش های محیطی می شود. همچنین بیوچار باعث تامین نیاز کربنی، انرژی و عناصر غذایی برای ریزجانداران خاک می گردد. در این پژوهش تأثیر بیوچار و کود زیستی بر روی کربن زیست توده میکروبی که یکی از شاخص های زیستی خاک است مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش

پس از تهیه ی خاک از منطقه باجگاه- استان فارس (جدول ۱) جهت کشت رقم گوهر جو پژوهشی در شرایط گلخانه ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در دو عامل انجام شد. عامل‌ها شامل: کود زیستی در شش سطح (شاهد، قارچ ریزوفاگوس اینترادیسز(Ri)، قارچ فونیلفورمیس موسه (Fm)، باکتری میکروکوکوس یوناننسیس (My)، Ri+My و Fm+My) و بیوچار در سه سطح (۰، ۱ و ۲ درصد) بر زیست توده میکروبی خاک پس از برداشت گیاه جو مورد آزمایش قرار گرفت. در ابتدا پس از الک کردن خاک به مقدار ۴ کیلوگرم برای هر گلدان توزین کرده و پس از آزمون خاک عناصر مورد نیاز را به خاک اضافه گردید، سپس جهت تهیه بیوچار، بقایای نیشکر (باگاس) را هوا خشک و جهت یکسان سازی اندازه ی ذرات با آسیاب خورد کرده و در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد درون کوره‌ای قرار داده و به مقادیر مشخص به گلدان‌های حاوی تیمارهای بیوچار اضافه کرده. به گلدان‌های حاوی تیمار قارچ نیز، به میزان ۵۰گرم از هر دو گونه قارچ که بصورت کشت تله‌ای در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه گردید و در عمق مناسب (رشد ریشه) در خاک گلدان مخلوط و مایه‌زنی شد، سپس برای تیمار گلدان‌های حاوی باکتری میکروکوکوس یوناننسیس (10^7 CFU) که در آزمایشگاه میکروبیولوژی بخش علوم خاک دانشگاه شیراز در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی شیکر انکوباتوردار ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده، سپس باکتری تهیه شده بر روی هر بذر ۲ میلی لیتر اضافه گردید. گیاه جو پس از ۲۶ هفته طول رشد برداشت شد. خاک تازه گلدان‌ها بلافاصله پس از الک کردن (۲ میلی متر) جهت آنالیز به آزمایشگاه منتقل شد و کربن زیست توده‌ی میکروبی به روش انکوباسیون - تدخین (Jenkinson and Powlson, 1976) اندازه گیری گردید.

جدول ۱- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

شن	سیلت	رس	بافت خاک	pH	EC	ماده آلی	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	Fe	Zn	Cu	Mn
	%				dS/m	%	%	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)			
۱۵	۴۹	۳۶	لومی رسی سیلتی	۷/۷	۰/۷	۱/۰۸	۰/۱۲	۱۴	۴۹۰	۳/۵	۳/۴	۲/۲	۹/۹

نتایج و بحث

تیمارهای کود زیستی نشان داد که، کمترین میزان زیست توده میکروبی مربوط به تیمار شاهد (۲۳/۹) می‌باشد و بیشترین آن مربوط به تیمارهای My+Ri و My+Fm که به ترتیب باعث افزایش ۴۸ و ۳۵ درصد نسبت به تیمار شاهد گردید. کاربرد بیوچار در سطوح یکسان کود زیستی باعث افزایش تنفس میکروبی به خصوص در سطح ۲ درصد بیوچار (۱۲ درصد) نسبت به سطح بدون بیوچار شد. برهمکنش بیوچار و کود زیستی نشان داد که کمترین میزان زیست توده میکروبی مربوط به تیمار شاهد (بدون بیوچار و کود زیستی) و بیشترین آن مربوط به تیمار My+Ri در سطح ۱ درصد بیوچار وزنی (۳۹/۷) که سبب افزایش ۲/۰۴ برابر زیست توده‌ی میکروبی در مقایسه با تیمار شاهد گردید. علاوه بر این مشاهد می‌شود که با افزودن بیوچار سبب افزایش زیست توده میکروبی می‌شود ولی این افزایش در سطح ۲ درصد بیوچار بیشتر بوده است. به طوریکه سطح ۲ درصد بیوچار در تمام سطوح کود زیستی در مقایسه با تیمار شاهد باعث افزایش زیست توده میکروبی شده که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده. کربن زیتوده میکروبی

یک واحد مستقیم برای بیان تعداد ریزجانداران به ویژه باکتری‌ها بوده و نمایانگر کربن تثبیت شده در سلول‌های میکروبی می‌باشد (Vance و همکاران، ۱۹۸۷).

جعفری و همکاران (۱۳۹۱) بیان کردن اضافه کردن باکتری به خاک منجر به افزایش میزان کربن زیتوده میکروبی در خاک شد. کربن زیتوده میکروبی به شدت تحت تأثیر جمعیت میکروبی قرار دارد، چون آنها نه تنها قادر به ذخیره مواد غذایی هستند بلکه در چرخه تغییر و تبدیل عناصر غذایی و مواد آلی در خاک دخیل بوده (Hofman و همکاران، ۲۰۰۳) و نقش مهمی در تجزیه ترکیبات پیچیده و آزاد کردن ترکیبات ساده مثل دی اکسید کربن دارند (Rasul و همکاران، ۲۰۰۶). برخی گزارشات افزایش (Steinbeiss و همکاران، ۲۰۰۹) و برخی محققین کاهش فعالیت و زیست توده میکروبی (Jin و همکاران، ۲۰۰۸) در اثر افزودن بیوچار به خاک را گزارش نمودند که به طور کلی Kookana و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند مطالعات بیشتری لازم است تا به یک نتیجه گیری کلی در خصوص تأثیر بیوچار بر ویژگی‌های بیولوژیکی خاک دست یافت اما با توجه به خصوصیات بیوچار که ناشی از منبع ماده آلی و شرایط آتشکافت است و نیز با توجه به ویژگی‌های خاک این نتایج ممکن است متفاوت باشند. اضافه کردن باکتری‌های محرک رشد به ویژه مقاوم به شرایط محیطی با افزایش میزان تجزیه مواد آلی و افزایش میزان کربن به شکل دی اکسید کربن باعث افزایش تنفس و نیز افزایش میزان کربن تثبیت شده در سلول‌های میکروبی به دلیل افزایش تعداد و اندازه جمعیت میکروبی در خاک می‌گردد.

افزودن بیوچار درخاک‌ها آلفی سول، اسپودسول، انتی سول و مالی سول موجب افزایش زیست توده میکروبی و تنفس در همه‌ی رده‌ها شده است. علاوه بر این با افزایش میزان بیوچار در هر یک از خاک‌ها باعث افزایش بیشتر زیست توده میکروبی شد. محدودیت مواد غذایی را علت اصلی اثر کاهش بیوماس میکروبی دانست که با افزودن بیوچار باعث کاهش محدودیت عناصر غذایی و افزایش تنفس میکروبی و زیست توده خاک شد (Steinbeiss و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول ۲- اثر بیوچار و کود زیستی بر زیست توده میکروبی (میلی‌گرم کربن بر کیلوگرم خاک)

بیوچار (درصد وزنی)	کود زیستی						میانگین
	شاهد	Ri	Fm	My	My+Ri	My+ Fm	
0%	۱۹/۴^{e}	۳۲/۰۴^{bc}	۲۶/۹$^{c-e}$	۲۶/۸$^{c-e}$	۲۹/۵$^{b-d}$	۳۰/۶$^{b-d}$	**۲۷/۵^{B}**
1%	۲۲/۵^{de}	۲۲/۸^{de}	۲۶/۸$^{c-e}$	۲۷/۹^{cd}	۳۹/۷^{a}	۳۴/۷$^{a-c}$	**۲۹/۱^{AB}**
2%	۳۰$^{b-d}$	۲۹/۰۳^{cd}	۲۸/۶^{cd}	۲۸/۸^{cd}	۳۷/۴^{ab}	۳۲/۳$^{a-c}$	**۳۱^{A}**
میانگین	**۲۳/۹^{B}**	**۲۷/۹^{B}**	**۲۷/۴^{B}**	**۲۷/۸^{B}**	**۳۵/۶^{A}**	**۳۲/۵^{A}**	

*اعدادی که در هر ردیف یا ستون دارای یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ هستند از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن معنی دار نمی باشند.

نتیجه‌گیری

پژوهش در حال حاضر نشان داد که کاربرد کود زیستی و بیوچار باعث افزایش زیست توده میکروبی خاک شده و در میان کود زیستی تلقیح همزمان باکتری و قارچ سبب افزایش زیست توده‌ای میکروبی ۴۸/۹ و۳۵/۹ درصد به ترتیب در میانگین تیمارهای My+Ri و My+ Fm نسبت به با تیمار شاهد شده است. افزایش زیست توده میکروبی شاید بدلیل حضور نقش مهم باکتری و قارچ در فراهمی عناصر غذایی برای میکروب های خاک و گیاه باشد علاوه بر این ممکن است تلقیح همزمان قارچ میکوریز و باکتری محرک رشد باعث ایجاد یک رابطه‌ی هم‌افزایی (سینرژی) در ایجاد شرایط محیطی مناسب مخصوصاً در منطقه‌ی ریزوسفری از لحاظ خصوصیات فیزیکیوشیمیایی از قبیل: فراهمی عناصر غذایی، ایجاد pH مناسب و غیره برای ریزجاندان خاک گردد و این شاید دلیل مناسبی بر افزایش زیست توده‌ای میکروبی خاک در صورت تلفیق همزمان قارچ و باکتری باشد. همچنین کاربرد بیوچار که به عنوان یک ماده آلی ممکن است نقش بسزایی در فراهمی عناصر غذایی و محل پناهگاه مناسبی برای سایر ریزجاندان خاک باشد که احتمال دارد سبب افزایش ترشحات ریشه‌ای گیاه و بهبود شرایط فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک گردد که در نهایت موجب ایجاد شرایط تغذیه‌ی و فعالیت مناسب برای رشد ریزجانداران خاک شده که به این ترتیب باعث افزایش زیست توده میکروبی خاک شود.

منابع

جعفری، ص.، چرم، م.، عنایتی ضمیر، ن.، و معتمدی، ح. ۱۳۹۱. بررسی تأثیرات باسیلوس سابتیلیس وکورینه باکتریوم گلوتامیکوم بر برخی شاخص‌های میکروبی خاک در سطوح مختلف شوری .مهندسی زراعی (مجله علمی کشاورزی)، سال دوم، شماره ۳۵ ، ص ۲۳۰ تا ۲۵۵.

Breure, A. 2004. Ecological soil monitoring and quality assessment. In Developments in soil science. Elsevier, 29, 281–305.

Ghollarata, M. and Raiesi, F. 2007. The adverse effect of soil salinization on the growth of *Trifolium alexandrinum* L. and associated microbial and biological properties in a soil from Iran. Soil Biology and Biochemistry, 39, 1699-1702.

Herath, H. M. Arbestain, M. C. and Hedley, M. 2013. Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: an Alfisol and an Andisol. Geoderma, 210, 188–197.

Hofman, J., Bezchlebová, J., Dušek, L., Doležal, L., Holoubek, I., Anděl, P. and Malý, S. 2003. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. Environment International, 28, 771-778.

Jenkinson, D. and Powlson, D. S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: a method for measuring soil biomass. Soil Biology and Biochemistry, 8, 209-213.

Jin, H., Lehmann, J. and Thies, J. E. 2008. Soil microbial community response to amending maize soils with maize stover charcoal. In Proceedings of the 2008 conference of international biochar initiative, 9, 8-10.

Kookana, R. S., Sarmah, A. K., Van Zwieten, L., Krull, E. and Singh, B. 2011. biochar application to soil: agronomic and environmental benefits and unintended consequences. Advances in agronomy, 112, 103-143.

Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies J., Masiello C. A., Hockaday W. C. and Crowley, D. 2011. Biochar effects on soil biota- a review. Soil Biology and Biochemistry 43, 1812–1836.

Masto, R. E., Ansari, M. A., George, J., Selvi, V. A. and Ram, L. C. 2013. Co-application of biochar and lignite fly ash on soil nutrients and biological parameters at different crop growth stages of *Zea mays*. Ecological Engineering 58, 314–322.

Nielsen, M. N., and Winding, A. and Binnerup, S. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. NERI 2002-388.

Rasul, G., Appuhn, A., Müller, T. and Joergensen, R. G. 2006. Salinity-induced changes in the microbial use of sugarcane filter cake added to soil. Applied Soil Ecology, 31, 1-10.

Ros, M., Klammer, S., Knapp, B., Aichberger, K. and Insam, H. 2006. Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. Soil Use and Management 22, 209–18.

Steinbeiss, S., Gleixner, G. and Antonietti, M. 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry, 41, 1301–1310.

Vance, E. D., Brookes, P. C. and Jenkinson, D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil biology and Biochemistry, 19, 703–707.

Warnock, D. D., Mummeya, D. L., McBride, B., Major, J., Lehmann, J. and Rillig, M. C. 2010. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: results from growth chamber and field experiments. Applied Soil Ecology 46, 450–456.

Kaleem, Y. I. and Li, C. 2010. Growth promotion and protection against salt stress by Pseudomonas putida Rs-198 on cotton. European Journal of Soil Biology, 46, 49–54.

Zhu, Y. G. and Miller, R. M. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil–plant systems. Trends in plant science, 8,407–409.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The Effect of Biochar application of SugarCane Bagasse and bio-fertilizer on Carbon of Microbial Biomass of Soil after Harvest of Barley

S. E. Hosseini[1], M. Zare[2*]

[1] Ph.D student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Shiraz Iran

[2]Associate Prof, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Shiraz Iran

Shiraz University.

Abstract

Biochar application amends some physico-chemical and biological properties of the soil, thereby makes increasing the absorption of nutrients and better agricultural production. In addition, the utilization of bio-fertilizers improves soil health and reduces the necessity of excessive chemical fertilizers application In this regard, the present research was conducted to evaluate the effect of bio fertilizers and biochar application of sugarcane bagasse on Microbial biomass in a completely randomized design with three replications in a greenhouse scale. The factors were consisted of biochar in three levels (0, 1, and 2% (w/w)), and six levels of bio-fertilizer including control (C_1) *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funeliformis mosseae* (Fm), *Micrococcus yunnanensis* (My), Ri+My, Fm+My. The results showed that Among bio-fertilizer treatments, the lowest microbial biomass was related to control treatment and its highest was related to the treatments of Ri + My and Fm + My. In addition, biochemical application, especially at 2% level, increased the microbial biomass of soil.

Keywords: Bio-fertilizer, Biochar, Microbial biomass

*Corresponding author, Email: mehdizarei@shirazu.ac.ir

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی پتانسیل کاربرد باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیتی محرک رشد گیاه گندم به عنوان یک بسته کود کمپلکس (زیستی-شیمیایی)

سمیه امامی[۱] حسینعلی علیخانی[۲]، احمد علی پوربابایی[۳]، حسن اعتصامی[۴]، فریدون سرمدیان[۲]، بابک متشرع‌زاده[۳]

[۱] دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۲] استاد گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۳] دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۴] استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

چکیده

در این تحقیق، باکتری‌ها از ریزوسفر (۲۵۰ جدایه) و از ریشه‌های (۱۵۰ جدایه) گیاه گندم جداسازی شدند. تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید، ایندول استیک اسید، انحلال فسفات آلی و معدنی و توانایی کلونیزاسیون ریشه‌های گیاه گندم توسط ۴۰۰ جدایه بدست آمده ارزیابی و با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج حاصل از آزمون تولید IAA نشان داد که ۸۸ درصد باکتری‌های ریزوسفری و ۷۲ درصد باکتری‌های اندوفیت دارای توان تولید IAA هستند؛ همچنین ۳۸ و ۲۴ درصد باکتری‌های ریزوسفری گندم و ۳۴/۶۶ و ۲۸ درصد باکتری‌های اندوفیت ریشه قادر به حل کردن به ترتیب فسفر نامحلول آلی و معدنی بودند. نتایج حاصل از اثر تیمارهای آزمایشی شامل کاربرد زادمایه سویه‌های برتر (R185+E240) و کود فسفر (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد نیاز کودی)، در شرایط مزرعه‌ای طی سال‌های زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ و ۱۳۹۷- ۱۳۹۶، نشان داد که افزایش فسفر در بافت‌های گیاه گندم (برگ، ساقه و دانه) در نتیجه مایه‌کوبی بذور گندم با سویه‌های محرک رشد گیاه بعلاوه ۷۵ درصد از کود فسفر از نظر آماری برابر با تیمار ۱۰۰ درصد کود فسفر و بدون زادمایه باکتری بود. نتایج این پژوهش در مجموع اثبات نمود که زادمایه باکتری بومی محرک رشد گیاه می‌تواند به عنوان مکمل با کودهای شیمیایی به منظور کاهش سطح مصرف کودهای شیمیایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ارتباط متقابل گیاه-باکتری، باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیت، فسفر، گندم.

مقدمه

تأمین غذای کافی با قیمت مناسب برای افراد یک جامعه، از مهم‌ترین ارکان اصلی توسعه پایدار هر کشور می‌باشد. در عصر حاضر با توجه به محدودیت منابع و افزایش روزافزون جمعیت و در نتیجه افزایش تقاضا برای محصولات غذایی، شرایط ایجاب می‌کند که از منابع محدود به نحو بهینه استفاده شود. غلات منبع اصلی غذایی برای تغذیه بشر در جهان می‌باشد. در میان غلات نیز گندم مهم‌ترین منبع غذایی برای مصرف انسانی است (Curtis et al., 2002). در ایران نیز گندم به لحاظ راهبردی، مهم‌ترین محصول زراعی کشور محسوب می‌شود؛ همچنین نان حاصل از آن مهم‌ترین منبع غذایی است به طوری که قسمت عمده کالری و پروتئین مورد نیاز مردم از این طریق به دست می‌آید. سطح زیر کشت گندم آبی و دیم کشور در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ به ترتیب ۲۱۲۷۹۹۰ و ۳۸۰۰۷۳۸ هکتار (در مجموع ۵۹۲۸۷۲۸ هکتار از ۱۱۷۶۶۴۸۷ هکتار از اراضی زیر کشت به کشت گندم اختصاص داشت) و متوسط عملکرد آن در شرایط آبی و دیم به ترتیب ۴۱۵۶ و ۱۵۱۳ کیلوگرم در هکتار بوده است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۶). با توجه به آمار ذکر شده میانگین عملکرد گندم در ایران کمتر از متوسط جهانی تولید گندم است. این در حالی است که متخصصین به صورت تئوری پتانسیل عملکرد دانه گندم را ۲۰ تن در هکتار تخمین می‌زنند.

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تولید و عملکرد بالا برای تولید محصول گندم، مصرف کودهای فسفر است. بدون افزودن کود فسفر عملکرد ارقام موجود شدیداً محدود می‌شود. برآورد شده که در دو سوم خاک‌های کشت شده جهان، قابلیت دسترسی فسفر توسط ریشه گیاهان با مشکل مواجه است (Syers et al., 2008). برای بهبود تغذیه فسفر گیاه روش مرسوم، کاربرد مقدار زیاد کود فسفر در خاک است. با این حال راندمان کاربرد کود فسفر ۱۰ تا ۳۰ درصد است و باقیمانده فسفر در خاک تثبیت می‌شود (Hart et al., 2004). افزون بر این، کودهای فسفر دارای عناصر سمی همچون فلوراید، کادمیم، آرسنیک، جیوه و ... است. مطالعات اخیر نشان داده است که ۴۵ درصد مجموع عناصر ورودی به زمین‌های کشاورزی اتحادیه اروپا را کود فسفات تشکیل می‌دهد و ۵۵ درصد کل کادمیم موجود در مواد غذایی مربوط به کادمیم خاک است. این موضوع باعث کاهش کارایی کوددهی و کاهش سودآوری محصول شده که منجر به هدر رفت اقتصادی و مشکلات زیست محیطی می‌شود (Ulrich et al., 2019).

باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه[1] شامل باکتری‌های احاطه‌کننده ریشه‌اند که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. امروزه باکتری‌های محرک رشد گیاه به عنوان زادمایه میکروبی به شکل کودهای زیستی و یا کنترل‌گرهای زیستی استفاده می‌شوند. استفاده از انحلال زیستی فسفات‌های آلی و معدنی نامحلول می‌تواند مصرف کودهای شیمیایی فسفر را کاهش دهد که در کاهش خطرات زیست محیطی مؤثر است (Naher et al., 2016). جامعه میکروبی خاک حاصلخیزی آن را از طریق تجزیه، معدنی کردن، ذخیره‌سازی و رهاسازی عناصر غذایی تحت تأثیر قرار می‌دهند. رابطه بین گیاهان و باکتری‌های حل کننده فسفات به عنوان یک رابطه هم‌افزایی یا تشدید شونده در طبیعت شناخته می‌شود زیرا از یک سو باکتری، فسفات محلول را برای گیاه فراهم می‌کند و از سوی دیگر، گیاه از طریق ترشحات ریشه خود ترکیبات کربنه مورد نیاز را برای رشد باکتری آزاد می‌کند (Gouda et al., 2018). همکاری ریزسازواره‌های موجود در ریزوسفر گیاهان می‌تواند موجب بهبود جذب فسفات‌های در دسترس و همچنین فراهم ساختن منابع فسفات تثبیت شده برای گیاه شود. میزان فراهم‌سازی فسفات توسط باکتری‌های حل کننده فسفات از منابع معدنی و آلی فسفات به ترتیب ۴۲-۲۵ و ۱۸-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بوده است (Rodríguez et al., 2006). از آنجایی که عناصر غذایی ضروری گیاه، توسط ریشه از خاک جذب می‌شوند، رشد خوب ریشه یک پیش‌نیاز برای افزایش رشد و نمو گیاه به حساب می‌آید. تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تولید هورمون‌های گیاهی باعث افزایش رشد ریشه گیاه می‌شوند. اگر تحریک رشد ریشه گیاه توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه با فراوانی بالا در مزارع انجام گیرد، باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند ابزارهای پتانسیل، برای افزایش جذب عناصر غذایی باشند (Glick, 2012). دو سوال اصلی برخاسته از برخی مطالعات گذشته این است آیا روند جاری کاربرد مقادیر زیاد کودهای شیمیایی با کاهش مقدار کودهای شیمیایی همراه با مایه تلقیح های میکروبی ممکن است؟ آیا پتانسیل باکتری های محرک رشد گیاه در جذب عناصر غذایی گیاه می تواند از طریق ترکیب آنها با کاهش مقادیر کودها استفاده شود. فرض کلی این است که باکتری های محرک رشد گیاه یا ترکیبی از باکتری های محرک رشد گیاه با کودهای شیمیایی کارایی استفاده از کودهای شیمیایی را بهبود می دهد و منجر به کاهش در مقادیر استفاده از کودهای شیمیایی می شود. این پژوهش یک ارزیابی کلی از پتانسیل

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیت جداسازی شده از ریشه گیاه گندم به منظور بررسی خصوصیات محرک رشدی و اثر آن‌ها در کاهش مصرف کود فسفر فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه‌ها

در این تحقیق به منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیت محرک رشد گیاه گندم، نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری گندم (مزرعه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر کرج) انجام شد. تعداد ۸ نمونه از گیاهان سالم گندم در مرحله رشد رویشی بطور تصادفی از موقعیت‌های مختلف در مزارع جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال یافتند تا جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از آنها استفاده شود (Emami et al., 2019).

بررسی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت

اندازه‌گیری کمی تولید ایندول استیک اسید (اکسین) به روش بریک در محیط کشت مایع رنگی در نتیجه استفاده از محلول سالکوفسکی با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت (Brick et al. 1991). برای انجام این آزمون درون هر ظرف ارلن مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث حاوی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال تریپتوفان ریخته شد و پس از استریل، محتوی هر ارلن با یکی از جدایه‌های مورد نظر تلقیح گردید. ارلن‌های مذکور با ورقه آلومینیومی پوشانده شدند و به مدت ۷۲ ساعت برای باکتری‌های تند رشد و تا ۱۲۰ ساعت (برای انواع کند رشد) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بر روی بهم زدن دورانی با سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه هوادهی شدند. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور سانتریفیوژ گردیدند. سپس محلول رویی با معرف سالکوسکی به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط گردید محلول حاضر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

به منظور بررسی توان جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر استفاده گردید (Sperber, 1995). ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت براث کشت داده شدند. برای تشخیص نیمه کمی توان حل فسفات، ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با روش قطره گذاری برروی پلیت‌های حاوی محیط جامد اسپربر (شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۳۲ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۱۴گرم در لیتر کلسیم کلرید، ۲/۵ گرم در لیتر تری کلسیم فسفات، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و pH= ۷/۲)کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگه داری شدند. ظهور هاله شفاف در پیرامون کلونی باکتری به عنوان نشانه حل فسفات در نظر گرفته شد. قطر کلونی رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود به دقت اندازه گیری شدند. برای ارزیابی انحلال فسفات نسبت متوسط قطر هاله به قطر کلونی بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید. معدنی شدن فسفر آلی نیز در محیط اسپربر با استفاده از اینوزیتول هگزافسفات به عنوان منبع فسفر آلی بررسی شد.

توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها بصورت نیمه کمی با کشت در محیط CAS-Agar با استفاده از روش پیشنهادی Schwyn and Neiland (۱۹۸۷) و براساس استفاده از محیط کشت پایه‌ای به نام کروم آزرول- اس (CAS) صورت گرفت. در نهایت برای شناسایی مولکولی سویه‌های برتر ابتدا DNA آنها استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای ابتدا و انتهای 16S rRNA واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. محصول PCR تعیین ترادف شده و ترادف تعیین شده با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنومی مقایسه گردید.

در ادامه آزمایشات آزمایشگاهی، آزمایش مزرعه‌ای در طی دو سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ و ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه آموزشی و پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج (۴۰ کیلومتری غرب تهران، ۵۰ درجه، ۵۴ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۵۵ دقیقه عرض شمالی و ارتفاع ۱۳۱۲ متری از سطح دریا) به اجرا گذاشته شد. طرح به صورت فاکتوریل با دو فاکتور (باکتری و سطوح کودی) و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) و در سه تکرار و به مدت دو سال به اجراء درآمد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار میکروبی و کود فسفری بود که تیمار کود میکروبی در دو سطح و شامل تیمار باکتریایی (تلفیقی از جدایه ریزوسفری و اندوفیت) و تیمار شاهد بود. بر اساس مطالعات آزمایشگاهی از میان تیمارهای باکتریایی تیمار زادمایه ترکیبی باکتری ریزوسفری و اندوفیت جهت آزمون مزرعه‌ای برگزیده شد. کود شیمیایی به عنوان فاکتور دوم از منبع سوپر

فسفات تریپل در پنج سطح شامل: ۱- عدم مصرف کود شیمیایی فسفر، ۲- ۲۵٪ توصیه کودی فسفر، ۳- ۵۰٪ توصیه کودی فسفر، ۴- ۷۵٪ توصیه کودی فسفر، و ۵- ۱۰۰٪ توصیه کودی فسفر در نظر گرفته شدند. هر کرت آزمایشی شامل چهار ردیف با فواصل ۲۰ سانتی‌متری و طول ۴ متر و فاصله هر تکرار دو متر در نظر گرفته شد (شکل ۱).

قبل از کاشت، بذور گندم در کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی بذر و یک درصد کربوکسی متیل سلولز (به عنوان ماده چسبنده) به مدت ۶۰ ثانیه تکان داده شده و سپس مقدار کافی از زادمایه (مخلوط دو باکتری به میزان جمعیت $10^8 \times 5$ در لیتر)، به آن افزوده شد و به مدت ۶۰ ثانیه دیگر تکان داده شدند تا بذرها به طور یکنواخت به زادمایه آغشته شوند. سپس بذرها در سایه خشک شدند (برای اطمینان از آغشته شدن بذر به زادمایه این کار دو بار تکرار شد). برای تیمار شاهد نیز مراحل آماده‌سازی همانند تیمار باکتریایی صورت گرفت؛ با این تفاوت که در مرحله افزودن باکتری از زادمایه اتوکلاو شده استفاده شد. جهت آماده‌سازی زادمایه، جدایه‌های باکتری از استوک برداشته و بر روی محیط کشت نوترینت آگار رشد داده و جوان شدند. کلونی‌های مجزا هر سویه در محیط نوترینت براث مایه‌کوبی و بر روی بهم‌زن دورانی با سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه هوادهی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگزاری شدند. جمعیت سلولی به $10^8 \times 5$ CFU/ml تنظیم شد. به منظور آماده‌سازی زادمایه مخلوط، جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت به صورت مجزا به طوری که در بالا شرح داده شد آماده شدند و دو جدایه به طور مساوی از نظر حجمی به منظور ایجاد یک سوسپانسیون شامل سلول‌های از هر کدام از جدایه‌ها با یکدیگر مخلوط شدند. بذور مایه‌زنی شده در دو طرف پشته به صورت دستی با استفاده از فوکا در عمق ۴- ۵ سانتی‌متری کاشته شدند؛ همراه با کاشت تیمارهای کود فسفری نیز به صورت نواری اعمال شد. بلافاصله بعد از کاشت عمل آبیاری انجام گردید. بر اساس توصیه متداول کودی برای مزرعه آزمایشی کود اوره ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در مراحل پنجه‌زنی و ساقه رفتن به صورت سرک به زمین داده شد. در طول فصل رشد علف‌های هرز به صورت دستی کنترل شدند. آبیاری مزرعه به صورت نشتی (تیپ‌بندی) در مواقع لازم انجام شد. تاریخ برداشت ۲۰ تیر ماه هر سال بود. پس از برداشت محصول، اندام هوایی به سه بخش برگ، ساقه و دانه تقسیم شد و با آب مقطر کاملا شسته شده و سپس درون پاکت‌های کاغذی تمیز قرار گرفته و در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس اندام هوایی خشک شده به صورت مجزا توسط آسیاب پودر شده و در ظروف پلاستیکی دربدار به منظور تهیه عصاره گیاهی و انجام آزمایش‌های تجزیه‌ای، نگهداری شدند. میزان فسفر در نمونه‌های گیاهی به روش زرد (مولیبدووانادات) اندازه‌گیری شد (Westerman, 1991).



شکل ۱- تصویری از بررسی تاثیر زادمایه باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیت بر گیاه گندم در کشت مزرعه‌ای

نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های مربوط به آزمون مزرعه‌ای با استفاده از نرم افزار آماری SAS آنالیز شد. جهت جمع‌بندی نتایج مربوط به مقایسه تیمارها در دو سال نیاز به تجزیه واریانس مرکب بود تا از این طریق بتوان علاوه بر مقایسه تیمارها، از اثر متقابل تیمار× سال آگاهی یافت. لذا پس از آزمون بارتلت و مشخص شدن یکنواختی واریانس‌های آزمایشی اقدام به تجزیه واریانس مرکب شد. مقایسه میانگین تیمارها و گروه‌بندی آن‌ها به روش آزمون Tukey در سطح ۵ درصد انجام گرفت. همچنین نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel و R ترسیم شد.

نتایج و بحث

پتانسیل کل ۴۰۰ جدایه به دست آمده از گیاه گندم به منظور تحریک رشد گیاه از طریق غربال‌گری آن‌ها برای ویژگی‌های فنوتیپی و محرک رشد گیاه ارزیابی شد. شکل (۲) درصد فراوانی ویژگی‌های محرک رشد جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت را نشان می‌دهد. ۲۲۰ جدایه از ۲۵۰ جدایه ریزوسفری IAA تولید کردند در حالی که ۱۰۸ جدایه از ۱۵۰ جدایه اندوفیت ریشه تولید IAA نشان دادند. حدود ۵۹/۲ درصد جدایه‌های ریزوسفری سیدروفور تولید کردند و ۱۸ درصد این جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن بودند در حالی که فقط ۵۲ درصد جدایه‌های اندوفیت سیدروفور تولید کردند و ۱۰ درصد از این جدایه‌ها توان تولید سیانید هیدروژن را داشتند. این نتایج به خوبی نشان داد که یک بخش مهمی از همه جدایه‌ها، توانایی تولید IAA را دارند. فراوانی و توانایی بیشتر جدایه‌های ریزوسفری در تولید IAA را می‌توان به ترشحات ریشه‌ای نسبت داد. باکتری‌ها برای تولید IAA نیاز به ال- ترپتوفان دارند و این ماده در ترشحات ریشه‌ای ناحیه اطراف ریشه نسبت به توده خاک و بافت داخلی گیاه به مقدار بیشتری وجود دارد. IAA یک هورمون گیاهی است که هیچ نقش واضحی در سلول‌های باکتریای ندارد و می‌تواند فرض شود که تولید IAA می‌تواند قابلیت این جدایه‌ها را در ارتباط گیاه و باکتری بهبود بخشد (Defez et al., 2017). مطالعات دیگر هم نقش این هورمون را در اندوفیت شدن باکتری گزارش کرده‌اند (Verma et al., 2001). توانایی تولید IAA در شمار متعددی از باکتری‌های آزادزی، همزیست و پاتوژن نیز گزارش شده است. این هورمون باعث توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه و به دنبال آن، افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه می‌شود (Emami et al., 2019).

در ادامه همه جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت به منظور توانایی احتمالی آن‌ها در انحلال فسفات نامحلول معدنی و آلی ارزیابی شدند. از محیط جامد اسپربر حاوی تری کلسیم فسفات و اینوزیتول هگزا فسفات به ترتیب به عنوان منبع نامحلول فسفر معدنی و آلی برای رشد جدایه‌ها استفاده شد. ایجاد هاله شفاف اطراف کلونی باکتری درون این محیط به عنوان شاخصی از توانایی این جدایه در حلالیت فسفات نامحلول در نظر گرفته شد. نتایج این ارزیابی نشان داد که ۳۸ و ۲۴ درصد جدایه‌های ریزوسفری گندم و ۳۴/۶۶ و ۲۸ درصد جدایه‌های اندوفیت ریشه قادر به حل کردن فسفر نامحلول آلی و معدنی در محیط اسپربر بودند (شکل ۲).

تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که باکتری‌های اندوفیت همانند باکتری‌های ریزوسفری توانایی انحلال فسفات نامحلول معدنی را دارند (Verma et al., 2001). مواد ترشح شده به وسیله باکتری‌های حل کننده فسفات مانند اگزالات، لاکتات، سیترات، سوکسینات، آنیون‌های کربوکسیلیک و پروتون‌ها که منجر به کاهش pH محیط می‌شوند در افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول معدنی (ترکیبات فسفات کلسیم) نقش دارند. از طرف دیگر ریزسازواره‌های موجود در خاک و ریشه گیاهان، با تولید آنزیم‌های فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) فسفر آلی را معدنی می‌کنند. کارایی متفاوت فسفاتازهای میکروبی نیز در انحلال ترکیبات آلی فسفر در ریزوسفر و جذب فسفر به وسیله گیاهان گزارش شده است (Satyaprakash et al., 2017). از بین باکتری‌های حل کننده فسفر آلی، معمول‌ترین آن‌ها گونه‌هایی از جنس‌های *Bacillus*، *Burkholderia*، *Enterobacter*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Serratia* و *Staphylococcus* هستند. رابطه بین گیاهان و باکتری‌های حل‌کننده فسفات به عنوان یک رابطه هم‌افزایی یا تشدید شونده در طبیعت شناخته می‌شود . زیرا از یک سو باکتری، فسفات محلول را برای گیاه فراهم می‌کند و از سوی دیگر، گیاه از طریق ترشحات ریشه خود ترکیبات کربنه مورد نیاز (عمدتاً قندها) را برای رشد باکتری آزاد می‌کند.

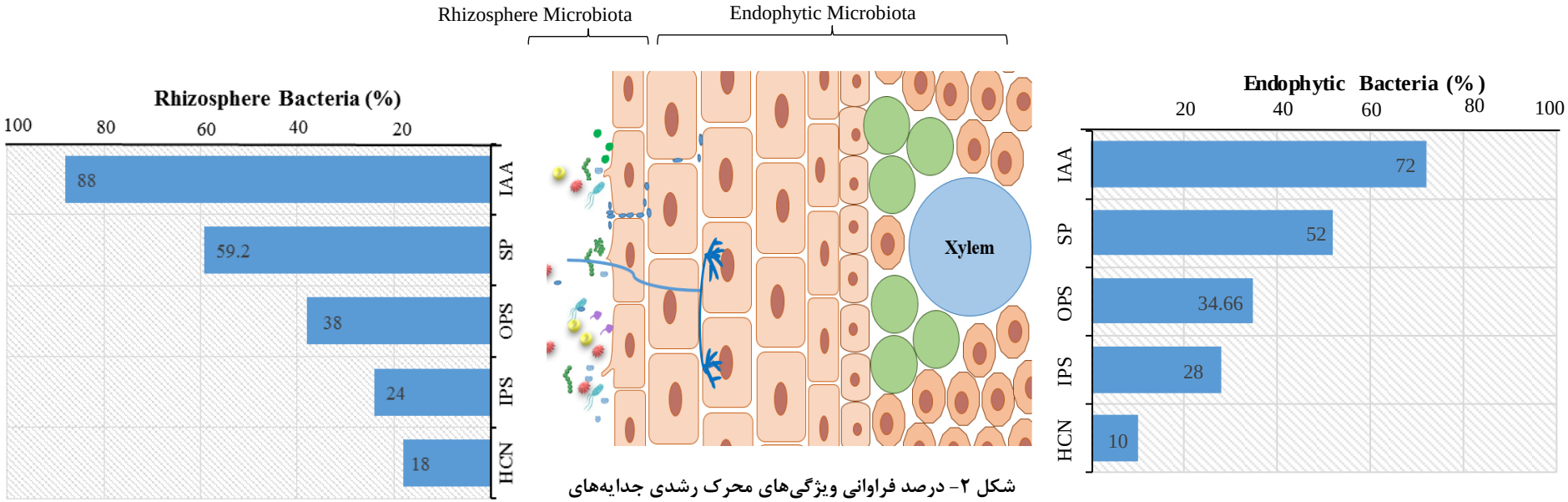
در این تحقیق فراوانی کمتری از جدایه‌های حل کننده فسفات نسبت به فراوانی جدایه‌های تولید کننده IAA مشاهده شد. فراوانی پایین جدایه‌های حل کننده فسفر می‌تواند به علت مصرف کودهای شیمیایی فسفر در مزارع ایران باشد. کو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که استفاده از کودهای شیمیایی (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) به طور قابل توجهی تنوع جامعه باکتریایی را (۷/۳۲ درصد) کاهش می‌دهد، در حالی که استفاده از کود دامی به تنهایی یا همراه با کود شیمیایی، موجب افزایش تنوع زیستی جامعه باکتریایی (به ترتیب ۱/۴۵ و ۱/۸۷ درصد) نسبت به شاهد می‌شود (Cui et al., 2018).

علاوه بر این، درصد فراوانی جدایه‌های حل کننده فسفات آلی ریزوسفر (۳۸ درصد) و اندوفیت ریشه (۳۴/۶۶ درصد) مشابه نبود. فراوانی تعداد جدایه‌های ریزوسفری حل کننده فسفات معدنی بیشتر از فراوانی تعداد جدایه‌های اندوفیت حل کننده فسفات معدنی بود. اما درصد جدایه‌های ریزوسفری حل کننده فسفات معدنی (۲۴ درصد) کمتر از درصد جدایه‌های اندوفیت حل کننده فسفات معدنی (۲۸ درصد) بود (شکل ۲).

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که جدایه‌های حل کننده فسفات، دارای سایر صفات محرک رشدی نیز می‌باشند، بر اساس یافته‌های علمی، باکتری‌های محرک رشد گیاه احتمالا با بیش از یک مکانیسم عمل می‌کنند (Sharma et al., 2013)؛ و عقیده بر این است که ریزسازواره‌های حل کننده فسفات،

به طور هم زمان دارای پتانسیل کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و همچنین افزایش رشد گیاه از طریق تولید سیدروفور و IAA هستند (Sharma et al., 2013). آنتون و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که از ۲۶۶ سویه ریزوبیا جدا شده ۸۳ درصد توانایی تولید سیدروفور، ۵۸ درصد توانایی تولید IAA و ۵۴ درصد توانایی حل فسفات نامحلول، ۶۴ درصد بدون خصوصیت مشخص و ۱۱ درصد هم اثرات مخربی بر روی گیاه داشتند. این مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌های محرک رشد اغلب مکانیسم‌های عمل چندگانه‌ای دارند (Antoun et al., 1998). رقابتی که در محیط CAS برای پیوند با آهن بین کمپلکس فریک معرف رنگی به نام کروم آزورل دترجنت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید و یک کلات کننده یا سیدروفور میکروبی به وجود می‌آید اساس ارزیابی تولید سیدروفور در این محیط می‌باشد. فراوانی باکتری‌های تولید کننده سیدروفور در جدایه‌های ریزوسفری بیشتر از باکتری‌های اندوفیت بود. این نتایج نشان می‌دهد که توانایی کلات کردن آهن سه ظرفیتی باکتری‌های خاک برای کلونیزه کردن یا ماندن در ارتباط با بافت‌های گیاه می‌تواند مفید باشد. نقش جدایه‌های تولید کننده سیدروفور می‌تواند از طریق کلات کردن آهن سه ظرفیتی باشد که فراهمی آهن را به طور موضعی افزایش یا سمیت آهن دو ظرفیتی به سوی گیاه از طریق تجمع آهن ترسیب شده به درون سلول‌های باکتریایی را کاهش می‌دهد. در نتایج بررسی ۱۰ سویه *Pseudomonas* مولد سیدروفور جدا شده از خاک‌های تحت کشت ذرت، برنج، یونجه مشاهده شد که این جدایه‌ها را می‌توان به عنوان کودهای زیستی بالقوه و نیز به عنوان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده قرار داد (Suresh et al., 2010). نتایج مطالعه طهماسبی و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان داد که کاربرد سویه‌های تولید کننده سیدروفور در مقایسه با شاهد باعث افزایش معنی‌دار میزان جذب آهن، میزان کلروفیل و همچنین وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه ذرت شده است (Tahmasbi et al., 2014). سیانید هیدروژن یکی دیگر از متابولیت‌های ثانویه است که برخی باکتری‌های محرک رشد از جمله *Pseudomonas* آن را تولید می‌کنند که از یک سو ماده‌ای سمی برای قارچ‌های بیمارگر گیاهی است و از سوی دیگر باکتری‌های تولید کننده سیانید هیدروژن متابولیسم گیاه را تحت تاثیر قرار داده و موجب تشکیل ریشه‌های مویین می‌شوند.

برای تعیین تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف آزمایشگاهی انجام شده، دو جدایه ریزوسفری و اندوفیت با قابلیت حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول و توان تولید IAA انتخاب شدند و به عنوان تیمارهای باکتریایی محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گرفتند. خصوصیات دو جدایه مورد استفاده در کشت مزرعه ای در جدول (۱) آورده شده است. جدایه‌های ریزوسفری R185 و اندوفیت E240 به ترتیب با تولید ۲۹۹ و ۳۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر و همچنین تولید ۱۹/۲ و ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون IAA به عنوان جدایه‌هایی با توان انحلال فسفات‌های نامحلول و مولد IAA بودند؛ این جدایه‌ها به ترتیب با ۹۸ و ۹۸/۷ درصد تشابه با *Pseudomonas* sp. JHEE_s و *Pseudomonas mosselii* مرتبط است.



شکل ۲- درصد فراوانی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های ریزوسفری و اندوفیت ریشه گندم

SP: تولید سیدروفور؛ **OPS**: حلالیت فسفات آلی؛ **IPS**: حلالیت فسفات معدنی؛ **HCN**: تولید سیانید هیدروژن

جدول (۱)- خصوصیات جدایه ریزوسفری و اندوفیت انتخاب شده برای کشت مزرعه‌ای

شماره جدایه	IAA ($\mu g\ mL^{-1}$)	حلالیت فسفات نامحلول معدنی (قطر هاله به قطر کلونی)	حلالیت فسفات نامحلول آلی (قطر هاله به قطر کلونی)	تولید سیدروفور (قطر هاله به کلونی)	میزان انحلال فسفات نامحلول معدنی ($\mu g\ mL^{-1}$)	pH در محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات
R 185	۱۹/۲ ± ۰/۱^{b}	۴/۰ ± ۰/۲^{b}	۳/۸ ± ۰/۱^{a}	۱/۸ ± ۰/۱^{ab}	۲۹۹ ± ۲^{b}	۴/۵ ± ۰/۱^{fg}
E 240	۲۲/۰ ± ۰/۳^{a}	۵/۰ ± ۰/۲^{a}	۳/۷ ± ۰/۱^{a}	۱/۸ ± ۰/۱^{a}	۳۳۰ ± ۳^{a}	۴/۲ ± ۰/۱^{g}

جدول ۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمار زادمایه باکتریایی محرک رشد گیاه و سطوح کودی فسفر را نشان می‌دهد. بر این اساس، کاربرد توام جدایه‌های باکتریایی و سطوح کودی فسفر (۲۵، ۵۰ ، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) نسبت به شاهد سبب افزایش معنی‌داری در مقدار فسفر برگ شده است که نشان می‌دهد فسفر نقش کلیدی و مهم در رشد گیاه گندم دارد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تیمارهای B1+F3، B1+F4 و B0+F4 دارای بیشترین مقدار فسفر برگ بوده‌اند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نمی‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که جدایه‌های محرک رشد توانسته است میزان مصرف کود فسفر را تا ۲۵ درصد کاهش دهند. تیمار B0 +F0 دارای حداقل مقدار فسفر برگ (۰/۰۰۶ درصد) می‌باشد و مقدار فسفر گیاه در این تیمار به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر می‌باشد.

کاربرد زادمایه موجب افزایش ۱۹ درصدی در میزان فسفر در ساقه گیاه گندم شد؛ به طوری که مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد مقدار فسفر در ساقه در تیمار B1+F3 از نظر آماری با مقدار فسفر در ساقه در تیمار B0+F4 اختلاف معنی‌داری ندارد (جدول ۲). این موضوع نشان می‌دهد که جدایه‌های محرک رشد توانسته‌اند میزان مصرف کود فسفر را تا ۲۵ درصد کاهش دهند. تیمارهایB0+F0، B0 + F1 و B1+F0 دارای حداقل مقدار فسفر در ساقه می‌باشند و مقدار فسفر گیاه در این تیمارها به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر می‌باشد.کاربرد فسفر به همراه مایه‌کوبی با زادمایه باکتریایی نسبت به کاربرد فسفر به تنهایی سبب افزایش معنی‌داری در مقدار فسفر دانه گیاه شده است که نشان می‌دهد فسفر نقش کلیدی و مهم در دانه گیاه گندم دارد و بدون وجود فسفر عملکرد گیاه کاهش پیدا می‌کند. همان‌طور که مشاهده می‌شود تیمارهای B1+F4، B1+F3 و B0+F4 به ترتیب با ۰/۳۷۵، ۰/۳۶۸ و ۰/۳۷ درصد فسفر دارای بیشترین مقدار بوده‌اند هر چند اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نمی‌شود. به طوری که مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد همانند درصد فسفر در برگ و ساقه، مقدار فسفر دانه در تیمار B1 + F3 از نظر آماری برابر با مقدار فسفر در تیمار B0 + F4 می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که جدایه‌های محرک رشد توانسته‌اند میزان مصرف کود فسفر را تا ۲۵ درصد کاهش دهند. تیمار B0+F0 دارای حداقل مقدار فسفر در دانه گندم (۰/۱۹۸ درصد) می‌باشند و مقدار فسفر در دانه گیاه در این تیمار به طور معنی‌داری کمتر از برخی تیمارهای دیگر می‌باشد. شکل ۳ تغییرات میزان فسفر در دانه، ساقه و برگ گیاه گندم در مرحله رسیدگی را نشان می‌دهد؛ با افزایش سطح کودی و کاربرد باکتری میزان فسفر در بافت گیاه افزایش می‌یابد. باکتری‌های حل کننده فسفات باعث افزایش حلالیت فسفر غیر محلول خاک و افزایش رشد گیاه و کمیت و کیفیت محصول تحت شرایط کمبود فسفر می‌شوند و استفاده از کودهای شیمیایی فسفر را کاهش می‌دهند. مشخص شده است که باکتری‌های حل کننده فسفات علاوه بر کمک به جذب عنصر فسفر، موجب جذب سایر عناصر، کاهش بیماری‌ها و بهبود ساختمان خاک و در نتیجه تحریک رشد و افزایش کمی و کیفی محصول می‌شوند.

مطالعات نشان می‌دهد که قابلیت دسترسی فسفر خاک برای گیاه به فاکتورهای فیزیکی خاک (بافت، رطوبت، دما، تهویه و فشردگی)، فاکتورهای شیمیایی خاک (pH، مینرالوژی، مواد آلی و برهمکنش با دیگر عناصر غذایی)، فاکتورهای زیستی خاک (فعالیت و ترشحات ریشه گیاهان و ریزسازواره‌های خاک)، فاکتورهای گیاهی (واریته و سن گیاه، توسعه و پخشیدگی ریشه گیاه) و فاکتورهای کود فسفر (مقدار، روش کاربرد، قابلیت انحلال در آب، فرمول شیمیایی و شکل فیزیکی کود) بستگی دارد. بنابراین قابلیت دسترسی فسفر خاک به برآیند فاکتورهای اشاره شده بستگی دارد که پیچیدگی خاصی به چرخه فسفر داده است. به همین دلیل تخمین قابلیت دسترسی فسفر خاک و جذب آن به وسیله گیاه با در نظر گرفتن تعداد محدودی از فاکتورهای اشاره شده احتمالاً اشتباه خواهد بود. از طرفی رشد و نمو گیاهان به فاکتورهای خیلی زیادی بستگی دارد که یکی از آن‌ها تأمین عناصر غذایی ضروری است؛ و این در حالی است که فسفر تنها یکی از ۱۷ عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان می‌باشد. بنابراین گاهی با افزایش مقدار کود سوپر فسفات تریپل مصرف شده (البته تا یک حدی) تفاوت معنی‌داری از نظر برخی از صفات رشد و نموی ایجاد نمی‌شود (Jeshni et al., 2017).

در شرایط کمبود فسفر، تیمار باکتریایی نسبت به شاهد (بدون مایه‌کوبی باکتری) فسفر گیاه را افزایش داد. پژوهش‌ها نیز تأیید کننده این موضوع می-باشد که باکتری‌های محرک رشد گیاه با فرآیندهای ترشح ترکیبات کمپلکس کننده یا حل کننده مانند اسیدهای آلی، اسیدهای غیر آلی، کیلیت کردن و ترشح فسفاتازهای برون سلولی برای معدنی کردن فسفات‌های آلی فسفر قابل جذب خاک را افزایش می‌دهند.

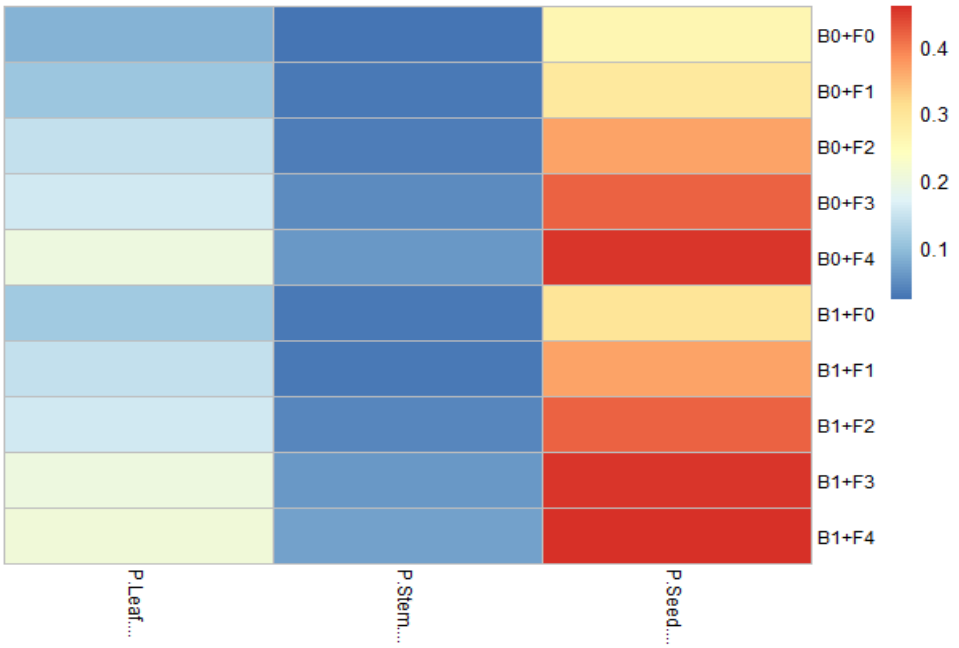
جدول ۲- بررسی اثرات متقابل کودهای شیمیایی و زیستی بر میزان فسفر گیاه گندم

	درصد فسفر برگ	درصد فسفر ساقه	درصد فسفر دانه
B0+F0	۰/۰۶۰۰۰^{d}	۰/۰۱۵۰۰^{d}	۰/۱۹۸۳^{e}
B0+F1	۰/۰۷۸۳۳^{c}	۰/۰۲۰۰۰^{cd}	۰/۲۲۵۰^{d}
B0+F2	۰/۱۰۱۷^{b}	۰/۰۲۱۶۷^{cd}	۰/۲۸۶۷^{c}
B0+F3	۰/۱۱۳۳^{b}	۰/۰۳۱۶۷^{abc}	۰/۳۳۵۰^{b}
B0+F4	۰/۱۴۸۳^{a}	۰/۰۴۰۰۰^{ab}	۰/۳۷۰۰^{a}
B1+F0	۰/۰۸۰۰۰^{c}	۰/۰۲۰۰۰^{cd}	۰/۲۳۰۰^{d}
B1+F1	۰/۱۰۳۳^{b}	۰/۰۲۰۰۰^{cd}	۰/۲۸۶۷^{c}
B1+F2	۰/۱۱۵۰^{b}	۰/۰۳۰۰۰^{bcd}	۰/۳۳۵۰^{b}
B1+F3	۰/۱۴۸۳^{a}	۰/۰۴۰۰۰^{ab}	۰/۳۶۸۳^{a}
B1+F4	۰/۱۵۳۳^{a}	۰/۰۴۶۶۷^{a}	۰/۳۷۵۰^{a}

* اعدادی که در هر ستون دارای یک حرف مشترک کوچک هستند، از لحاظ آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش تعداد ۲۵۰ جدایه باکتری از خاک فراریشه و ۱۵۰ جدایه از ریشه گندم جداسازی و خالص‌سازی شد. نتایج حاصل از آزمون تولید IAA در محیط رشدی حاوی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان نشان داد که ۸۸ درصد باکتری‌های ریزوسفری و ۷۲ درصد باکتری‌های اندوفیت دارای توان تولید IAA بودند. نتایج حاصل از اثر زادمایه میکروبی برتر و کود فسفری برای دستیابی به حداکثر رشد و عملکرد گیاه گندم طی دو سال کشت متوالی در مزرعه نشان داد که درصد فسفر بافت‌های گیاه از نظر آماری برای تیمار ۱۰۰٪ کودهی فسفره بدون زادمایه و تیمار ۷۵٪ کود همراه با زادمایه باکتری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت. نتایج حاصل از ارزیابی کاهش مقادیر مختلف کودی در طی دو سال کشت نشان داد که ۷۵٪ کود فسفره، کمترین مقدار کودی بود که می‌تواند همراه با زادمایه، رشدی برابر ۱۰۰٪ کود فسفره و بدون استفاده از زادمایه باکتری ایجاد کند؛ وقتی ۵۰٪ کود فسفره یا کمتر همراه با زادمایه باکتری اضافه شد، رشد کمتری از گیاه گندم یا رشد ناپایداری در مقایسه با تیمار شاهد مثبت (۱۰۰٪ نیاز کودی و بدون زادمایه باکتری) مشاهده شد. بر اساس این نتایج، پیشنهاد می‌شود این زادمایه می‌تواند به عنوان مکمل با کودهای شیمیایی به منظور کاهش سطح مصرف کودهای شیمیایی استفاده شود اما نمی‌تواند جایگزینی برای کود فسفر باشد. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، باکتری‌های محرک رشد فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 کاندیداهای مناسبی برای توسعه رشد ریشه، جذب بیشتر فسفر و در نتیجه افزایش عملکرد گندم هستند و می‌توانند به عنوان زادمایه‌هایی برای بهبود سلامت و عملکرد گندم استفاده شوند.



شکل ۳- نقشه‌ی حرارتی (هیت مپ) تغییرات میزان فسفر در برگ، ساقه و دانه گندم در اثر تیمارهای باکتریایی و سطوح مختلف کود فسفری

منابع

آمارنامه کشاورزی، (۱۳۹۶). جلد اول: محصولات زراعی سال زراعی ۹۵-۹۴. چاپ اول انتشارات وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، تهران.

Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). In Molecular microbial ecology of the soil (pp. 57-67): Springer.

Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and environmental Microbiology, 57(2), 535-538.

Cui, X., Zhang, Y., Gao, J., Peng, F., & Gao, P. (2018). Long-term combined application of manure and chemical fertilizer sustained higher nutrient status and rhizospheric bacterial diversity in reddish paddy soil of Central South China. Scientific Reports, 8(1), 16554.

Curtis, B. C., Rajaram, S., & Gómez, M. (2002). Bread wheat: improvement and production: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Defez, R., Andreozzi, A., & Bianco, C. (2017). The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. Microbial ecology, 74(2), 441-452.

Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. Environmental Science and Pollution Research, 1-10.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 2012.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological research, 206, 131-140.

Hart, M. R., Quin, B. F., & Nguyen, M. (2004). Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects. Journal of Environmental Quality, 33(6), 1954-1972.

Jeshni, M. G., Mousavinik, M., Khammari, I., & Rahimi, M. (2017). The changes of yield and essential oil components of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) under application of phosphorus and zinc fertilizers and drought stress conditions. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 16(1), 60-65.

Naher, U. A., Panhwar, Q. A., Othman, R., Ismail, M. R., & Berahim, Z. (2016). Biofertilizer as a Supplement of Chemical Fertilizer for Yield Maximization of Rice. Journal of Agriculture Food and Development, 2, 16-22.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and soil, 287(1-2), 15-21.

Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E., Sadhana, B., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(4), 2133-2144.

Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry, 160(1), 47-56.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2(1), 587.

Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, 9(6), 778-781.

Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Kumar, V. P., & Reddy, S. R. (2010). Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Research, 4(14), 1491-1494.

Syers, J., Johnston, A., & Curtin, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use. FAO Fertilizer and plant nutrition bulletin, 18(108).

Tahmasbi, F., Lakzian, A., Khavazi, K., & Pakdin, P. A. (2014). Isolation, identification and evaluation of sidrophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn.

Ulrich, A. E. (2019). Cadmium governance in Europe's phosphate fertilizers: Not so fast? Science of the total environment, 650, 541-545.

Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology, 91(2-3), 127-141.

Westerman, R. L. (1991). Soil testing and plant analysis. In: LWW. Soil Science Society of America book series

Topic for submission: Soil Biology and Bio fertilizer

Study of potential application of wheat growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria as a biofertilizer (chemical-biological fertilizer) package

Somayeh Emami[1]*, Hossein Ali Alikhani[2], Ahmad Ali Pourbabaee[3], Hassan Etesami[4], Fereydoon Sarmadian[2], Babak Motesshare zadeh[3]

[1] PhD. student of soil Biology and Biotechnology , Department of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

[2] Full professor, Department of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

[3] Associate Professor, Department of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

[4] Assistant Professor, Department of soil science, College of agriculture and natural resource, University of Tehran

Abstract

In this study, the bacteria were isolated from the rhizosphere (250 isolates) and from the roots (150 isolates) of wheat plant. The production of siderophore, hydrogen cyanide, indole acetic acid, organic and inorganic phosphate solubilization and the ability to colonize the roots were evaluated by 400 isolates and compared with each other. According to the results, 88 and 72% of rhizosphere and endophytic isolates were positive for production of IAA, respectively. In addition, 38 and 24% of rhizosphere bacteria and 34.66 and 28% of endophytic bacteria were able to mineralize organic phosphate and solubilize insoluble inorganic phosphate, respectively, in Sperber culture medium and modified Sperber culture medium.The result of two-year field study (2017 and 2018) of effect of rates of chemical P-fertilizer (0, 25, 50, and 75, 100% of the full recommended fertilizer rate) coupled with R185 and E240 as co-inoculation showed an increase in wheat plant growth indices and yield.The results of this assay also indicated that supplementing 75% of the recommended P-fertilizer rate with bacterial isolates resulted in increase of P content, which were statistically equivalent to the full fertilizer rate without these strains. Generally, the results of this study showed that the native PGPB can be used as a supplement to chemical fertilizers in order to reduce the level of fertilizer application.

Keywords: Bacteria – plant interaction, Rhizospheric and endophytic bacteria, Phosphorus, Wheat.

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری

اسماعیل بخشنده[۱*]، سید محمد علوی[۱]، مهدی حسینی[۲]، مجتبی زراعت‌پیشه[۳]

[۱] پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۲] گروه علوم خاک دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۳] گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز، ایران

چکیده

پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید (IAA) از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری اجرا گردید. تعداد ۱۰۸ نمونه خاک (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. برای تعیین باکتری‌های تولیدکننده IAA از معرف سالکوسکی و روش اسپکتوفتومتری (قرائت در طول موج ۵۳۰ نانومتر) استفاده گردید. از مجموع ۱۲۰ جدایه به‌دست آمده از این اراضی حدود ۶۱/۷ درصد (۷۴ جدایه) قابلیت تولید IAA در محیط کشت LB مایع حاوی ۰/۱ درصد اسیدآمینه تریپتوفان را داشتند. توانایی تولید IAA این جدایه‌ها از ۲ تا ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر بعد از گذشت سه روز در دمای ۱±۲۹ درجه سلسیوس متغیر بود. جدایه‌های IAA3 و IAA13 با میزان تولید IAA به‌ترتیب ۱۶/۸ و ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر انتخاب و شناسایی شدند. بلاست توالی‌ها نوکلئوئیدی 16S rDNA نشان داد که دو جدایه برتر بیش از ۹۹ درصد به‌ترتیب به باکتری‌های *Vogesella indigofera* و *Ensifer* sp. شباهت داشتند. این جدایه‌ها می‌توانند به‌عنوان نماینده‌های مناسبی از باکتری‌های افزاینده رشد در تولید کودهای زیستی جهت استفاده در سیستم‌های کشاورزی پایدار مبتنی بر محیط زیست مد نظر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: باکتری تولیدکننده ایندول استیک اسید ، باغات مرکبات، ، جنگل، مزارع برنج، مزارع خشکه‌کاری

مقدمه

تولید اکسین (ایندول استیک اسید/IAA) به عنوان یک متابولیک ثانویه توسط بسیاری از باکتری‌های جداسازی شده از منطقه ریزوسفر ریشه گیاهان مختلف گزارش شده است (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۴). به‌طور کلی، IAA ترشح‌شده توسط باکتری‌های ریزوسفری ممکن است بر بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاه مانند تقسیم سلولی، رشد و تمایز، تحریک بذر و جوانه‌زنی، افزایش رشد و نمو ریشه، کنترل فرایندهای رشد رویشی، تشکیل ریشه‌های فرعی و مویین، واکنش به نور، زمین، فلورسانس، فتوسنتز، تشکیل رنگدانه، تولید متابولیت‌های مختلف و ایجاد مقاومت به شرایط تنش‌زا تأثیرگذار باشد (Ahemad and Kibret, 2014؛ Rivera و همکاران، ۲۰۱۸). IAA ممکن است به عنوان یک مولکول دوگانه بر برخی از مسیرهای علامت‌دهی (Signaling) اثر گذاشته و بیان ژن در برخی از میکروارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، کاهش غلظت IAA به عنوان یک علامت با مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تعدادی از باکتری‌های بیماریزای گیاهی ارتباط داشته به طوری که در این زمان افزایش حساسیت گیاهان به بیمارگرهای باکتریایی توسط کاربرد خارجی IAA یا IAA تولیدشده توسط بیمارگر به اثبات رسیده است (Spaepen and Vanderleyden, 2011). حضور IAA می‌تواند باعث افزایش سطح و طول ریشه و در نتیجه افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه شود. همچنین، افزایش غلظت اکسین در منطقه ریشه باعث نرم‌شدن دیوارهای سلولی ریشه و در نتیجه افزایش ترشحات ریشه گیاه میزبان شود. افزایش ترشحات خود باعث سهولت و افزایش دسترسی باکتری‌های موجود در منطقه ریزوسفر به عناصرغذایی و در نتیجه افزایش رشد و جمعیت آن‌ها خواهد شد (Glick, 2012).

*ایمیل نویسنده مسئول: e.bakhshandeh@sanru.ac.ir & bakhshandehesmail@gmail.com

بیشتر گونه‌های ریزوبیوم قادر به تولید IAA می‌باشند (Ahemad and Khan, 2011). در لگوم‌ها غلظت IAA تعیین‌کننده میزان تشکیل گره در ریشه حبوبات می‌باشد (Spaepen و همکاران، ۲۰۰۷؛ Glick, 2012). در زمان تلقیح گیاه ماش با باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* توانایی تثبیت نیتروژن گیاه نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته بود (Camerini و همکاران، ۲۰۰۸). علت این افزایش به توانایی تولید IAA توسط این باکتری نسبت داده شده است. تاکنون، جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها از قبیل *Acinetobacter*، *Rhizobium*، *Enterobacter*، *Azotobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Bradyrhizobium* به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده IAA در دنیا جداسازی و به ثبت رسیدند (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ahemad and Kibret, 2014). کارایی این باکتری‌های به تعامل بین باکتری و خصوصیات خاک منطقه جداسازی شده (گیاه میزبان) وابسته است. بنابراین، بهتر است برای یافتن باکتری‌هایی با توانایی بالاتر، نمونه‌برداری‌هایی متناسب با منطقه و گیاهان هدف آن منطقه انجام و جدایه‌های پر جمعیت و دارای توانایی بالاتر انتخاب گردند که از اهداف اصلی مطالعه حاضر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

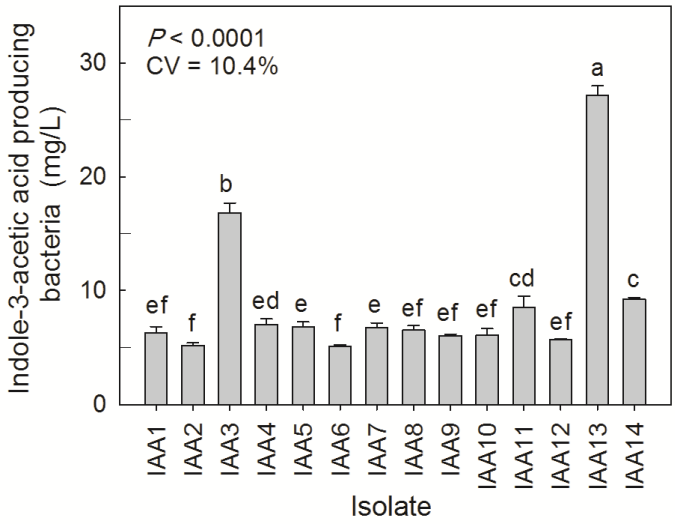
تعداد ۱۰۸ نمونه خاک از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. این اراضی شامل جنگل، باغات مرکبات، مزارع برنج و اراضی خشکه‌کاری بودند. نمونه‌برداری از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر انجام و نمونه‌های درون کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار گرفته و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری‌ها، ابتدا پنج گرم خاک از هر نمونه به ۴۵ میلی‌لیتر آب نمک استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری (استریل شده) اضافه و سوسپانسیونی به نسبت (۱:۹) تهیه گردید. سوسپانسیون‌ها به مدت دو ساعت روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) و در دمای اتاق تکان داده شد. در پایان، رقت‌دهی تا 10^{-4} و 10^{-5} در آب مقطر استریل انجام شد. از هر رقت به مقدار ۶۰ میکرولیتر با دو تکرار بر روی تشتک‌های (با قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت آگار غذایی سوکروزدار (NAS) پخش شد. تشتک‌ها در دمای ۱±۲۹ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شده و جداسازی باکتری‌ها بر اساس اندازه، رنگ و ارتفاع کلنی، ۴۸ ساعت بعد از زمان کشت انجام شد.

برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده IAA، از روش پیشنهاد شده توسط Bakhshandeh و همکاران (۲۰۱۴) استفاده گردید. به این صورت که هر ایزوله به طور جداگانه در محیط کشت مایع LB حاوی ۰/۱ درصد از اسیدآمینه تریپتوفان با سه تکرار کشت داده شد. پس از کشت باکتری در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در دمای ۱±۲۹ درجه‌سانتی‌گراد، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت از هر فالکون برداشته و به فالکون‌های جدید ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس برای رسوب باکتری در محیط کشت، فالکون‌های به مدت ۵ دقیقه، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، یک میلی‌لیتر از روشناور برداشته و با دو میلی‌لیتر محلول سالکوسکی (۱ میلی‌لیتر محلول کلریدآهن(III) نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۳۵ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد واکنش داد. در نهایت، مقدار تولید IAA در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. از منحنی استاندارد برای تخمین دقیق مقدار تولید IAA استفاده گردید.

برای شناسایی ایزوله‌های برتر از کیت شرکت سیناژن جهت استخراج دی ان ای استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ناحیه 16S از جفت آغازگر fD1 ('5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rP2 ('5-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید که قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند (Weisburg و همکاران، ۱۹۹۱). جهت انجام PCR از ۱ میکرولیتر دی ان ای (استخراج شده از باکتری)، ۱۰ میکرولیتر کیت 2X PCR Master Mix شرکت ترمو (Thermo Scientific, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ میکرومول در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. شرایط به کاربرده شده برای انجام واکنش عبارت بود از: ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس، ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و پس از آن ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در آخر نگهداری در ۴ درجه سلسیوس بود. بعد از انجام PCR از کیت خالص‌سازی (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo, Germany) جهت خالص‌سازی محصول PCR استفاده شد. محصول PCR خالص‌سازی شده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Microsynth_Swiss ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های موجود در NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) همردیف‌سازی و مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

از بین ۱۲۰ جدایه باکتری مورد بررسی که از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری جداسازی و خالص‌سازی شد. ۷۴ جدایه (۶۱/۷ درصد) توانایی تولید IAA را داشتند. از نظر مقدار تولید IAA بین جدایه‌های به دست آمده اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۰۰۱$). در این بین، ۶۰ جدایه کمتر از ۵ میلی‌گرم در لیتر، ۱۲ جدایه بین ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲ جدایه بالای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید نمودند که در سه گروه به‌ترتیب ضعیف، متوسط و خوب گروه‌بندی شدند. توانایی تولید هر یک از جدایه‌ها متعلق به گروه متوسط و خوب (۱۴ جدایه) در شکل ۱ ارائه شده است. از مجموع ۱۴ جدایه، چهار جدایه متعلق به اراضی جنگلی (IAA3، IAA4، IAA5 و IAA12)، سه جدایه متعلق به مزارع برنج (IAA11، IAA13 و IAA14)، سه جدایه متعلق به باغات مرکبات (IAA6، IAA7 و IAA10) و چهار جدایه متعلق به اراضی خشکه‌کاری (IAA1، IAA2، IAA8 و IAA9) بودند (شکل ۱). تنها جدایه‌های IAA3 و IAA13 به عنوان جدایه‌های برتر و با قابلیت تولید IAA به‌ترتیب ۱۶/۸ و ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر بعد از گذشت ۳ روز در دمای ۲۹±۱ درجه سلسیوس انتخاب و شناسایی شدند. نتایج تعیین توالی و هم‌ردیفی توالی‌ها نشان داد که دو این دو جدایه بیش از ۹۹ درصد به‌ترتیب به باکتری‌های *Vogesella indigofera* و *Ensifer* sp. شباهت داشتند.



شکل ۱- نتایج تجزیه واریانس جدایه‌های به دست آمده از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری بر اساس مقدار تولید IAA در پایان دوره آزمایش (بعد از گذشت سه روز در محیط کشت مایع LB حاوی ۰/۱ درصد اسیدآمینه تریپتوفان). SE، خطای استاندارد می‌باشد.

به طور مشابه، Basu and Ghosh (2001) گزارش نمودند که ایزوله *Rhizobium* sp. در زمان کاربرد اسیدآمینه تریپتوفان قادر به تولید ۴۵/۶ میلی‌گرم بر لیتر IAA می‌باشد و بهترین شرایط برای تولید IAA زمانی است که محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسیدآمینه تریپتوفان بود. Rameshkumar و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که جدایه *V. indigofera* DSM 3303 توانایی تولید IAA را دارد اما مقدار آن را کمّی‌سازی نکردند. Cimmino و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که چهار جدایه *Pantoea agglomerans* قادر به تولید ۵/۴ تا ۱۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بعد از چهار روز رشد در دمای ۲۶ درجه سلسیوس می‌باشند. عباس‌زاده‌دهجی و همکاران (۱۳۸۷) پس از جداسازی باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* تولیدکننده IAA از ریشه گیاه کلزا محدود تولید IAA این ریزجانداران را بین ۰ تا ۶۳/۷ میلی‌گرم بر لیتر گزارش نمودند. همچنین، کاربرد این باکتری‌ها بر رشد گیاهچه کلزا در شرایط گلدانی اثر مثبت داشت. در آزمایشی دیگر، به طور مشابه عرب و همکاران (۱۳۸۷) اثر مثبت کاربرد باکتری‌های جنس *Azospirillum* sp.، تولیدکننده IAA بر رشد گیاه ذرت شیرین در شرایط گلخانه‌ای را گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان جدایه‌های برتر را به‌عنوان نماینده‌های مناسبی از باکتری‌های افزاینده رشد با قابلیت تولید IAA در تولید کودهای زیستی جهت استفاده در سیستم‌های کشاورزی پایدار مبتنی بر محیط زیست توصیه نمود. البته ابتدا انجام مطالعات گلدانی و مزرعه‌ای جهت تایید کارایی این ریزجانداران در شرایط طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی ساری به شماره ۹۶/۴۲۳/پ (T237-97) می‌باشد. بدین‌وسیله از این مراکز بابت حمایت‌های مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

عباس‌زاده‌دهجی، پ.، اسدی رحمانی، ه.، صالح راستین، ن.، خاوازی، ک. و سلطانی طولارود، ع.ا. ۱۳۸۷. ارزیابی توان تولید اکسین توسط سودوموناس های فلورسنت و اثرات آنها در رشد گیاهچه های کلزا (*Brassica napus* L.)، علوم خاک و آب، ۲۲(۲): ۲۱۵-۲۰۳.

عرب، س.م.، اکبری، غ.؛ علیخانی، ح.، ارزانش، م.ح. و اله‌دادی. ۱. ۱۳۸۷. بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری های جداسازی شده بومی جنس آزوسپیریلوم و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایه برتر بر گیاه ذرت شیرین. پژوهش‌های زراعی ایران، ۶(۲): ۲۲۵-۲۱۷.

Ahemad, M., and Khan, M.S. 2011. Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea–Rhizobium symbiosis. Scientia Horticulturae, 129:266-272.

Ahemad, M., and Kibret, M. 2014 Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science, 26:1-20.

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H., and Nematzadeh, G. A. 2014. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30:2437-2447.

Basu, P.S., Ghosh, A.C., 2001. Production of indole acetic acid in culture by a *Rhizobium* species from the root nodules of a monocotyledonous tree, *Roystonea regia*. Acta Biotechnologica, 21:65-72.

Camerini, S., Senatore, B., Lonardo, E., Imperlini, E., Bianco, C., Moschetti, G., Rotino, G.L., Campion, B., and Defez, R. 2008. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. Archives of Microbiology, 190:67-77.

Cimmino, A., Andolfi, A., Marchi, G., Surico, G., and Evidente, A. 2006. Phytohormone production by strains of *Pantoea agglomerans* from knots on olive plants caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi. Phytopathologia Mediterranea, 45:247-252.

Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica 2012:1-15.

Rameshkumar, N., Lang, E., and Tanaka, N. 2016. Description of *Vogesella oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of saline tolerant pokkali rice. Systematic and Applied Microbiology, 39:20-24.

Rivera, D., Mora, V., Lopez, G., Rosas, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Cassan, F. 2018. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. Journal of Applied Microbiology, 125:1774-1785.

SAS Institute Inc 2013. SAS/STAT user's guide. SAS Institute Inc., Cary.

Spaepen, S., and Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3: a001438. doi:10.1101/cshperspect.a001438.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews, 31:425-448.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173:697-703.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and identification of indole acetic acid producing bacteria from the forest and agricultural lands in Sari

Bakhshandeh[*1], E., Alavi[1], S.M., Hosseini[2], M., Zeraatphisheh[3], M.

[1] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan and Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[2] Department of Soil Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[3] Department of Soil Science, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

Abstract

The present study was carried out to isolate and identify indole-3-acetic acid (IAA) producing bacteria from forest and agricultural lands in Sari. 108 soil samples (0-30 cm depth) were collected in January 2018. The Salkowsky reagent and a spectrophotometry method (read at 530 nm) was used to determine IAA producing bacteria in this study. A total of 120 bacteria strains were isolated from those lands, ~61.7% (74 strains) were able to produce IAA in the liquid Luria broth medium supplemented with 0.1% L-tryptophan. The ability of these strains was ranged from 2 to 27.1 mg l^{-1} after 3 days of growth at 29±1 °C. Two isolates IAA3 (16.8 mg l^{-1}) and IAA13 (27.1 mg l^{-1}) were selected for identifying using 16S rDNA sequencing method. The isolates were identified as *Vogesella indigofera* and *Ensifer* sp. with similarity more than 99% based on the BLAST tool in the NCBI database. Therefore, these bacteria can be introduced as appropriate candidates of plant growth promoting bacteria for producing biofertilizer to apply in agricultural environment systems.

Keywords: Commercial *Citrus* gardens, Dryland, Forest, Rice field, Indole acetic acid producing bacteria.

[*] Corresponding author, Email: bakhshandehesmail@gmail.com & e.bakhshandeh@sanru.ac.ir

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی پارامترهای محیطی موثر بر فراوانی کرم‌های خاکزی

سمانه تاجیک[۱*]، شمس الله ایوبی[۲]

[۱] دانش آموخته دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[۲] استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

بی‌مهرگان خاکزی مانند کرم‌های خاکزی از طریق تسهیل کردن فرآیند تجزیه مواد آلی و بقایای ریشه و لاشبرگ‌ها، بهبود بخشیدن به حاصلخیزی و ساختار فیزیکی خاک و همچنین تاثیر بر ترکیب گیاهی، نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی و پایداری اکوسیستم ایفا می‌کنند. بدین منظور این مطالعه به بررسی تاثیر پارامترهای محیطی بر فراوانی کرم‌های خاکزی در اراضی جنگلی منطقه شصت کلاته استان گلستان انجام شد. نمونه‌برداری به طریق شبکه‌بندی سیستماتیک تصادفی از ۱۵۳ نقطه و از عمق صفر تا ۱۰ سانتی‌متر توسط قاب فلزی با ابعاد ۱۰×۱۰×۱۰ سانتی‌متر انجام گرفت. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دادند که فراوانی کرم‌های خاکزی به طور معنی‌داری تحت تاثیر پارامترهای محیطی می‌باشند. ویژگی‌های خاک شامل هدایت الکتریکی، کربن آلی، نیتروژن کل و تنفس میکروبی همبستگی معنی‌داری با فراوانی کرم‌های خاکزی نشان دادند. همچنین پارامترهای توپوگرافی و شاخص پوشش گیاهی بدست آمده از تصاویر ماهواره‌ای، می‌توانند به طور معنی‌داری فراوانی کرم‌های خاکزی را تحت تاثیر قرار بدهند. البته احتمالا تاثیر پارامترهای توپوگرافی بر فراوانی کرم‌های خاکزی به صورت غیر خطی می‌باشد که پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ویژگی‌های خاکی، پارامترهای توپوگرافی،همبستگی، آنالیز مولفه‌های اصلی

مقدمه

خاک‌ها نتیجه روابط پیچیده بین اقلیم، گیاهان، جانوران، ترکیب و ساختار مواد مادری، توپوگرافی و نهایتا سن عوارض زمین می‌باشد. ارتباط‌های گسترده‌ای بین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک وجود دارد که فرآیندهای موجود در خاک را کنترل می‌کنند و با تغییرات زمانی و مکانی خاک مرتبط هستند (Baretta و همکاران ۲۰۱۴). ارزیابی این متغیرهای محیطی یکی از مهم‌ترین راه‌های بررسی شرایط مدیریتی و کیفیت سیستم جنگل می‌باشد.

جانوران خاکزی شامل شاخه‌های زیاد و متنوعی در خاک هستند که ویژگی‌های تاکسونومی، جزئیات طبیعت تاریخی و بیولوژیک آن ها ناشناخته است. بی‌مهرگان خاکزی از طریق تسهیل کردن فرآیند تجزیه مواد آلی و بقایای ریشه و لاشبرگ‌ها، بهبود بخشیدن به حاصلخیزی و ساختار فیزیکی خاک و تاثیر بر ترکیب گیاهی نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی و پایداری اکوسیستم ایفا می‌کنند (Bardgett و همکاران، ۲۰۱۳). از آن جایی‌که جانوران خاکزی به تغییرات ویژگی‌های محیطی حساس می‌باشند به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در بررسی کیفیت خاک استفاده شده‌اند (بارتا و همکاران ۲۰۱۴). از بین بی‌مهرگان خاکزی (بزرگتر از ۲ میلی‌متر)، کرم‌های خاکی، موریانه‌ها و مورچه‌ها نقش مهمی در کنترل ساختمان خاک ایفا می‌کنند. این بی‌مهرگان به دلیل جمعیت زیاد و فعالیت‌شان در اکوسیستم گرمسیری به عنوان مهندسین خاک شناخته می‌شوند. در مطالعات مختلفی فرض شده است که بی‌مهرگان خاکزی به دلیل تاثیر در نقل و انتقال و ترسیب کربن، تنظیم فعالیت و اجتماع میکروبی، تغییرات مواد غذایی و خاکدانه‌سازی، نقش

*ایمیل نویسنده مسئول: samaneh10941@yahoo.com

مهمی در پویایی اکوسیستم (چرخه عناصر غذایی و نگهداری و حفاظت از ساختار خاک) دارند. کرم‌های خاکی به عنوان مهندسین اکوسیستم شناخته می‌شوند که ساختار فیزیکی خاک محیط خود را تغییر داده، بر جریان انرژی و مواد غذایی در خاک تاثیر می‌گذارند.

به طور کلی، می‌توان بیان نمود که کرم‌های خاکزی به چند طریق باعث تغییر در ساختار خاک میگردند: ۱) کرم‌های خاکی مواد آلی را با ذرات خاک به صورت خاکدانه ترکیب می‌کنند. از آنجایی که مواد آلی خاک به عنوان یک فاکتور اساسی نقشی کلیدی در کنترل منافذ خاک و پایداری خاکدانه‌ها ایفا می کنند ، ترکیب مواد آلی تازه با خاک نقش موثری در ساختار خاک دارد. ۲) کرم‌های خاکی قادر هستند با بلعیدن خاکدانه‌ها منجر به تغییر در ساختار داخلی خاکدانه‌ها و ایجاد خاکدانه‌های بیوژنیک[1] شوند. ۳) کرم‌های خاکی می‌توانند عامل هوادیدگی کانی‌ها باشند. این نقش بی‌مهرگان احتمالا متغیر بوده و بستگی به ویژگی‌های خاک و گونه کرم‌های خاکی دارد (Mujinya و همکاران ۲۰۱۱).

گونه‌های گیاهی و حیوانی در محدوده اکولوژیک خود با یکدیگر و و محیطشان در ارتباط متقابل هستند. بنابراین در بررسی پاسخ یک گونه به تغییرمحیطی و تاثیر آن بر اکوسیستم، باید تمامی روابط متقابل درنظر گرفته شود. همچنین تعیین فاکتورهای موثر بر جانوران خاکزی از جمله نخستین پارامترهای اصلی در بررسی مدیریت می‌باشند. فراوانی کرم‌های خاکزی متاثر از فاکتورهای متعددی می‌باشد که نگهداری و یا انقراض آن ها را کنترل می‌کنند. از آن جایی که این فاکتورها در مقیاس های مکانی و زمانی مختلفی عمل می‌کنند، بنابراین فرایندهای اکولوژیکی بستگی به مقیاس زمانی و مکانی دارند و دارای ساختار پیچیده‌ای هستند. از سوی دیگر، به دلیل آن که اجتماع بی‌مهرگان خاکزی مانند کرم‌های خاکزی به مقدار زیادی توسط ویژگی‌های محیطی تعیین می‌شوند، فاکتور موثری برای بررسی اکوسیستم می‌باشند. بنابراین اطلاع از چگونگی فاکتورهای موثر بر جانوران خاکزی مانند کرم‌های خاکزی نه تنها به ما این امکان را می‌دهد که قدرت تاثیر تغییرات محیطی آینده بر آن ها را پیش‌بینی کنیم بلکه امکان ارزیابی درست و احیاء آن ها را هم فراهم می‌کند(Bardgett و همکاران، ۲۰۱۳).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

منطقه مورد مطالعه شامل جنگل آموزشی پژوهشی منطقه شصت کلاته شهر گرگان دراستان گلستان است. این منطقه در شیب شمالی کوه-های البرز واقع شده است. که به صورت شرقی- غربی در امتداد دریای خزر قرار دارد. ارتفاع این منطقه کوهستانی از سطح دریا بین ۲۸۰ تا ۷۰۶ متر متغیر است. متوسط بارندگی سالیانه این منطقه از سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۴، به مقدار ۵۲۵/۸ میلی‌متر است که بین ۳۴۶ تا ۷۲۴ میلی متر تغییر کرده است.

برای انجام این تحقیق، نمونه‌برداری به طریق شبکه‌بندی سیستماتیک تصادفی از ۱۵۳ نقطه در جنگل سری یک با ماده مادری لسی صورت گرفت. موقعیت محل پلات‌های نمونه‌برداری توسط GPS شناسایی شدند. در فصل بهار (اردیبهشت ماه) در هر پلات از عمق صفر تا ۱۰ سانتی‌متر توسط قاب فلزی با ابعاد ۱۰×۱۰×۱۰ سانتی‌متر با استفاده از روش حاصلخیزی و بیولوژی خاک‌های مناطق گرمسیری (TSBF method) نمونه مرکب (سه تکرار) تهیه گردید. پس از انتقال نمونه‌های تهیه شده به آزمایشگاه و قبل از خشک شدن و ازدست رفتن رطوبت خاک، به منظور جداسازی کرم‌های خاکی از روش جداسازی با دست استفاده شد. در این روش ابتدا نمونه‌های خاک با وزن مشخصی روی یک سطح صاف پهن شدند سپس توسط چراغ مطالعه سطح نمونه کاملا روشن گردید و با استفاده از قلمو و گیره کوچک نمونه‌های کرم‌های خاکی جدا شدند و در الکل ۹۶٪ قرار داده شدند.

آنالیزهای آزمایشگاهی

نمونه‌های خاک تهیه شده از عمق ۰-۱۰ سانتی‌متری پس از جداسازی بی‌مهرگان، هوا خشک شدند و پس عبور از الک ۲ میلی‌متر آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی به شرح زیر در آن ها انجام گرفت: اسیدیته و هدایت الکتریکی توسط دستگاه pH متر و EC متر در عصاره ۱: ۲/۵ خاک به آب، نیتروژن کل خاک به روش کلدال (TN)،کربن آلی به روش والکلی بلک (OC)،کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (CCE)، ذرات

1- Biogenic aggregates

تشکیل دهنده بافت خاک شامل شن (Sand)، سیلت (Silt)، رس(Clay) توسط روش هیدرومتر و تنفس میکروبی (Resp) به روش تیتراسیون در نمونه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شدند.

استخراج متغیرهای کمکی

به منظور محاسبه پارامترهای توپوگرافی، شاخص‌های گیاهی و دمای سطح زمین از نقشه DEM و تصاویر ماهواره‌ای لندست[1] ۸ در نرم افزار ArcGIS (version 10.1) و SAGA GIS (version 1.3.) استفاده گردید وپارامترهای زیر بدست آمدند.

۱. سایه‌اندازی[2] (Hillshading) اندازه‌گیری زاویه بین سطح و نور ورودی که برحسب ردایان محاسبه می‌گردد. ۲. شیب (Slope)، ۳. جهت شیب[3] (Aspetc): جهت بیشترین نرخ تغییر ارتفاع در هر سلول نقشه DEM است و نشان‌دهنده جهت جریان مواد است. ۴. فاکتور طول شیب[4] (LS): یک تابع از طول یک قطعه شیب و سینوس زاویه شیب است و تعیین کننده حمل و نقل تقریبی رسوبات و نیروهای فرسایشی است. ۵. ارتفاع (DEM): که مقدار ارتفاع از سطح دریا را بیان می‌کند. ۶. شاخص رطوبت[5] (WI): حد جریان تجمعی در حوضه آبریز را در ارتباط با مقدار شیب بیان می‌کند.

همچنین با استفاده از تصاویر ماهواره‌ای لندست ۸ شاخص‌های گیاهی زیر محاسبه گردیدند:

شاخص اختلاف نرمال شده گیاهی[6] (NDVI):

$$NRVI= ((RVI-1))/((RVI+1)) \quad (۱-۱)$$

دمای سطح زمین[7] (LST): با استفاده از نقشه NDVI، باندهای ۱۰ و ۱۱ (باندهای حرارتی) لندست ۸ بدست می‌آیند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

بعد از انجام تجزیه‌های آزمایشگاهی، بدست آوردن فراوانی کرم‌های خاکزی و استخراج پارامترهای توپوگرافی، اطلاعات آماری توسط نرم افزار R تجزیه وتحلیل شدند. ضرایب همبستگی اسپیرمن محاسبه‌گردید. همچنین به منظور تعیین و بررسی ارتباط بین پارامترهای توپوگرافی، شاخص گیاهی، ویژگی‌های خاک، فراوانی کرم‌های خاکزی و میزان تاثیر آنها بر یکدیگر از آنالیز مولفه‌های اصلی استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج نشان دادند که همبستگی معنی‌داری بین فراوانی کرم‌های خاکزی با هدایت الکتریکی (۰/۲۰- ;P <۰/۰۵)، کربن آلی (۰/۲۳- ;P <۰/۰۱)، نیتروژن کل (۰/۲۸- ;P <۰/۰۱) و تنفس میکروبی (۰/۱۸- ;P <۰/۰۵) وجود دارد (جدول ۱). همبستگی بین فراوانی بی‌مهرگان و فاکتورهای خاکی مختلف، اغلب به منظور نشان دادن تفاوت کیفیت خاک استفاده شده‌اند. ادوگنا و ابگز (۲۰۱۵) نشان دادند که همبستگی تغییرات ویژگی‌های خاک به شدت تحت تاثیر پارامترهای بیرونی مانند نوع مدیریت و کاربری زمین می‌باشند. بنابراین با توجه به نتایج همبستگی، می‌توان بیان کرد که ویژگی‌های خاک می‌توانند توضیح خوبی در زمینه پراکنش جانوران خاکزی باشند. همچنین فراوانی کرم‌های خاکزی تحت تاثیر منابع غذایی دردسترس جانوران، کربن آلی و نیتروژن کل می‌باشند (Dunxiao و همکاران ۱۹۹۹).

همچنین نتایج آنالیز همبستگی بین فراوانی کرم‌های خاکزی و پارامترهای توپوگرافی نشان دادند که هیچ گونه همبستگی خطی بین پارامترهای توپوگرافی و فراوانی کرم‌های خاکزی وجود ندارد و تنها شاخص پوشش گیاهی NDVI، همبستگی معنی‌داری با فراوانی کرم‌های خاکزی (۰/۲۲- ;P <۰/۰۱) نشان دادند. کابلنتز و رایترز (۲۰۰۴) بیان کردند که همبستگی خطی ضعیفی بین توپوگرافی و تنوع زیستی وجود دارد و احتمالا ارتباط آن ها به صورت غیر خطی می‌باشد.

1- Landsat 8
2- Analytical hill shading
3- Slope aspect
4- slope-length factor
5- Wetness Index
6- Normalized Difference Vegetation Index
7- Land surface temperature

بر طبق نتایج، هدایت الکتریکی خاک همبستگی مثبتی با فراوانی و غنای بی‌مهرگان خاکزی در هر دو عمق داشته است. این نتایج مطابق با نتایج بدست آمده از دیگر مطالعات است و می‌توان به افزایش عناصر غذایی خاک با افزایش هدایت الکتریکی نسبت داد (Stenchly و همکاران ۲۰۱۷) که در نهایت منابع مواد غذایی بیشتری در دسترس جانوران خاکزی قرار می‌دهند. کربن آلی به دلیل آن که نقش موثربیر منابع غذایی جانداران خاکزی دارد، از ارتباط معنی‌داری با آن ها می‌باشد. مطالعات مختلفی به بررسی ارتباط بین کربن آلی و جانوران خاکزی پرداخته‌اند. این مطالعات نشان دادند که از یک سو جانوران خاکزی نقش موثری در تجزیه لاشبرگ و مواد آلی خاک دارند و از طرف دیگر کربن آلی به عنوان یک منبع غذایی اصلی برای جانوران خاکزی بوده است (Mueller و همکاران ۲۰۱۶).

همبستگی معنی‌دار بین تنفس میکروبی با فراوان و تنوع زیستی بی‌مهرگان خاکزی را می‌توان به تاثیر مستقیم بی‌مهرگان خاکزی مانند کرم‌های خاکی در تنفس میکروبی خاک نسبت داد. به طوری که محققین نشان دادند که در خاک‌های محتوی جانوران خاکزی بیشترین مقدار تنفس میکروبی انجام می‌گیرد (Ṣandor و همکاران ۲۰۱۵). علاوه بر این، برخی بی‌مهرگان خاکزی از طریق تغذیه از جامعه میکروبی خاک و رها سازی مواد غذایی ذخیره شده در زیست توده آن ها، با تنفس میکروبی خاک مرتبط می‌باشند.

جدول ۱. همبستگی بین ویژگی‌های خاک و فراوانی کرم‌های خاکزی

متغیر	فراوانی کرم‌های خاکزی	pH	هدایت الکتریکی	کربنات کلسیم معادل	کربن آلی	نیتروژن کل	رس	سیلت	شن	تنفس میکروبی
فراوانی کرم‌های خاکزی	۱/۰۰	۰/۱۴	۰/۲۰*	-۰/۰۵	۰/۲۳**	۰/۲۸**	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۱۸*
pH	۰/۱۴	۱/۰۰	۰/۶۴**	۰/۵۲**	۰/۲۳**	۰/۲۴**	۰/۱۴*	-۰/۳۱**	۰/۱۳	۰/۱۱
هدایت الکتریکی	۰/۲۰*	۰/۶۴**	۱/۰۰	۰/۳۴**	۰/۵۹**	۰/۵۵**	۰/۲۰*	-۰/۲۶**	۰/۰۷	۰/۵۴**
کربنات کلسیم معادل	-۰/۰۴	۰/۵۲**	۰/۳۴**	۱/۰۰	۰/۲۰*	۰/۰۹	۰/۰۳	-۰/۲۷**	۰/۲۳**	۰/۰۷
کربن آلی	۰/۲۳**	۰/۲۳**	۰/۵۹**	۰/۲۰*	۱/۰۰	۰/۷۶**	۰/۲۸**	-۰/۳۸**	۰/۲۳**	۰/۶۰**
نیتروژن کل	۰/۲۸**	۰/۲۴**	۰/۵۵**	۰/۰۹	۰/۷۶**	۱/۰۰	۰/۱۴	-۰/۳۳**	۰/۳۲**	۰/۶۵**
رس	۰/۰۰	۰/۱۴	۰/۲۰*	۰/۰۳	۰/۲۸**	۰/۱۴	۱/۰۰	-۰/۵۳**	-۰/۳۶**	۰/۰۷
سیلت	۰/۰۰	-۰/۳۱**	-۰/۲۶**	-۰/۲۷**	-۰/۳۸**	-۰/۳۳**	-۰/۵۳**	۱/۰۰	-۰/۵۰**	-۰/۲۳**
شن	۰/۰۲	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۲۳**	۰/۲۳**	۰/۳۲**	-۰/۳۶**	-۰/۵۰**	۱/۰۰	۰/۲۶**
تنفس میکروبی	۰/۱۸*	۰/۱۱	۰/۵۴**	۰/۰۷	۰/۶۰**	۰/۶۵**	۰/۰۷	-۰/۲۳**	۰/۲۶**	۱/۰۰

*و**: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

جدول ۲. همبستگی بین پارامترهای توپوگرافی و فراوانی کرم‌های خاکزی

متغیر	فراوانی کرم‌های خاکزی	Hillshading	Aspect	Elevation	slope	WI	NDVI	LST
فراوانی کرم‌های خاکزی	۱/۰۰	۰/۰۵	-۰/۰۷	۰/۰۲	-۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۲۲**	-۰/۰۱
Hillshading	۰/۰۵	۱/۰۰	-۰/۷۴**	۰/۱۲	۰/۱۶*	-۰/۱۲	-۰/۰۶	۰/۰۷
Aspect	-۰/۰۷	-۰/۷۴**	۱/۰۰	۰/۰۰	-۰/۰۲	۰/۰۸	۰/۰۴	-۰/۱۲
Elevation	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۳۰**	-۰/۳۲**	-۰/۱۰	-۰/۸۳**
slope	-۰/۰۵	۰/۱۶*	-۰/۰۲	۰/۳۰**	۱/۰۰	-۰/۵۵**	۰/۰۰	-۰/۲۲**
WI	۰/۰۴	-۰/۱۲	۰/۰۸	-۰/۳۲**	-۰/۵۵**	۱/۰۰	۰/۰۲	۰/۲۰*
NDVI	۰/۲۲**	-۰/۰۶	۰/۰۴	-۰/۱۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۱/۰۰	۰/۱۸*
LST	-۰/۰۱	۰/۰۷	-۰/۱۲	-۰/۸۳**	-۰/۲۲**	۰/۲۰*	۰/۱۸*	۱/۰۰

*و**: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

به منظور بررسی چگونگی ارتباط خطی بین پارامترها محیطی با فراوانی کرم‌های خاکزی و همچنین تعیین تاثیرگذارترین پارامترهای محیطی بر فراوانی کرم‌های خاکزی، از آنالیز مولفه‌های اصلی استفاده گردید. نتایج (شکل۱، جدول ۳) نشان دادند که اولین و دومین مولفه اصلی ایجاد شده، به صورت

تجمعی قادر به توجیه حدود ۵۶ درصد از تغییرات هستند. هدایت الکتریکی، کربن آلی، نیتروژن کل و بافت خاک مهم‌ترین پارامترهای خاکی در توجیه واریانس بوده‌اند. همچنین دمای سطح زمین (LST)، شاخص رطوبت (WI) و شاخص پوشش گیاهی (NDVI) از جمله موثرترین پارامترها در فراوانی کرم‌های خاکزی در منطقه مورد مطالعه بوده‌اند.

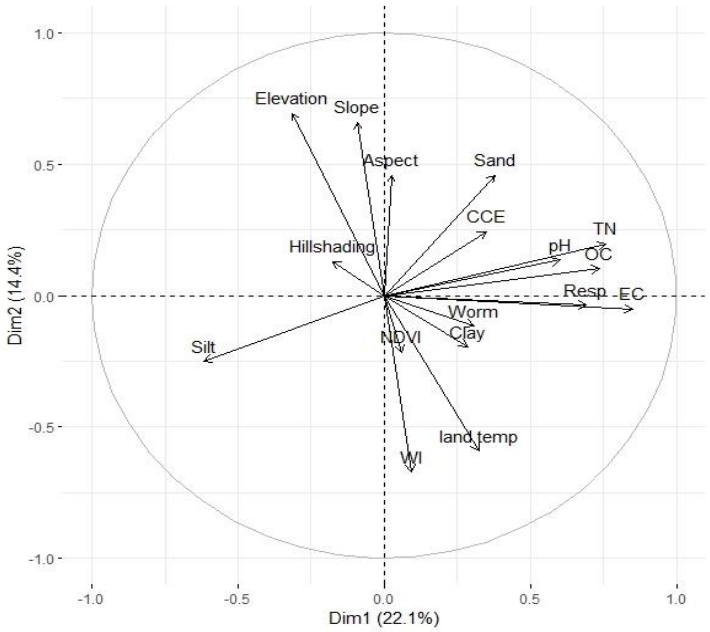
بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان نمود که پارامترهای توپوگرافی و شاخص پوشش گیاهی بدست آمده از تصاویر ماهواره‌ای، می‌توانند به طور معنی‌داری فراوانی کرم‌های خاکزی را تحت تاثیر قرار بدهند. بعلاوه، ویژگی‌های خاک به تنهایی قادر به توجیه و تفسیر تغییرات آن ها نیستند. پانج (۱۹۹۹) بیان کرد که بی‌مهرگان خاکزی مانند کرم‌های خاکی که فعالیت‌هایی مانند حفاری در خاک را انجام می‌دهند، به طور معنی‌داری تحت تاثیر توزیع اندازه ذرات خاک، تراکم خاک، اسیدیته و فشار اکسیژن می‌باشند.

مطالعات مختلفی نشان دادند که عناصر غذایی خاک، کربن و نیتروژن زیست توده میکروبی و تنفس میکروبی از جمله پارامتر هایی در خاک هستند که تحت تاثیر دما و رطوبت خاک می‌باشند (He و همکاران ۲۰۱۶). نهایتا، دما و رطوبت خاک می‌توانند کربن آلی خاک و جانوران خاک را کنترل کنند. جاوهار و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که دما، مقدار کربن آلی و رطوبت خاک می‌توانند به صورت مستقیم بر جانوران خاکزی تاثیر داشته باشند. همچنین آن ها می‌توانند به صورت غیر مستقیم از طریق تاثیر بر ویژگی‌های خاک، پراکنش آن ها را کنترل کنند. علاوه بر این، رطوبت و دما می‌توانند از طریق تاثیر بر منابع غذایی پراکنش آنها در خاک را کنترل کنند. گانگالسکی و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فرآیندهای تغذیه‌ای جانوران خاکزی مرتبط با رطوبت و دما می‌باشد. گیاهان به طور مستقیم از طریق کمیت و کیفیت لاشبرگ و ترشحات و بقایای ریشه‌ای بر پراکنش، فراوانی و تنوع جانوران خاکزی تاثیر می‌گذارند. همچنین گیاهان به طور غیر مستقیم از طریق تاثیر بردمای خاک، رطوبت، هدایت الکتریکی ، اسیدیته، کربن آلی و نیتروژن خاک پراکنش، فراوانی و تنوع آن ها را کنترل می‌کنند.

علاوه بر این، با توجه به آن که فراوانی کرم‌های خاکزی مرتبط با شرایط محیطی ایجاد شده حاصل از اثر متقابل بین ویژگی‌های خاک، رطوبت خاک و دمای سطح زمین می‌باشد. می‌توان خلاصه نمود که این اثرات متقابل تغییرات پیچیده‌ای در پارامترهای محیطی ایجاد می‌کنند. از این رو برای بررسی دقیق روابط و فراوانی کرم‌های خاکزی نیاز به مدل‌های غیر خطی و پیشرفته‌تر می‌باشد.

جدول ۳- نتایج آنالیز مولفه‌های اصلی برای مولفه‌های اصلی مهم

PCA	واریانس	واریانس توجیه شده٪	واریانس تجمعی٪
PC1	۳/۶۳	۳۶/۳۰	۳۶/۳۰
PC2	۱/۹۶	۱۹/۶۳	۵۵/۹۳
PC3	۱/۳۴	۱۳/۴۵	۶۹/۳۷
PC4	۱/۰۸	۱۰/۷۷	۸۰/۱۴



شکل ۱. آنالیز مولفه های اصلی مهم‌ترین پارامترها

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که فراوانی کرم‌های خاکزی به طور معنی‌داری تحت تاثیر پارامترهای محیطی می‌باشند. ویژگی‌های خاک شامل هدایت الکتریکی، کربن آلی، نیتروژن کل و تنفس میکروبی همبستگی معنی‌داری با فراوانی کرم‌های خاکزی نشان دادند در حالی که پارامترهای توپوگرافی همبستگی معنی‌داری با فراوانی کرم‌های خاکزی ندارند و تنها شاخص پوشش گیاهی ارتباط مثبت و معنی‌داری با آنها دارند. همچنین نتایج آنالیز مولفه‌های اصلی نشان دادند که پارامترهای توپوگرافی و شاخص پوشش گیاهی بدست آمده از تصاویر ماهواره‌ای، می‌توانند به طور معنی‌داری فراوانی کرم‌های خاکزی را تحت تاثیر قرار بدهند. بعلاوه، ویژگی‌های خاک به تنهایی قادر به توجیه و تفسیر تغییرات آنها نیستند. از آنجایی‌که کربن آلی، نیتروژن و تنفس میکروبی از مهم‌ترین پارامترهای بیان کننده منابع غذایی در دسترس جانداران خاکزی می‌باشند، بنابراین می‌توان خلاصه نمود احتمالا تاثیر پارامترهای توپوگرافی بر فراوانی کرم های خاکی به صورت غیر مستقیم و از طریق تاثیر بر ویژگی‌های خاک می‌باشد.

منابع

1. Abegaz, A. and Adugna, A. 2015. Effects of soil depth on the dynamics of selected soil properties among the highlands resources of Northeast Wollega, Ethiopia: are these sign of degradation? Solid Earth Discuss. 7: 2011–2035.
2. Bardgett, R. D., Herrick, J. E., Six, J., Jones, T. H., Strong, D. R. and Putten, W. H. van der. 2013. Soil Ecology and Ecosystem Services. (Wall, D. H. (Ed.)). oxford university press.
3. Baretta, D., Luise, M., Bartz, C., Fachini, I., Anselmi, R., Zortéa, T., Duarte, C. R. and Baretta, M. 2014. Soil fauna and its relation with environmental variables in soil management systems. Rev. Ciência Agronômica 45: 871–879.
4. Coblentz, D. D. and Riitters, K. H. 2004. Topographic controls on the regional-scale biodiversity of the south-western USA. J. Biogeogr. 31: 1125–1138.
5. Dunxiao, H., Chunru, H., Yaling, X., Banwang, H., Liyuan, H. and Paoletti, M. G. 1999. Relationship between soil arthropods and soil properties in a suburb of Qianjiang City, Hubei, China. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 18: 467–473. 6. Gongalsky, K. B., Persson, T. and Pokarzhevskii, A. D. 2008. Effects of soil temperature and moisture on the feeding activity of soil animals as determined by the bait-lamina test. Appl. Soil Ecol. 39: 84–90.
7. He, X., Hou, E., Liu, Y. and Wen, D. 2016. Altitudinal patterns and controls of plant and soil nutrient concentrations and stoichiometry in subtropical China. Sci. Rep. 6: 24261.
8. Jawaheer, Z., Singh, H. and Ganeshan, S. 2015. Effect of Soil Parameters on the Distribution of Soil Fauna from Roadside Trees at Three Elevations in Mauritius. Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res. 04: 1.
9. Mueller, K. E., Eisenhauer, N., Reich, P. B., Hobbie, S. E., Chadwick, O. A., Chorover, J., Dobies, T., Hale, C. M., Jagodziński, A. M., Kałucka, I., Kasprowicz, M., Kieliszewska-Rokicka, B., Modrzyński, J., Roz˙en, A., Skorupski, M., Sobczyk, Ł., Stasińska, M., Trocha, L. K., Weiner, J., Wierzbicka, A. and Oleksyn, J. 2016. Light, earthworms, and soil

resources as predictors of diversity of 10 soil invertebrate groups across monocultures of 14 tree species. Soil Biol. Biochem. 92: 184–198.

10. Mujinya, B. B., Mees, F., Boeckx, P., Bodé, S., Baert, G., Erens, H., Delefortrie, S., Verdoodt, A., Ngongo, M. and Van Ranst, E. 2011. The origin of carbonates in termite mounds of the Lubumbashi area, D.R. Congo. Geoderma 165: 95–105.
11. Muys, B. and Lust, N. 1992. Inventory of the earthworm communities and the state of litter decomposition in the forests of Flanders, Belgium, and its implications for forest management. Soil Biol. Biochem. 24: 1677–1681.
12. Ponge, J.-F. 1999. Interaction between soil fauna and their environment. In: Going underground: ecological studies in forest soils. Research Signpost. pp. 45–76.
13. Şandor, V., Vidican, R., Stoian, V., Sfechiş, S. and Pustai, P. M. 2015. The effect of soil fauna and fertilizers on soil respiration. Res. J. Agric. Sci. 47: 194–199.
14. Stenchly, K., Dao, J., Lompo, D. J.-P. and Buerkert, A. 2017. Effects of waste water irrigation on soil properties and soil fauna of spinach fields in a West African urban vegetable production system. Environ. Pollut. 222: 58–63.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The effect of environmental parameters on the frequency of soil worms

Tajik[*1], S., Ayoubi[2], Sh.

[1] Ph. D., Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran,
[2] Prof., Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran,

Abstract

Soil invertebrates like earthworms play an important role in the nutritional cycle and sustainability of the ecosystem by facilitating the process of decomposition of organic matter and debris of roots and litters, improving the fertility and physical structure of the soil. The aim of this study was to investigate the effect of environmental parameters on the frequency of soil worms in forest lands in the Shast Kalateh area of Golestan province. Systematic random sampling was carried out at 153 point from 0 to 10 cm depth by a metal frame with dimensions 10 × 10 × 10 cm. The results of this study showed that the frequency of soil worms is significantly affected by environmental parameters. Soil properties including electrical conductivity, organic carbon, total nitrogen and microbial respiration indices obtained from satellite images can significantly affect the amount of soil worms. The effect of topographic parameters on the frequency of soil worms probably is nonlinear, which is suggested to be further investigated in future studies.

Keywords: Soil properties, topographic parameters, correlation, principal component analysis.

[*] Corresponding author, Email: samaneh10941@yahoo.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

پاسخ زراعی کشت تاخیری پنبه به کودهای زیستی و سطوح مختلف نیتروژن

عبدالرضا قرنجیکی[۱*]، علیرضا فلاح نصرت آباد[۲]

[۱] استادیار موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

[۲] دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

نیتروژن مهم‌ترین عنصر محدود کننده تولید محصول است. کودهای زیستی حاوی *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* به‌علت توان تثبیت غیرهمزیستی نیتروژن و بهبود رشد گیاه و تولید محصول، در کشاورزی بسیار مورد توجه هستند. به‌منظور بررسی تاثیر نیتروژن و این باکتری‌ها بر عملکرد و اجزای عملکرد کشت تاخیری پنبه رقم گلستان، آزمایشی مزرعه‌ای با چهار سطح کود نیتروژن (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ کیلوگرم در هکتار) و چهار سطح این باکتری‌ها (بدون تلقیح، *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم* و تلفیق *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم*) اجرا گردید. براساس نتایج، تاثیر کود نیتروژن بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه معنی‌دار بود، در حالی که هیچ پاسخی نسبت به تلقیح باکتری‌ها و اثر متقابل آنها مشاهده نشد. بیشترین تعداد غوزه در بوته با تیمار کودی ۹۰ به‌دست آمد که اختلاف آن نسبت به تیمار صفر نیتروژن معنی‌دار بود. با افزایش کود نیتروژن، عملکرد و درصد نیتروژن برگ افزایش یافت به‌طوری که تیمار کودی ۹۰ اختلاف معنی‌داری نسبت به سطوح کودی صفر و ۳۰ نشان داد. به‌طور خلاصه، برای کشت تاخیری پنبه رقم گلستان با عملکرد قابل انتظار حدود ۲ تن در هکتار، به حداقل ۶۰ و حداکثر ۹۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن مورد نیاز است که به‌طور متوسط مقدار ۷۵ کیلوگرم در هکتار توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *ازتوباکتر*، *آزوسپیریلوم*، رقم پنبه گلستان

مقدمه

ناحیه ریزوسفر گیاه که لایه نازکی از خاک پیرامون ریشه می‌باشد، به‌دلیل فعالیت و ترشحات ریشه‌ای، سرشار از عناصر غذایی است. لذا خواص کمی و کیفی جامعه میکروبی آن تفاوت بسیار زیادی با توده خاک غیرریزوسفری دارد. باکتری‌های ناحیه ریزوسفر که ریزوباکتر نام دارند، می‌توانند گیاه میزبان خود را تحت تاثیر قرار دهند. گروهی از این باکتری‌ها را که اثرات مثبتی بر رشد گیاه دارند، اصطلاحاً ریزوباکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) یا به‌طور خلاصه PGPR نامیده می‌شوند (Siddiqui, 2005).

یکی از ویژگی‌های اصلی باکتری‌های PGPR، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در خاک است (Ahemed and Kibret, 2014). *آزوسپیریلوم* (*Azospirillum*) و *ازتوباکتر* (*Azotobacter*) از شناخته‌شده‌ترین باکتری‌های PGPR هستند که اثر مثبت آنها بر رشد و عملکرد گیاه در آزمایشات زیادی مشاهده شده است (Anjum و همکاران، ۲۰۰۷). ثابت شده است که این باکتری‌ها می‌توانند با سنتز انواع ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و هورمون‌های محرک رشد مثل ایندول استیک اسید، جبرلین و سیتوکنین، باعث افزایش جوانه‌زنی بذر، بهبود ریشه‌زایی و گسترش ریشه‌ها، توسعه بهتر برگ‌ها و نهایتاً رشد و نمو بهتر گیاه و افزایش کیفیت محصول شوند (Ahemed and Kibret, 2014). همچنین، این باکتری‌ها توان تثبیت نیتروژن هوا را از طریق همیاری غیرهمزیستی (*آزوسپریلوم*) و به‌صورت آزاد (*ازتوباکتر*) دارند (Saharan and Nehra, 2011).

گزارش‌های متعددی درباره تاثیر مثبت باکتری‌های *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* بر رشد و عملکرد غلات، بقولات و سایر گیاهان زراعی وجود دارد (Saharan and Nehra, 2011; Ahemed and Kibret, 2014). گونه‌های مختلف *آزوسپیریلوم* علاوه بر افزایش ماده خشک، باعث کاهش خسارت عوامل قارچی در پنبه شدند (Bashan, 1998). Anjum و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد بر روی پنبه را با سه سطح مختلف کود نیتروژن مورد آزمایش قرار داده و افزایش عملکرد، ارتفاع بوته و جمعیت باکتری خاک را گزارش کردند. Hafeez و همکاران (۲۰۰۴) سبز کردن سریع‌تر

* ایمیل نویسنده مسئول: agharanjiki@yahoo.com

گیاهچه‌های پنبه بر اثر تلقیح بذر با *ازتوباکتر* را گزارش کردند و ترشح ایندول استیک اسید توسط این باکتری را در پاسخ مؤثر دانسته‌اند. با اینکه درباره تاثیر جداگانه هر یک از این باکتری بر رشد و عملکرد گیاه نتایج مثبت زیادی وجود دارد (Saharan and Nehra, 2011)، با این حال، نتایج بعضی مطالعات نشان داده است که ترکیب باکتری‌های *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* نتایج بهتری دارد (Naderifar and Daneshian, 2012). به همین علت، امروزه در بیشتر کشورها از ترکیب این دو باکتری در فرمولاسیون کود بیولوژیک استفاده می‌شود (Saharan and Nehra, 2011).

نتایج تحقیقی درباره تاثیر تلقیح بذر پنبه توسط باکتری‌های *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه در تاریخ کشت معمول پنبه در ایستگاه تحقیقات پنبه هاشم آباد گرگان (استان گلستان) نشان داد که این باکتری‌ها منجر به افزایش معنی‌دار وزن غوزه، تعداد غوزه در بوته و عملکرد پنبه گردید (قرنجیکی و بهادری، ۱۳۹۷). در تحقیق حاضر، تاثیر این باکتری‌ها بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه در کشت تاخیری (کشت دوم پنبه که بلافاصله بعد از برداشت گندم، کشت پنبه انجام شد)، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۱۳۹۴ در ایستگاه تحقیقات پنبه هاشم آباد واقع در ۱۱ کیلومتری شمال غربی شهرستان گرگان با طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۱ دقیقه شمالی با ارتفاع متوسط ۱۴ متر از سطح آزاد دریا، متوسط بارندگی سالیانه ۴۵۰-۵۵۰ میلی‌متر، رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد، متوسط حداکثر حرارت ۴۲ درجه سانتی گراد اجرا گردید. کشت پنبه بلافاصله بعد از برداشت گندم انجام شد (کشت دوم یا کشت تاخیری). بدین منظور، بعد از برداشت محصول اول (گندم)، زمین شخم و دیسک زده شده و بستر کشت آماده گردید. قبل از کشت، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری قطعه آزمایشی، نمونه مرکب خاک تهیه شده و جهت آزمون خاک به آزمایشگاه ارسال گردید.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۴×۴ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به اجرا درآمد. هر کرت آزمایشی شامل ۶ ردیف کاشت به‌فواصل ۸۰ سانتی‌متر، طول ۶ متر و فاصله بوته روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر بود. رقم پنبه مورد استفاده برای کشت، رقم تجاری گلستان بود. فاکتور اول کود نیتروژن (N_2) بود که در چهار سطح صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ کیلوگرم در هکتار از منبع اوره اعمال شد. فاکتور دوم نیز شامل سطوح مختلف تلقیح بذر پنبه با باکتری‌های ۱- *ازتوباکتر* (*Azotobacter*)، ۲- *آزوسپیریلیوم* (*Azospirillum*) ۳- تلفیق این دو باکتری (به‌نسبت مساوی از مایه تلقیح) و ۴- تیمار شاهد (بدون تلقیح بذر) بود. باکتری‌ها از از بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شدند. برای تلقیح بذر با باکتری، ابتدا مقدار کافی از بذر با محلول شکر در آب با غلظت ۲ درصد مرطوب شده و سپس با مایه تلقیح (حداقل 10^8 باکتری در گرم) آغشته شدند. بعد از تلقیح، بذور حدود یک ساعت در سایه خشک و سپس کشت گردید. عملیات آماده‌سازی زمین در اواخر خرداد ماه و پس از برداشت گندم انجام شد. تمام کود فسفر مورد نیاز (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و نصف کود نیتروژن (متناسب با تیمار کودی) قبل از کشت به خاک اضافه و با دیسک مخلوط گردید. از علفکش پیش رویشی ترفلان برای کنترل علف‌های هرز استفاده گردید. سایر عملیات زراعی از قبیل تنک کردن بوته‌ها، وجین علف‌های هرز و مبارزه با آفات بر حسب نظر کارشناسی اعمال گردید. محصول پنبه (وش) در دو چین برداشت شد. برای اندازه‌گیری عملکرد و اجزای عملکرد از دو خط وسط هر تیمار استفاده شد. در زمان برداشت اول، تعداد ۵ بوته به طور تصادفی انتخاب و میانگین ارتفاع بوته و تعداد غوزه آنها یادداشت گردید. همچنین، تعداد ۲۰ غوزه به طور تصادفی برداشت و میانگین وزن آنها ثبت شد. زودرسی محصول بر اساس عملکرد چین اول به عملکرد کل محاسبه گردید. قبل از گلدهی، به‌تعداد ۳۰-۲۵ عدد آخرین برگ کامل (برگ چهارم یا پنجم از قسمت انتهای بوته) تهیه و جهت تعیین غلظت نیتروژن با کجلدال به آزمایشگاه ارسال گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها به‌روش LSD و در سطح ۵٪ انجام شد.



شکل ۱. نمایی از یک کرت آزمایشی در مراحل اولیه رشد پنبه

نتایج و بحث

نتایج مربوط به برخی از ویژگی‌های خاک در جدول (۱) ارائه گردیده است. بر این اساس، خاک محل اجرای آزمایش دارای بافت نیمه سنگین و غیرشور، ماده آلی در حد متوسط و اسیدیته آن نیز کمی قلیایی بود. همچنین، این خاک از نظر پتاسیم قابل استفاده گیاه هیچ محدودیتی نداشته و فسفر قابل استفاده آن نیز در حد متوسط بود.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

بافت خاک	شن (در صد)	سیلت (در صد)	رس (در صد)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	پ.هاش	کربن آلی (در صد)	فسفر قابل استفاده (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	پتاسیم قابل استفاده (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
لوم رس سیلتی	۱۶	۵۴	۳۰	۱/۲۷	۷/۹	۱/۲۸	۹/۷	۴۷۵

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲)، تاثیر سطوح مختلف کود نیتروژن بر تعداد غوزه در بوته، عملکرد چین اول، عملکرد کل، درصد زودرسی و نیتروژن برگ معنی‌دار بود، اما باکتری‌ها و اثر متقابل این دو عامل تاثیر معنی‌داری بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه نداشت.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس عملکرد و اجزای عملکرد پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع	تعداد غوزه در بوته	وزن تک غوزه	عملکرد چین اول	عملکرد کل	درصد زودرسی	درصد نیتروژن برگ
تکرار (بلوک)	۲	۴۶۶ *	۳/۲۵۲ ns	۰/۲۶۰ ns	۵۱۰۹۶ ns	۲۵۱۸۹۰ ns	۶۰/۶ ns	۰/۰۵۱ ns
کود نیتروژن A	۳	۸۵/۰ ns	۳۱/۸ **	۰/۱۷۹ ns	۵۷۸۵۹۳ **	۵۹۵۰۲۴ *	۲۶۳ *	۰/۷۰۳ *
باکتری B	۳	۱۲/۷ ns	۲/۵۲ ns	۰/۳۱۴ ns	۶۳۴۹۷ ns	۵۲۹۷۳ ns	۱۶۵ ns	۰/۲۶۳ ns
A×B	۹	۱۵/۸ ns	۲/۱۰ ns	۰/۱۶۱ ns	۶۷۳۵۹ ns	۱۱۸۱۸۸ ns	۴۳/۲ ns	۰/۰۴۵ ns
خطا	۳۰	۱۱۸	۶/۲۶	۰/۲۹۶	۷۹۹۸۳	۱۶۳۵۲۰	۶۷/۳	۰/۲۱۷
ضریب تغییرات	-	۱۵/۷	۱۹/۴	۱۰/۶	۲۱/۸	۲۱/۱	۱۲/۰	۱۷/۵

* و** به‌ترتیب دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳)، مصرف کود نیتروژن منجر به افزایش معنی‌دار تعداد غوزه گردید، اما با اینکه بیشترین تعداد غوزه با مصرف بالاترین سطح کودی (۹۰ کیلوگرم در هکتار) به‌دست آمد، اما اختلاف آن نسبت به سطوح کودی ۳۰ و ۶۰ کیلوگرم در هکتار معنی‌دار نبود. افزایش تعداد غوزه بالاترین سطح کودی نیتروژن نسبت به تیمار شاهد (بدون مصرف کود نیتروژن) در حدود ۳۷ درصد بود.

با افزایش کود نیتروژن مصرفی، عملکرد چین اول و عملکرد کل پنبه نیز افزایش یافت به‌طوری که بیشترین محصول با تیمار کودی ۹۰ کیلوگرم در هکتار به‌دست آمد. اختلاف عملکرد کل این تیمار نسبت به سطوح کودی شاهد و ۳۰ کیلوگرم در هکتار معنی‌دار بود. افزایش محصول در سطوح کودی ۳۰ و ۶۰ کیلوگرم در هکتار نیز نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف کود نیتروژن بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه

سطوح کود نیتروژن (کیلوگرم در هکتار)	تعداد غوزه در بوته	عملکرد چین اول (کیلوگرم بر هکتار)	عملکرد کل (کیلوگرم بر هکتار)	زودرسی (درصد)	نیتروژن برگ (درصد)
صفر	۱۰/۶۴ b	۱۰۳۲ c	۱۶۸۰ b	۶۱/۱ b	۲/۴۰ b
۳۰	۱۳/۲۶ ab	۱۲۸۱ b	۱۸۵۶ b	۶۹/۶ a	۲/۵۸ b
۶۰	۱۳/۰۲ ab	۱۳۲۰ b	۱۹۰۱ ab	۷۰/۷ a	۲/۷۲ ab
۹۰	۱۴/۵۵ a	۱۵۶۹ a	۲۲۱۵ a	۷۰/۸ a	۲/۹۸ a

- اعداد هر ستون که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

در این تحقیق، مصرف کود نیتروژن منجر به افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته، تعداد غوزه در بوته، عملکرد، زودرسی محصول و غلظت نیتروژن برگ گردید. نیتروژن عنصر مهم و کلیدی برای گیاه است. بنابراین کمبود آن در گیاه منجر به کاهش رشد و تولید محصول خواهد شد (Ahemed and Kibret, 2014). توصیه کودی مناسب نیتروژن برای زراعت و تولید پنبه تابع عوامل متعددی مثل رقم، شرایط اقلیمی، تاریخ کاشت و ... بوده و در مناطق و خاک‌های مختلف متفاوت است (Silvertooth و همکاران، ۱۹۹۲). در این تحقیق، با اینکه بین مقادیر کودی ۶۰ و ۹۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما افزایش محصول تیمار کودی ۹۰ نسبت به ۶۰ (۳۱۴ کیلوگرم در هکتار) با توجه به ارزش اقتصادی هر کیلوگرم محصول پنبه قابل توجه بود. بنابراین، توصیه کودی مناسب نیتروژن برای کشت دوم پنبه رقم گلستان بین ۶۰ تا ۹۰ کیلوگرم در هکتار برآورد می‌شود که به‌طور متوسط، می‌توان ۷۵ کیلوگرم در هکتار را توصیه نمود. مقدار بهینه مصرف کود نیتروژن در مناطق پنبه‌کاری استرالیا، آمریکا، چین و مصر بین ۱۰۰ تا ۲۱۵ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (silvertooth و همکاران، ۱۹۹۲). Anjum و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی سطوح مختلف کود نیتروژن بر عملکرد پنبه رقم MNH-552 گزارش کردند که کود نیتروژن منجر به افزایش معنی‌دار محصول پنبه شده و بیشترین محصول (۲۸۵۵ کیلوگرم در هکتار) با مصرف ۱۱۲ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن به‌دست آمده است.

با اینکه گزارش‌های متعددی درباره تاثیر معنی‌دار کودهای زیستی *ازتو* باکتر و *آزوسپریلیوم* بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه وجود دارد (Anjum و همکاران، ۲۰۰۷؛ Raju و همکاران، ۲۰۰۸)، اما در این آزمایش مزرعه‌ای، عملکرد و اجزای عملکرد پنبه پاسخ معنی‌داری نسبت به این باکتری‌ها نشان نداد. کارایی باکتری‌های PGPR و پاسخ گیاه نسبت به این کودهای زیستی به عوامل مختلفی مثل نوع گیاه، خصوصیات خاک (مثل pH، عناصر معدنی، بافت، دما و رطوبت)، شرایط اقلیمی و عوامل زیستی (مثل رقابت باکتری‌های ریزوسفری) بستگی دارد (Myresiotis و همکاران، ۲۰۱۵؛ Weber و همکاران، ۲۰۱۸). گزارش شده است که نوع جدایه‌های این باکتری‌ها و محل جداسازی آنها نیز بر کارایی‌شان و پاسخ گیاه به تلقیح آنها تاثیرگذار بوده است (Sultana and Kumar Pindi, 2007). در یک آزمایش گلدانی، Egamberdiyeva (2007) پاسخ گیاه ذرت نسبت به باکتری‌های PGPR را در دو خاک مختلف مطالعه نمود. نتایج نشان داد با اینکه تلقیح گیاه با این باکتری‌ها وزن خشک ریشه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد، اما وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه تحت تاثیر معنی‌دار این باکتری‌ها قرار نگرفت. در مطالعاتی که در روسیه، اروپای شرقی و هندوستان انجام شده است، به‌طور میانگین در کمتر از ۳۵ درصد موارد، عملکرد گیاه تحت تاثیر کاربرد باکتری‌های PGPR قرار گرفته است. همچنین، در تحقیقاتی که محققین روسی در مناطق مختلف انجام داده‌اند، فقط در ۸ آزمایش از مجموع ۲۳ آزمایش، افزایش محسوس عملکرد گیاه را مشاهده کرده‌اند. به‌همین دلایل، این باکتری‌ها تاکنون نتوانسته‌اند همانند ریزوبیوم‌ها در لگوم‌ها، جایگزین مطمئنی برای کود نیتروژن باشند (خسروی، ۱۳۹۳).

نتیجه‌گیری

عملکرد پنبه در کشت تاخیری به‌علت محدود شدن دوره رشد و نمو گیاه، کمتر از کشت معمول آن است. بنابراین طبیعی است که نیاز به کودهای شیمیایی نیز در این نوع کشت کمتر خواهد بود. نتایج این تحقیق نشان داد که برای کشت تاخیری پنبه رقم گلستان با عملکرد قابل انتظار حدود ۲ تن در هکتار، به حداقل ۶۰ و حداکثر ۹۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن مورد نیاز است. که به‌طور متوسط مقدار ۷۵ کیلوگرم در هکتار توصیه می‌شود. همچنین، عملکرد و اجزای عملکرد پنبه رقم گلستان در کشت تاخیری آن، عکس‌العمل معنی‌داری به تلقیح بذر با باکتری‌های *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* نشان نداد. به‌نظر می‌رسد که شرایط محیطی یا توان رقابت این باکتری‌ها برای فعالیت و اثرگذاری آنها در این نوع کشت پنبه فراهم نیست.

با این‌حال، پیشنهاد می‌شود که این باکتری‌ها و یا سایر باکتری‌های PGPR در مناطق، شرایط و سال‌های دیگر نیز در کشت تاخیری پنبه مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین لازم است که تاثیر این باکتری‌ها در ارقام تجاری پنبه دیگر نیز بررسی شود.

منابع

خسروی، ه. ۱۳۹۳. کاربرد کودهای زیستی حاوی ریزجانداران آزادزی تثبیت کننده نیتروژن در کشاورزی. نشریه مدیریت اراضی، ۲ (۲)، ۱۶۰-۱۴۹.

قرنجیکی، ع. و بهادری، م. ۱۳۹۷. پاسخ زراعی پنبه به باکتری‌های تحریک کننده رشد و سطوح مختلف نیتروژن. مجموعه مقالات اولین همایش ملی علوم کشاورزی و زیست محیطی ایران. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دهم بهمن ماه.

Ahemed, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science, 26, 1-20.

Anjum, M. A., Sajjad, M. R., Akhtar, N., Qureshi, M. A., Jami, A. R. and Hasan, M. 2007. Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen. Journal of Agricultural Research, 45(2), 135-143.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances, 16, 729-770.

Egamberdieva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. Applied Soil Ecology, 36(2-3), 184-189.

Hafeez, F. Y., Safdar, M. E., Chaudhry, A. U. and Malik, K. A.. 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44(6), 617-622.

Myresiotis, C., Vryzas, Z. and Papadopoulou-Mourkidou, E. 2014. Effect of specific plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. Pest Management Science, 71(9), 1258-1266.

Naderifar, M. and Daneshian, J. 2012. Effect of seed inoculation with *Azotobacter* and *Azospirillum* and different nitrogen levels on yield and yield components of canola (*Brassica napus* L.). Iranian Journal of Plant Physiology, 3(1), 619-626.

Raju, A. R., Meshram, M. K., Chakraborty, M., Singh, J. V., Majumdar, G. and Uma, B. 2008. *Azotobacter* and *Azospirillum* in integrated nutrient management of hybrid cotton. Journal of Soils and Crops, 15(1), 245-250.

Saharan, B. S. and Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Science and Medical Research, 21, 1-30.

Siddiqui, Z. A. 2005. PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer, Dordrecht, 318p.

Silvertooth, J. C., Malavolta, E., Yun-hi, L., Momtaz, A. and Singh, M. 1992. Cotton. In: World fertilizer use manual, Wichman, W., Eds., International Fertilizer Industry Association (IFA). Paris, 457-471.

Sultana, T. and Kumar Pindi, P. 2013. Assessment of PGPR bacteria of cotton fields. International Journal of Agricultural Science and Research, 3(1), 207-2016.

Weber, N. F., Herrmann, I., Hochholdinger, F., Ludewig, U. and Neumann, G. 2018. PGPR-induced growth stimulation and nutrient acquisition in maize: do root hairs matter?, Scientia Agriculturae Bohemica, 49(3), 164-172.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Agronomic response of late-planted cotton to biofertilizers and various levels of nitrogen

Gharanjiki[*1], A. Fallah Nosrat-abad[2], A.

[1] Assistant Prof., Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
[2] Associate Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Nitrogen (N) is the most important element for crop production. *Azotobacter* and *Azospirillum* biofertilizers have been given much attention in agriculture due to non-symbiotic N fixation and improve plant growth and crop production. In order to investigate the effect of N and these biofertilizers on yield and yield components of late-planted cotton *cv.* Golestan, a field experiment was conducted with four levels of N fertilizer (0, 30, 60 and 90 kg ha^{-1}) and four levels of biofrtilizers (no inoculation, *Azotobacter*, *Azospirillum* and a combination of *Azotobacter* and *Azospirillum*). Basis on results, the effect of N fertilizer was significant on yield and yield components of cotton, whereas there was not observed any response to biofertilizers inoculation and their interaction effect. Fertilizer treatment 90, which produced the most boll number per plant, was significant its difference to treatment N0. Increasing N level enhanced yield and leaf N percent of cotton, so that fertilizer treatment 90 showed significantly difference to fertilizer treatments 0 and 90. In summary, it is required at least 60 and maximum 90 kg ha^{-1} N fertilizer, with an average of 75 kg ha^{-1} for late-planted cotton *cv.* Golestan, with expected yield of about 2 tons per hectare.

Keywords: *Azotobacter*, *Azospirillum*, Cotton *cv.* Golestan

[*] Corresponding author, Email: agharanjiki@yahoo.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

مطالعه اسپور قارچ‌های اندومیکوریز همزیست با چند گونه گیاه غیر زراعی دایمی و علفی

فاطمه افتخاری*[۱]، مهدی سرچشمه پور[۲]، سید منصور میرتاج الدینی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[۲] استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[۳] استادیار گروه علوم زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

امروزه تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده مخرب است که تولید محصولات کشاورزی را در سراسر دنیا تحت تاثیر قرار داده است. قارچ‌های میکوریز از طریق مکانیسم‌های متعددی می‌توانند اثرات سوء تنش خشکی را تعدیل کرده و باعث افزایش تحمل گیاه به خشکی و بهبود عملکرد آن شوند. پژوهش حاضر با هدف مطالعه وضعیت میکوریزی مهم‌ترین گیاهان غیرزراعی و دایمی در استان کرمان انجام شده است. ابتدا از ریزوسفر سه گروه گیاهان علفی ریزوم‌دار،گیاهان علفی بدون‌ریزوم و گیاهان دایمی که فراوانی بیشتری در سطح شهرستان‌های استان کرمان داشتند، نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شدند. همزمان نمونه گیاه نیز تهیه و از نظر گیاهشناسی نیز مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از نظر درصد کلنیزاسیون و تعداد اسپور مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس و میانگین‌ها مورد مقایسه آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد اسپور گیاهان تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارد و بیشترین میانگین تعداد اسپور به‌ترتیب مربوط به گیاهان علفی ریزوم‌دار و سپس دایمی و گیاهان علفی بدون ریزوم می‌باشد.

کلمات کلیدی: قارچ میکوریز، مناطق خشک، کرمان

مقدمه

بخش عمده‌ای از کشور ایران در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته و متوسط بارندگی سالانه در بیشتر مناطق پایین‌تر از نیاز گیاهان زراعی می‌باشد. محدودیت اصلی رشد گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، کمبود رطوبت و عناصر غذایی به ویژه فسفر است و قارچ‌های میکوریز می‌توانند به افزایش جذب آب و عناصر غذایی (خصوصاً فسفر) و نهایتاً به بهبود رشد و بقاء گیاهان کمک کنند (Smith and Read, 2008). اگرچه قارچ‌های میکوریز-آربوسکولار قادر به ایجاد همزیستی در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی میزبان هستند، اثر این رابطه با توجه به قارچ میکوریزی و گیاه میزبان متفاوت است. گونه‌های گیاهی از نظر میزان وابستگی و آلودگی میکوریزی متفاوت هستند (Ronsheim and Anderson, 2001). فراوانی همزیستی اندومیکوریز به عوامل مختلفی همانند عوامل خاکی، وضعیت رشدی گیاه، عوامل محیطی از جمله دما و فصل بستگی دارد. قارچ‌های میکوریز ضمن ورود به ریشه گیاه، هیف‌های خود را در خاک اطراف ریشه گسترش می‌دهند و ضمن انتقال آب و عناصر معدنی به گیاه، در مقابل از گیاه کربن دریافت می‌کنند (Kabir et al., 1997). تراکم اسپور و غنای قارچ با تبدیل زمین‌های طبیعی به کشاورزی کاهش می‌یابد که از عمده‌ترین دلایل آن استفاده از کودهای شیمیایی است، میزان اسپور در خاک‌های بدون خاکورزی بیشتر از خاک-های تحت خاکورزی است. Oehl و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه تنوع و بیوگرافی قارچ‌های میکوریز در خاک‌های کشاورزی، دریافتند که تنوع قارچ-های میکوریز به شدت تحت تاثیر آب و هوا، شدت استفاده از زمین و پارامترهای خاک است. در این مطالعه تنوع قارچ میکوریز به دلیل استفاده از زمین‌های کشاورزی به خصوص در مناطق معتدل و دیگر مناطق آب و هوایی کاهش یافت و مشخص شد که تنوع گونه‌ها به پارامترهای خاک وابسته است. در این پژوهش بیشترین تنوع متعلق به راسته *Glomerales* بود و تعداد اسپورها در چمنزارها بیشتر از مزرعه بود و همبستگی مثبتی بین pH خاک و فراوانی اسپور و همچنین بین ارتفاع از سطح دریا و شیب‌های مختلف وجود داشت. در تحقیقی که Abdelhalim و همکاران در سال ۲۰۱۳ ترکیب گونه‌ها و تنوع قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را در ۱۳ محصول مورد بررسی قرار دارند، بین تراکم اسپور قارچ میکوریز در خاک و میزان کلنیزاسیون ریشه همبستگی وجود نداشت و در مجموع ۱۷۴۵ اسپور شناسایی شد که مربوط به ۴۲ گونه و ۸ خانواده و ۱۲ جنس بودند و بیشترین آن‌ها مربوط به خانواده *Glomeraceae* بودند. بالاترین تراکم اسپور در سورگوم، پیاز و موز و کمترین در یونجه ثبت شد و راسته *Gigasporales* یافت نشد که می‌تواند به دلیل اختلال خاک در ارتباط با شیوه‌های کشت (شخم یا باروری بلند مدت) باشد. گونه *Glomus* در میان گونه‌های دیگر در مناطق گرمسیری از فراوانی بیشتری برخوردار بود. با توجه به تنوع گونه‌های گیاهی در استان کرمان و شرایط

* ایمیل نویسنده مسئول: f.eftekhari9272@gmail.com

خشک و نیمه‌خشک حاکم بر اکثر مناطق، مطالعه وضعیت همزیستی گیاهان با میکوریزا در اکوسیستم‌های طبیعی در نقاط مختلف استان کرمان دارای اهمیت قابل توجهی است. در این پژوهش وضعیت همزیستی میکوریزایی گیاهان غیرزراعی غالب مناطق بافت، بم، رفسنجان و زرند (چهار جهت مختلف استان) از نظر تعداد اسپور قارچ‌های میکوریزی و در موارد ممکن، درصد کلنیزاسیون ریشه گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: ابتدا تعداد ۵ گیاه دایمی و ۶ گیاه علفی استان کرمان را که از توزیع و پراکندگی کافی برخوردار بودند، انتخاب و سپس نمونه‌برداری مرکب در فصل رشد فعال آن‌ها از ریزوسفر گیاه انجام شد. نمونه‌برداری از نقاط (جهات) مختلف استان (به عنوان تکرار) به نحوی بود که هر گیاه حداقل دارای پنج نمونه متفاوت باشد. همزمان از اندام‌های هوایی گیاهان مورد نظر نیز برای شناسایی جنس و گونه، نمونه‌بردرای شد. نمونه‌های مورد مطالعه در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل و در شرایط مناسب نگهداری شدند.

شمارش اسپورهای قارچ‌های میکوریز-آربوسکولار:

در این مرحله نمونه‌ها از نظر وضعیت کلنیزاسیون و تعداد اسپور قارچ مورد بررسی اولیه قرار گرفته و در نهایت تعداد اسپور در ۱۰۰ گرم خاک تعیین شد. در این روش ابتدا اسپور قارچ‌های میکوریز به روش غربال مرطوب از خاک اطراف ریشه جدا و با میکروسکوپ تشریحی دوچشمی شمارش شد. بدین منظور از هر نمونه خاک یک نمونه مرکب ۱۰۰ گرمی جدا و در یک مخلوط کن ریخته شد و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و مخلوط به صورت سوسپانسیون درآمد. پس از یک دقیقه هم‌زدن با هم‌زن برقی، از الک‌های۴۰۰، ۱۲۰، ۳۵ مش عبور داده شد و محتویات الک‌های ۴۰۰، ۱۲۰ مش جمع‌آوری شد و به طور مساوی در دو لوله سانتریفیوژ داخل محلول ساکارز ۲/۵ مولار شناور شدند. نمونه‌ها در ۲۷۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی که حاوی اسپور بود، روی الک ۴۰۰ ریخته شد و داخل یک پتری‌دیش جمع‌آوری و با میکروسکوپ تشریحی دوچشمی شمارش گردید و میانگین اسپورهای مربوط بدست آمد(Jansa, 2002). داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار SAS تجزیه واریانس شدند و میانگین‌ها به روش دانکن مورد مقایسه آماری قرار گرفت و نمودارها با نرم افزار Excle و Past رسم گردید. نمودار درختی گروه‌های گیاهی نیز با استفاده از نرم افزار Past (روش Ward) رسم گردید.

مطالعه درصد همزیستی میکوریز ریشه‌ها:

در این مرحله نمونه‌ها از نظر درصد کلنیزاسیون میکوریزی مورد بررسی اولیه قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا ریشه گیاهان را در قطعات ۱سانتیمتری بریده و بر اساس(Koske and Gemma, 1989) رنگ‌آمیزی شدند. بررسی وجود و عدم وجود همزیستی میکوریزی در هر قطعه ریشه توسط میکروسکوپ نوری صورت می‌گیرد و درصد آن از طریق فرمول زیر بدست می‌آید.

$$\frac{\text{تعداد نمونه حاوی میکوریز}}{\text{تعداد کل نمونه}} * ۱۰۰$$

تهیه اسلاید و عکسبرداری

تمامی اسپورهایی که در نمونه‌ها مشاهد شد با پنس یا سمپلر جداسازی شدند و روی اسلایدهای شیشه‌ای در دو محلول ملزر و pvlg قرار داده شدند. از هر اسلاید توسط میکروسکوپ عکسبرداری مدل Leica icc50 عکسبرداری انجام شد تا توسط افراد متخصص مورد شناسایی نسبی قرار گیرند.

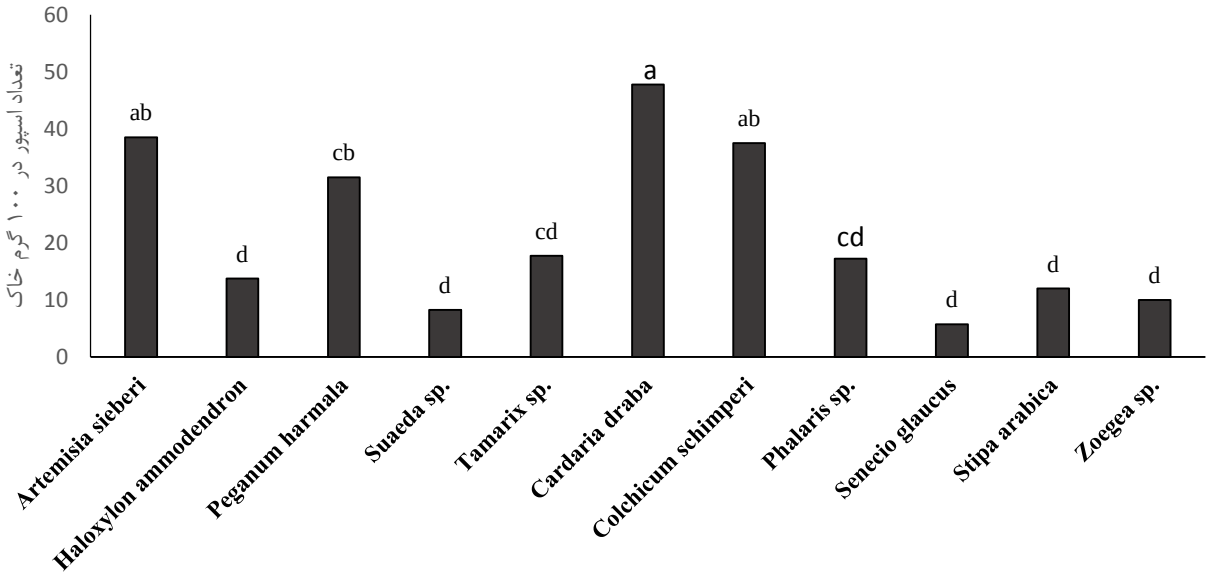
نتایج و بحث

به منظور اطمینان از یکپارچه بودن گیاهان انتخابی، گیاهان از لحاظ گیاه‌شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند و نام علمی و فارسی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده از ریزوسفر گونه‌های مختلف گیاهان دایمی، گیاهان علفی ریزوم‌دار، گیاهان علفی بدون ریزوم، اسپور یافت شد. از آن‌جایی که برای تعیین درصد کلنیزاسیون به ریشه‌های مویین نیاز است، لذا از تعداد کمی از گیاهان که دارای ریشه‌های مویین بودند نمونه‌برداری شد و پس از رنگ آمیزی مشخص شد که گیاه *Senecio glaucus* بیشترین درصد همزیستی را به میزان ۵۵/۵۳ دارد در ضمن این گیاه کمترین میزان اسپور را با میانگین ۵/۷۵ داشت و بنابراین در این مطالعه درصد کلنیزاسیون ارتباط مستقیمی با تعداد اسپور نداشت (Al-Momany and A1-Raddad, 1991) بعد از آن گیاه *Artemisia sieberi* با درصد همزیستی ۵۳/۵۷٪ و میانگین تعداد اسپور ۳۸/۵ و گیاه *Phalaris sp.* با درصد همزیستی ۵۰/۵٪ و میانگین تعداد اسپور ۱۷/۲۵ و گیاه *Tamarix sp.* با درصد همزیستی ۳۹/۲٪ و میانگین تعداد اسپور ۱۷/۷۵ در رده‌های بعدی قرار گرفتند.

جدول ۱- نام علمی و فارسی گیاهان مورد مطالعه

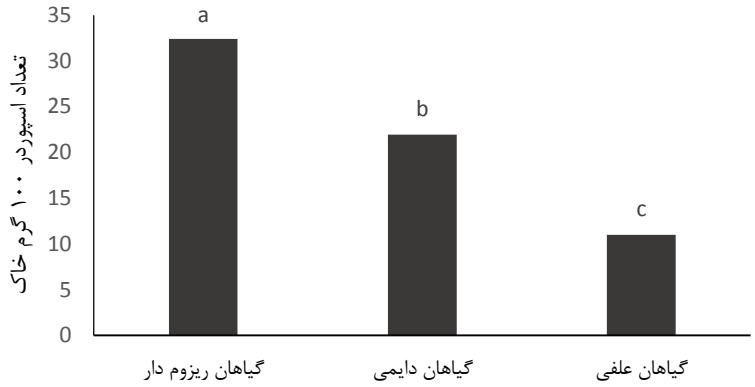
	گیاهان علفی		گیاهان دایمی	
	نام علمی	نام فارسی	نام علمی	نام فارسی
۱	*Cardaria draba*	ترتیزک باغی، موکو (ریزوم دار)	*Artemisia sieberi*	درمنه دشتی
۲	*Colchicum schimperi*	گل حسرت (پیازی)	*Haloxylon ammodendron*	تاغ
۳	*Phalaris sp.*	نوعی از گندمیان	*Peganum harmala*	اسپند
٤	*Senecio glaucus*	پیرگیاه	*Suaeda sp.*	سودا
٥	*Stipa arabica.*	استیپا (ریزوم دار)	*Tamarix sp.*	گز
٦	*Zoegea sp.*	---		

نتایج این آزمایش نشان داد که بین اسپورهای گیاهان مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. از بین ۱۱ گیاه مورد مطالعه، گیاه *cardaria draba* بیشترین و گیاه *senecio glaucus* کمترین میزان اسپور را داشت (شکل ۱). دلیل فراوانی اسپور در گیاهان علفی احتمالاً به این دلیل است که گیاهان یکساله سریع وارد فاز زایشی می‌شوند و بذر تولید می‌کنند و بیومس گیاه افزایش پیدا می‌کند و رشد هیف-های میکوریز بیشتر شده و اسپور بیشتری تولید می‌کنند(قصریانی و همکاران، ۱۳۸۴). در بین گیاهان دایمی *Artemisia sieberi* بیشترین میزان را دارد که با نتایج قصریانی و همکاران (۱۳۸۴) همخوانی دارد.



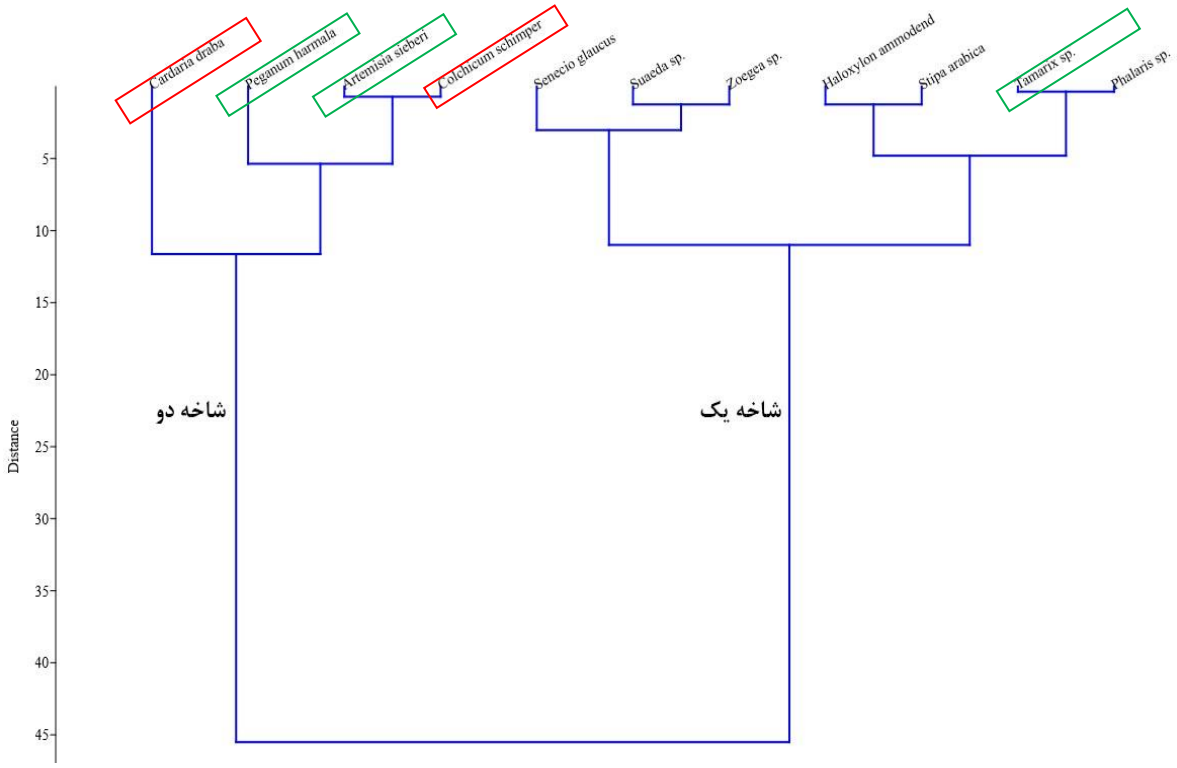
شکل ۱. نمودار فراوانی تعداد اسپور گیاهان دایمی و گیاهان علفی

در بین سه گروه گیاهان علفی ریزوم‌دار، گیاهان دایمی و گیاهان علفی بدون ریزوم، گیاهان علفی ریزوم‌دار تعداد اسپور بالاتری را دارا بودند و با سایر گیاهان اختلاف معنی داری را نشان داد (شکل۲). فراوانی اسپور به عوامل مختلفی مانند فصل رشد، نوع گیاه، عوامل محیطی و خاکی مختلف بستگی دارد. نوع گیاه میزبان و مدت زمان همزیستی از مهم‌ترین عوامل موثر بر میزان کلنیزاسیون قارچی و تولید اسپور می‌باشند (Chaurasia and Khare, 2006). افزایش میزان اسپور در گیاهان دایمی نسبت به علفی می‌تواند به دلیل سیستم ریشه‌ای قوی و با دوام بیشتر باشد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که کلنیزاسیون و تعداد اسپور با زمان و با افزایش مراحل رشد گیاه افزایش می‌یابد (Johri and Methew, 1989).



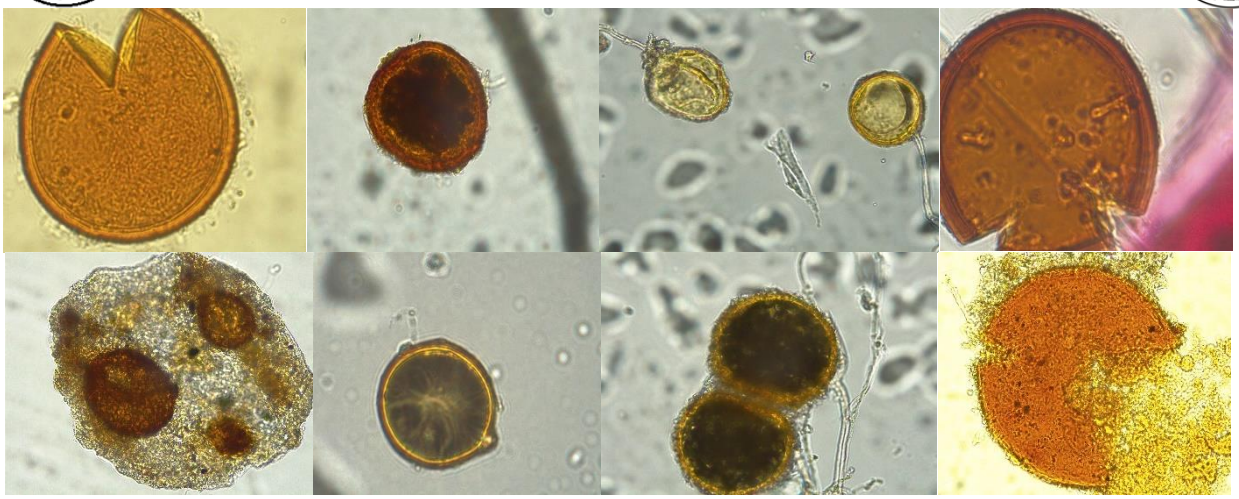
شکل ۲. نمودار فراوانی اسپور سه گروه گیاه

بررسی و رسم نمودار درختی تحلیل خوشه‌ای تعداد اسپور در گونه‌های مختلف نشان داد که گیاهان مورد مطالعه در دو شاخه اصلی قرار می-گیرند(شکل ۳). نکته جالب در این دسته‌بندی گیاهان ریزوم‌دار بودند، زیرا از سه گیاه ریزوم‌دار دو گیاه *Cardaria draba* و *Colchicum schimperi* در کنار *Artemisia sieberi* و *Peganum harmala* و در یک شاخه قرار گرفتند (شاخه ۲ شکل ۳).



شکل ۳. نمودار درختی تحلیل خوشه‌ای بر اساس شباهت تعداد اسپورهای قارچ میکوریز در گونه‌های مختلف گیاهان با روش Ward

اسپورهای مشاهده شده دارای تنوع گوناگونی از لحاظ شکل، رنگ، اندازه داشتند. اسپورهایی به رنگ سفید شیشه‌ای، زرد کمرنگ، نارنجی، سفید، قهوه‌ای متمایل به قرمز، سیاه دیده شد که اکثر اسپورهای مشاهده شده به رنگ نارنجی و قهوه‌ای بودند (شکل ۴).



شکل ۴. تصویر تنوع اسپورهای جدا شده از گیاهان مختلف به منظور شناسایی جدایه‌ها

نتیجه گیری

در این تحقیق اختلاف معنی داری بین تعداد اسپور گیاهان مورد مطالعه در استان کرمان وجود داشت و تعداد اسپور در گیاهان علفی ریزوم دار، گیاهان دائمی و علفی بدون ریزوم به ترتیب بیشتر بود. از بین ۶۴ نمونه از ۴ منطقه در استان، گیاه *Caradaria draba* بیشترین میانگین تعداد اسپور به میزان ۴۷/۷۵ با درصد همزیستی ۵۵/۵۳ و گیاه *Seneico glaucus* با میانگین تعداد اسپور ۵/۷۵ و درصد همزیستی ۵۴/۵٪ کمترین میزان تعداد اسپور را دارا بودند.

منابع

قصریانی, ف., زارع‌مایوان, ح. چائی‌چی، م.۱۳۸۶. پراکنش پوشش گیاهان میکوریزی در ارتباط با برخی از ویژگی های خاک در پارک ملی کویر. مجله محیط شناسی, ۳۳ (۴۴)، ۱۱۶-۱۰۵.

Abdelhalim, T.S., Finckh, M.R., Babiker, A.G. and Oehl, F. 2014. Species composition and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in White Nile state, Central Sudan. Archives of Agronomy and Soil Science, 60, 377-391.

Koske, R.E. and Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. Mycological research, 92, 486-488.

Oehl, F., Laczko, E., Oberholzer, H.R., Jansa, J. and Egli, S. 2017. Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. Biology and Fertility of Soils, 53, 777-797.

Ronsheim, M.L. and Anderson, S.E. 2001. Population-level specificity in the plant-mycorrhizae association alters intraspecific interactions among neighboring plants. Oecologia, 128, 77-84.

Kabir, Z., O'halloran, I.P., Fyles, J.W. and Hamel, C. 1997. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: hyphal density and mycorrhizal root colonization. Plant and Soil, 192(2), 285-293.

Smith, S.E. and Read, D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition). London: Academic Press.

Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R. and Frossard, E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. Mycorrhiza, 12, 225-234.

Chaurasia, B. and Khare, P. 2006. Hordeum vulgare: a suitable host for mass production of arbuscular mycorrhizal fungi from natural soil. Applied ecology and environmental research, 4, 45-53.

Johri, B. and Methew, J. 1989. Strategies for mass cultivation of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Plant microbe interactions. Narendra Publication House, Delhi, 293-303.

Al-Momany, A. and A1-Raddad. A. 1991. Response of bean, broadbean and chickpea plants to inoculation with Glomus species. Scientia horticulturae, 46, 195-200.

Topic for submission: **Soil Biology and Biofertilizers**

Study of Endomycorrhizal Fungi Spores Associated with Some Species of Permanent and Seasonal Herbaceous Noncrop Plants

Fatemeh Eftekhari1, Mehdi Sarcheshmehpour2, Seyed Mansour Mirtadzadini3

1,2 Faculty of Agriculture, Department of Soil Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3 Faculty of Biology, Department of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Drought stress is one of the most important destructive abiotic stress that has affected crop production in all the world. Mycorrhizal fungi (AMF) employ various mechanisms to alleviate the adverse effects of drought stress on plants. AMF increase plant resistance to stress condition as a consequence improve plant yield. The current study aimed to investigate AMF status in noncrop and permanent plants. At first, soil and root were collected from the rhizosphere of three gropes of plants include seasonal herbaceous plants with the rhizome, the seasonal herbaceous plants without the rhizome and permanent plants from Kerman province. After that samples were transported to the laboratory and kept in the refrigerator and plant samples were identified. Root colonization and soil spore number were determined in the samples. The experiment result was analyzed as a completely random design and the means were statistically compared. The result showed that plant samples were significantly different in the number of spores. The highest mean of spore number was found in the seasonal herbaceous plants with the rhizome, permanent plants, and the seasonal herbaceous plants without the rhizome respectively.

Keywords**:** Mycorrhizal fungi, dryland, Kerman.

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

اثر فسفر و پتاسیم خاک بر گره زایی ریشه یونجه

مجتبی یحیی‌آبادی*

عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

چکیده

تثبیت نیتروژن در لگومها با تشکیل گره‌ها شروع میشود. در بررسی علل مختلف محدود کننده گره‌زایی ریشه یونجه، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و همچنین جمعیت ریزوبیوم‌های خاک و درجه گره‌زایی ریشه، در ده منطقه از استان اصفهان اندازه‌گیری شد. تعیین درجه گره‌زایی ریشه و جمعیت ریزوبیوم‌های خاک با استفاده از روش Vincent انجام شد. جهت تعیین سهم هریک از عوامل مؤثر، از روش رگرسیون استپ وایز جلو رونده استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان فسفر خاک با جمعیت ریزوبیوم‌های خاک در سطح یک درصد و با درجه گره‌زایی ریشه در سطح پنج درصد همبستگی مثبت داشته است . همچنین میزان فسفر خاک، بر تشکیل گره، تعداد، حجم و وزن گره‌ها، رشد گیاهان میزبان و فرآیند تثبیت ازت اثر مثبت داشته است. نتایج حاصله حاکی از همبستگی مثبت پتاسیم کل خاک با درجه گره سازی ریشه و جمعیت باکتریهای ریزوبیوم در سطح یک درصد می‌باشد. لزوم توجه به میزان فسفر و پتاسیم خاک، در بهبود تثبیت نیتروژن و افزایش عملکرد یونجه بسیار مهم است.

کلمات کلیدی: یونجه، فسفر، پتاسیم، ریزوبیوم

مقدمه

تراکم بوته یونجه بلافاصله بعد از استقرار گیاه، زیاد است و با گذشت زمان کاهش می یابد. تصور می شود که تغذیه مناسب پتاسیم و فسفر باعث افزایش طول عمر این گیاه خواهد بود. Berg و همکاران (۲۰۰۷)، معتقدند که باروری فسفر و پتاسیم برای حفظ عملکرد بالا در یونجه مهم است و به دلیل اینکه این عملکرد با گذشت زمان کاهش می یابد، عملکرد دانه تحت تاثیر اجزای مختلفی قرار می گیرد که قبلا در یونجه نسبتا جوان یافت می شود. فسفر یکی از عناصر اصلی مورد نیاز باکتری‌های ریزوبیوم است تا بتوانند ازت اتمسفری را به آمونیوم مورد نیاز گیاهان تبدیل کنند(Drevon and Hartwig 1997). نیاز شدید به فسفر نشان دهنده نقش حیاتی آن در تأمین انرژی (ATP) در تثبیت ازت می‌باشد. از این رو فسفر بر توسعه گره‌های ریشه، نقش مهمی دارد. فسفر ناکافی در خاک، رشد و توسعه ریشه را محدود میکند و بر عمل فتوسنتز و تمام فرایندهایی که بطور مستقیم یا غیر مستقیم در تثبیت ازت موثر هستند، اثر نامطلوب می‌گذارد (Tang و همکاران، ۲۰۰۱). تحقیقات فراوان حاکی از تأثیر فسفر بر رشد گره‌ها و تثبیت ازت توسط لگومها میباشد. Jacobsen (۱۹۸۵) نشان داد که فسفر و پتاسیم موجب تشکیل سریعتر گره‌ها می‌شود. در خاک‌هایی با فسفر بالا، غده‌ها یازده روز پس از جوانه‌زدن بذر، روی ریشه تشکیل شدند (Ribet J and Drevon, 1995). در خاکهایی که با کمبود فسفر مواجه بوده‌اند، کاربرد کودهای فسفره باعث افزایش تعداد غده‌ها و وزن خشک آنها شد، همچنین رنگ غده‌ها از سبز به صورتی(رنگ غده فعال) گرایید. مطالعات دیگری نشان داده‌اند که افزودن کودهای فسفره و پتاس به خاک‌هایی که کمبود فسفر و پتاسیم دارند، موجب افزایش درصد ازت در یونجه و وزن خشک محصول تولیدی می‌گردد و این مبین آنست که لگوم‌های وابسته به تثبیت ازت در مقایسه با علوفه وابسته به کودهای ازته، نیاز فسفره و پتاسیم بیشتری دارند(Robson و همکاران، ۱۹۸۱) . از طرفی در مطالعات دیگر نشان داده شد که هر گونه محدودیت در رشد و توسعه ریشه، کمبود عناصری مانند فسفر و مولیبدن، زیادی اسیدیته خاک یا محدودیت فتوسنتز، باعث کاهش غده‌سازی ریشه و تثبیت ازت مولکولی می‌گردد(Almeida, 2000).

* ایمیل نویسنده مسئول: yahyabadi@gmail.com

همچنین Alniemi و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که غلظت فسفر در غده‌های سالم معمولا دو تا سه برابر فسفر موجود در ریشه گیاه است. بنابراین لگوم‌ها به فسفر قابل استفاده فراوان نیاز دارند. در شرایطی که تنش‌های محیطی وجود دارد، بیشتر لگوم‌های تثبیت کننده ازت قادر به افزایش فعالیت متابولیکی غده‌های موجود در ریشه گیاه بوده و در این شرایط ، تأمین فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاه، این توانایی را دو برابر میکند (Walsh, 1995). بدلیل تفاوت در خصوصیات خاک و مدیریت مزرعه در مناطق مختلف، سیستم همزیستی لگوم- ریزوبیوم از کیفیت و درجه گره بندی متفاوتی برخوردار می‌باشد. این تحقیق با هدف ارزیابی ارتباط میزان پتاسیم و فسفر خاک با درجه گره سازی ریشه یونجه در تعدادی از مزارع یونجه استان اصفهان پیشنهاد و به مورد اجرا گذاشته شد.

مواد و روش‌ها

به منظور اندازه‌گیری برخی از خصوصیات فیزیکی وشیمیایی خاک و همچنین شمارش جمعیت ریزوبیوم‌های خاک، ده منطقه مختلف از استان اصفهان انتخاب گردید و نمونه‌های خاک و گیاه یونجه همراه ریشه از این مناطق تهیه شد. نمونه برداری ها عمدتاً از مزارع یونجه دو یا سه ساله و در ابتدای گل دهی انجام پذیرفت. پس از شستشوی ریشه‌ها، غده‌های ریشه‌ای با دقت بوسیله پنس جدا شدند و پس از شستشو و استریل شدن (با الکل ۹۶٪ و کلرید جیوه ۰/۱ درصد) در محیط سیلیکاژل نگهداری شدند. در ادامه کار، برخی خصوصیات خاک مثل وزن مخصوص ظاهری، بافت خاک، EC،pH، درصد کربن آلی ، مقادیر عناصر ازت کل، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد. درجه گره‌بندی بندی ریشه گیاهان یونجه، با استفاده از جدول طبقه‌بندی وینسنت تعیین شد(Vincent, 1982). شمارش ریزوبیوم های خاک هر منطقه به روش MPN و براساس روش وینسنت انجام گردید. از نمونه خاک، شش سری رقت و هر سری در سه تکرار تهیه شد. در این روش رقت‌های تهیه شده از خاک به لوله‌های حاوی بذر جوانه زده یونجه دراسلنتdilworth تلقیح شده و لوله‌هایی که گرهک در آنها تشکیل شده به عنوان لوله مثبت در نظر گرفته شدند. پس از دو هفته انکوبه کردن لوله‌های تلقیح شده در اتاقک رشد، لوله‌های مثبت هر سری قرائت و MPN آنها با استفاده از جدول وینسنت تعیین شد. تجزیه آماری با نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال آماری پنج درصد و یک انجام گردید.

نتایج و بحث

میزان فسفر خاک از ۹/۸ mg/kg در شاهین شهر تا ۳۱/۵ mg/kg در شهرستان داران متغییر بود . نتایج حاصل از بررسی ضرایب همبستگی نشان داد که اثر فسفر خاک با جمعیت ریزوبیوم‌های خاک در سطح یک درصد و با درجه غده‌سازی ریشه در سطح پنج درصد همبستگی مثبت داشته است. مقدار پتاسیم خاک نیز به میزان ۱۱۰ mg/kg در منطقه اردستان تا ۳۱۲ mg/kg در منطقه داران مشاهده شد. نتایج حاصله حاکی از همبستگی مثبت پتاسیم کل خاک با درجه گره سازی ریشه و جمعیت باکتریهای ریزوبیوم در سطح یک درصد می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- ضرایب همبستگی ساده بین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و درجه غده سازی و جمعیت ریزوبیومها

پارامترها	EC dS/m	pH	OC	N	P	K	Clay %	BD g/cm^3
			%		mg/kg			
درجه غده سازی ریشه	-۰/۲۲	-۰/۰۴	۰/۴۱*	۰/۴۳*	۰/۴۳*	۰/۴۶**	۰/۱۶	-۰/۴۱*
جمعیت ریزوبیومها(MPN)	-۰/۳۲*	-۰/۱۶	۰/۳۷*	۰/۳۹*	۰/۵۶**	۰/۶۲**	۰/۲۰	-۰/۴۰*

** و * -بترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است

براساس ضرایب همبستگی ساده بدست آمده بین خصوصیات مختلف خاک و درجه غده‌بندی ریشه و جمعیت ریزوبیومها، پارامترهایی مثل وزن مخصوص ظاهری خاک و میزان فسفر و پتاسیم خاک، اثرات معنی‌دارتری از خود نشان دادند. براساس آنالیز رگرسیون چندمرحله‌ای (استپ وایز) نتایج،

میزان پتاسیم خاک در سطح یک درصد و مقدار وزن مخصوص ظاهری خاک در سطح پنج درصد با درجه گره‌سازی ریشه معنی‌دار می‌باشد(جدول۱). معادله استپ وایز بین مقادیر BD,Kو درجه گره سازی بصورت ذیل محاسبه شد(Y نمایانگر درجه گره سازی ریشه می‌باشد).

$$Y= ۴/۸۶۶+۰/۰۰۳\ K-۲/۵۳۵BD$$

همچنین معادله استپ وایز بین مقادیر K وBD و جمعیت ریزوبیوم‌ها به روش MPN با استفاده از آنالیر رگرسیون چند مرحله‌ای بصورت ذیل محاسبه گردید. (Y نمایانگر جمعیت ریزوبیومها در واحد وزن خاک می‌باشد.)

$$Y= ۱۴۴۲۱/۸۸۲+۳۳/۳۳۰K-۱۳۵۷۳/۶۸۵BD$$

براساس داده‌های فوق ، مقدار پتاسیم خاک اثر مهمی برگره سازی ریشه و جمعیت ریزوبیوم‌ها دارد. اثر پتاسیم بر همزیستی لگوم‌ریزوبیوم بصورت غیر مستقیم و از طریق تاثیر بر فیزیولوژی گیاه میزبان می‌باشد. نقش مهم پتاسیم عمدتاً در فتوسنتز ، انتقال مواد هیدروکربنی، تشکیل ترکیبات ازته و تبدیل آنها به پروتئین است. به نظر می‌رسد که پتاسیم از طریق افزایش ذخیره هیدرات‌های کربن در گره‌های ریشه‌ای و متعاقباً افزایش انرژی قابل استفاده جهت احیاء و جذب ازت ، نقش مفیدی بر تثبیت ازت داشته باشد(Collins و همکاران، ۱۹۸۶). آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای نشان داد که فسفر نیز تأثیر معنی‌داری بر جمعیت ریزوبیوم دارد. معادله استپ وایز بین مقادیر فسفر خاک و جمعیت ریزوبیوم‌ها با استفاده از آنالیر رگرسیون چند مرحله‌ای بصورت زیر محاسبه گردید.

$$Y= ۴۷۱۵۶۰۱۱\ p+\ ۳۴۹۱۶۵۲$$

کمبود فسفر یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تثبیت ازت مولکولی محسوب می‌شود. گیاهانی که قادر به تثبیت ازت مولکولی هستند، در مقایسه با گیاهان مصرف کننده ازت معدنی، به مقادیر بیشتری از عنصر فسفر نیازمندند. این نیاز شدید به فسفر نشان دهنده نقش حیاتی آن در انتقال انرژی در تثبیت ازت می‌باشد(Walsh,1995). فسفر در گره بندی، تعداد، حجم و وزن گره، رشد گیاهان میزبان و فرآیند تثبیت اثر داشته و در صورت وجود مقادیر کافی فسفر در گیاه، تثبیت ازت مولکولی به سرعت شروع شده و با افزایش میزان این عنصر در گیاه ، مقدار ازت نیز افزایش می‌یابد (James و همکاران، ۱۹۹۵). درصورت برقراری یک همزیستی سه گانه، بین گیاه میزبان، ریزوبیوم و قارچهای میکوریزا، تشکیل غده و فعالیت نیتروژناز تحریک می‌شود. آثار سودمند قارچ میکوریزا بر روی جذب فسفر و فرآیند تثبیت ازت معمولاً در خاکهای مواجه با کمبود فسفر بیشتر نمود پیدا می‌کند (Sprent, 1990).

نتیجه‌گیری

لگومها مانند سایر گیاهان برای رشد خود به عناصر غذایی مختلف نیاز دارند. مدیریت کود دهی مزارع یونجه نیز در استقرار یونجه و تشکیل گره‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. رشد یونجه به طور مستمر باعث تخلیه عناصر غذایی خاک می‌شود. هر تن یونجه خشک برداشت شده شامل ۲۳ کیلوگرم ازت، ۵ کیلوگرم فسفر (P2O5) و ۳۰ کیلوگرم پتاسیم (K2O) می‌باشد. برای تعیین وضعیت عناصر غذایی خاک بویژه فسفر، آزمون خاک بصورت سالیانه و حداقل دو ماه قبل از کاشت الزامی است. این کار، زمان لازم برای کسب نتایج آزمایش خاک را فراهم کرده و باعث در آمیختن کافی کود درخاک می‌شود. از آنجایی که فسفر در خاک براحتی حرکت نمی‌کند، افزودن فسفر به لایه شخم و همچنین بصورت سرک در زمان بروز کمبود لازم است. پتاسیم خاک نیز بویژه درخاکهای با بافت سبک باید تأمین شود. پتاسیم مستقیماً بر فعالیت گره‌ها مؤثر است و بطور غیر مستقیم در فتوسنتز دخالت دارد. در تمام مناطق مورد مطالعه، مدیریت کوددهی مزارع یونجه، محدود به استفاده زیاد اوره یا نیترات آمونیم می‌باشد که از دلایل مهم پایین بودن کارآیی تثبیت ازت می‌باشد.

منابع

Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Lüscher A. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N2 fixation in white clover (Trifolium repens L.). Journal of Experimental Botany 51: 1289–1297.

Al-Niemi TS, Kahn ML, McDermott TR. 1998. Phosphorus uptake by bean nodules. Plant and Soil 198: 71–78.

Berg, W.K., Cunningham, S. M., Brouder, S.M., Joern, B.C., Johnson, K.D., Santini, J.B. and Volence, J.J. 2007. The Long-Term Impact of Phosphorus and Potassium Fertilization on Alfalfa Yield and Yield Components. Crop Science, Vol. 47, 2198-2209.

Collins, M., D. J. Lang and K. A. Kelling. 1986. Effects of phosphorus, potassium and sulfur on alfalfa nitrogen fixation under field condition. Agron. J. 78: 959-963.

Drevon J-J, and Hartwig UA. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. Planta 201: 463–469.

Jacobsen I. 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (Pisum sativum). Physiologia Plantarum 64: 190–196.

James, D.W., T.A. Tindall, C.J. Hurst, and A.N. Hussein. 1995. Alfalfa cultivar responses to phosphorus and potassium deficiency: Biomass. J. Plant Nutr. 18:2431-2445.

Ribet, J., and Drevon, J.J. 1995. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (Glycine max (L.) Merr.). Journal of Experimental Botany 46: 1479–1486.

Robson AD, O'Hare GW, Abbott LK. 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (Trifolium subterraneum L.). Australian Journal of Plant Physiology 8: 427–436.

Sprent, Janet I. 1990. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall.

Tang C, Hinsinger P, Drevon J-J and Jaillard B. 2001. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of Medicago truncatula L. Annals of Botany 88: 131–138.

Vincent, J. M. 1982. Enumeration and determination of growth. Pp.35-45 in Vincent, J. M.(Ed). Nitrogen Fixation in Legums. Wiley, Sydney.

Walsh KB. 1995. Physiology of the legume nodule and its response to stress. Soil Biology and Biochemistry 27: 637–655.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of soil phosphorus and potassium on alfalfa root nodulation

Mojtaba Yahyaabadi *

Member of scientific board, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.

Abstract

Nitrogen fixation in the legumes begins with the formation of nodes. In studying different causes of limiting alfalfa root nodulation factors, soil physical and chemical properties, as well as soil rhizobium population and root nodulation degree, in ten regions of Isfahan province were measured. Root nodulation degree and soil rhizobium population was determined based on Vincent method. A stepwise regression method was used to determine the contribution of each of the effective factors. Also, soil phosphorus had a positive effect on nodule formation, number, volume and weight of nodules, host plants growth and nitrogen fixation process. The results alo showed a positive correlation of soil total potassium with root nodulation and with population of rhizobium bacteria at 1% level. It is important to pay attention to the amount of phosphorus and potassium in improving nitrogen fixation and alfalfa yield.

Keywords: Alfalfa, Phosphorous, Potassium, Rhizobium.

* Corresponding author, Email: yahyabadi@gmail.com

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر مخلوط گوگرد - مایه تلقیح *تیوباسیلوس* و برخی اسیدهای آلی بر فسفر قابل جذب خاک و فسفر گیاه سویا

فرشته چهکندی نژاد[1*]، مهدی سرچشمه‌پور[2]، مجید حجازی مهریزی[3]

[1]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3]دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

دستیابی به پایداری کشاورزی و محیط زیست امری حیاتی تلقی می‌شود که نیازمند تحقیق و بررسی در زمینه مدیریت نهاده‌های کشاورزی و اثرات زیست محیطی آن می‌باشد. اسیدهای آلی نظیر اسید سیتریک و اسید اگزالیک در واکنش‌های ریزوسفر خاک، به‌ویژه در قابلیت جذب عناصر غذایی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. استفاده از گوگرد به منظور کاهش pH خاک (حتی بطور موضعی) یکی از روش‌های افزایش حلالیت عناصر تثبیت شده و کارآیی کودها در خاک‌های آهکی محسوب می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر مخلوط گوگرد (سطح ۰/۳ درصد) میزان ۳ گرم به ازای هر کیلو گرم خاک و مایه تلقیح تیوباسیلوس (۴ گرم برای هر گلدان)، اسید سیتریک (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، اسید اگزالیک (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و تیمار شاهد به عنوان فاکتور اول و سه زمان اندازه‌گیری (۱، ۲ و ۳ ماه پس از کاشت) به عنوان فاکتور دوم بر فسفر قابل جذب خاک و گیاه سویا در یک خاک آهکی در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج بیشترین میزان قابلیت جذب فسفر در خاک از کاربرد اسید اگزالیک نسبت به شاهد به دست آمد. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین قابلیت جذب فسفر در ۲ ماه پس از کاشت گیاه بود. نتایج غلظت فسفر در گیاه نشان داد که بیشترین میزان غلظت فسفر در اندام هوایی در تیمار مخلوط تیوباسیلوس و گوگرد در ۳ ماه پس از کاشت به دست آمد.

کلمات کلیدی: زمان برداشت، تیمار بیولوژیکی و آلی، قابلیت جذب فسفر

مقدمه

مواد مادری آهکی و کم بودن نزولات آسمانی سبب تحول و پیدایش خاکهای آهکی و قلیایی در اکثر نقاط ایران شده است. بررسی وضعیت عناصر غذایی در خاکهای آهکی و قلیایی نشان می‌دهد که علیرغم وجود مقادیر فراوان برخی از عناصر غذایی (مانند فسفر، روی و آهن) در این خاکها، فرم محلول و قابل جذب این عناصر کمتر از مقدار لازم برای رشد و نمو مناسب گیاه بوده و کمبود عناصر غذایی یکی از عوامل محدود کننده تولید محصول در این خاک‌ها محسوب می‌شود (Modaihsh و همکاران، ۱۹۸۹؛ Pathirathna و همکاران، ۱۹۸۹؛Tisdal و همکاران، ۱۹۹۳). در خاک-های آهکی ایران، کاربرد ترکیباتی که در طولانی‌مدت منجر به کاهش pH خاک شوند، در اولویت قرار دارند. کاهش pH در خاک‌های آهکی باعث افزایش غلظت عناصر غذایی ضروری مانند فسفر، آهن، روی و منگنز در محلول خاک می‌شود. ریشه گیاهان و ریزجانداران برخی از اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم مانند اگزالیک اسید، سیتریک اسید و مالیک اسید را به محلول خاک ترشح می‌کنند (Patrik و همکاران، ۲۰۰۵). گوگرد نیز یکی از محصولات جانبی صنایع نفت و گاز است که سالانه بیش از یک میلیون تن در کشور تولید می‌شود (امیر مکری و ملکوتی ۱۳۸۲). این ماده هنگامی اثر بخش و مفید خواهد بود که در خاک به مقدار و سرعت کافی اکسید گردد. اکسیداسیون گوگرد عمدتا بیولوژیکی بوده و باکتری‌های تیوباسیلوس از جمله مهمترین اکسیدکنندگان این ماده می‌باشند. این باکتریها با اکسیداسیون گوگرد، علاوه بر تامین انرژی مورد نیاز خود، تولید اسید سولفوریک کرده و pH محیط را کاهش می‌دهند (Yang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Vidyalakshmi و Sridar 2007). استفاده از مواد اسیدی نظیر اسید سولفوریک و گوگرد عنصری که بتواند pH خاک را حداقل در مقیاس کوچک در اطراف ریشه‌ها کاهش داده و قابلیت جذب عناصر غذایی از قبیل فسفر، آهن و روی را افزایش دهد، به عنوان یک راهکار عملی و موثر توصیه شده است (Besharati، ۲۰۱۶).

* ایمیل نویسنده مسئول: f.chahkandi95@gmail.com

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تاثیر تیمار بیولوژیکی، آلی و زمان برداشت بر افزایش قابلیت جذب فسفر خاک و گیاه سویا در یک خاک آهکی به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور اول (شامل مخلوط ۳ /۰ درصد (خاک) گوگرد و مایه تلقیح تیوباسیلوس به مقدار ۴ گرم بر کیلوگرم خاک (به صورت جامد و ترکیبی از پرلیت بوده است) از شرکت زنجان شیمی تهیه گردید ، اسید سیتریک با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم، اسید اگزالیک با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (حسنی و همکاران ۱۳۹۷) و تیمار شاهد و فاکتور دوم (شامل سه زمان اندازه‌گیری ۱، ۲ و ۳ ماه پس از کاشت) می‌باشد. یک نمونه خاک غیرزراعی با مقدار فسفر کل بالا و فسفر قابل جذب نسبتا پایین جمع‌آوری و پس از هوا خشک کردن و کوبیدن، از الک ۲ میلی‌لیتری عبور داده و جهت اندازه‌گیری‌های لازم به آزمایشگاه منتقل شد. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شامل بافت به روش هیدرومتری، واکنش خاک در گل اشباع به وسیله pH متر، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع به وسیله دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی، کربن آلی به روش والکلی و بلاک (Walkley و Black، 1934)، فسفر قابل استفاده با عصاره‌گیری به روش اولسن (Olsen و همکاران، ۱۹۵۴) و فسفر کل به روش ساندرز و ویلیام اصلاح شده توسط Walker و Adams (1958) تعیین شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه در جدول۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

خصوصیات	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	pH	EC $dS.m^{-1}$	کربن آلی (درصد)	فسفر قابل جذب $mg.kg^{-1}$	فسفر کل $mg.kg^{-1}$
مقدار	۵۸/۳	۳۱/۵	۱۰/۲	۷/۸	۱/۶	۰/۳۷	۹/۶	۴۱۱/۸

آماده‌سازی گلدانها و کاشت گیاهان

ابتدا بذرهای گیاه سویا با الکل ضدعفونی و به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شدند و سپس در پارچه مرطوب به مدت پنج روز جهت جوانه‌زنی در رطوبت مناسب نگهداری شدند. تیوباسیلوس از شرکت زنجان شیمی تهیه گردید به میزان چهار گرم به هر گلدان اضافه گردید و گوگرد پودری نیز با سطح ۰/۳ درصد به تیمارهای حاوی تیوباسیلوس اضافه و به‌خوبی مخلوط گردید و اسید سیتریک و اگزالیک هم با خاک مخلوط شدند. پس از اعمال تیمارهای مورد نظر در خاک و انتقال آنها به گلدانها، در هر گلدان پلاستیکی (۲/۵ کیلوگرم خاک در هر گلدان) تعداد هشت بذر کشت شد و بعد از دو هفته به چهار گیاهچه یکنواخت کاهش یافت. آبیاری گلدان‌ها بر اساس رطوبت ظرفیت زراعی مزرعه در شرایط گلخانه انجام شد. پس از پایان هر دوره رشد گیاه، گیاهان برداشت و جهت تعیین برخی ویژگی‌های رویشی و غلظت فسفر به آزمایشگاه انتقال یافتند. از هر گلدان نمونه خاک نیز تهیه و جهت تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک پس از کشت به آزمایشگاه منتقل شد. جهت استخراج فسفر قابل جذب خاک از بیکربنات سدیم ۰/۵ مولار (۸/۵ =pH) استفاده شد (Olsen، 1954). سپس میزان فسفر موجود در عصاره نمونه‌ها با استفاده از روش آبی مولیبدات Murphy و Riley (1952) پیشنهاد شده توسط Watanabe و Olsen (1956) اندازه‌گیری شد. برای تعیین فسفر موجود در عصاره‌های گیاهی از روش رنگ‌سنجی زرد مولیبدات-وانادات استفاده گردید. در نهایت داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شده و محاسبات آماری مورد نظر انجام شد. مقایسه میانگین آزمون LSD (در سطح ۵ درصد) و رسم نمودار به وسیله نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

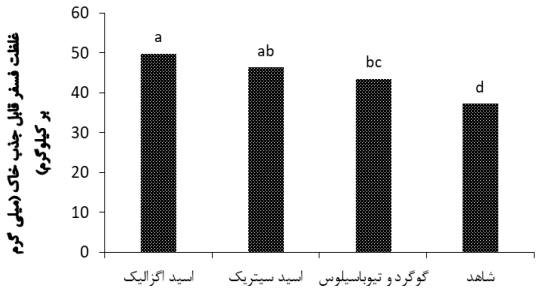
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فسفر قابل جذب خاک به‌طور معنی‌داری در سطح ۰/۱ درصد تحت تاثیر تیمار بیولوژیکی و آلی و زمان برداشت گیاه قرار گرفت و اثرات متقابل تیمار و زمان بر میزان فسفر معنی‌دار نشد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر مخلوط تیوباسیلوس – گوگرد، اسیدهای آلی و زمان برداشت بر غلظت فسفر گیاه و خاک

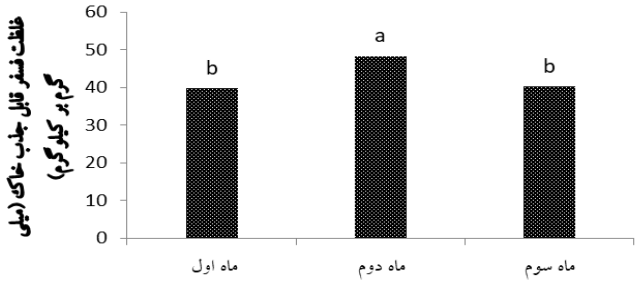
منبع تغییرات	درجه آزادی	غلظت فسفر قابل جذب خاک	غلظت فسفر اندام هوایی	غلظت فسفر ریشه
تیمار کودی	۳	۲۰۱/۱۳***	۰/۰۰۷۵***	۰/۰۰۱۸۷ns
زمان	۲	۴۲۲/۰۵***	۰/۰۰۹۹***	۰/۰۵۷۵***
تیمار × زمان	۶	۴۸/۰۲۸ns	۰/۰۰۲۵***	۰/۰۰۳۲۲**
خطا	۲۴	۲۶/۵۹	۰/۰۰۰۵۳	۰/۰۰۱۰۵
ضریب تغییرات	-	۱۲/۰۷	۲۱/۱۸	۲۵/۱۰

ns ، *** ، ** و * به ترتیب غیر معنی‌دار بودن و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد ، ۱ درصد و ۵ درصد

کاربرد اسید اگزالیک سبب افزایش معنی‌دار فسفر قابل جذب خاک در مقایسه با تیمار شاهد شد. بیشترین مقدار فسفر قابل جذب خاک در تیمار اسید اگزالیک (۴۹/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اندازه‌گیری شد که به‌جز اسید سیتریک با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین میزان فسفر متعلق به شاهد با میزان ۳۷/۱۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (شکل ۱). بیشترین مقدار فسفر قابل جذب خاک در ماه دوم (۴۸/۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اندازه‌گیری شد که با ماه اول و سوم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. کمترین مقدار فسفر قابل جذب خاک در ماه اول با مقدار ۳۹/۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم حاصل شد (شکل ۲). اثر زمان میانگین ۴ تیمار است تیوباسیلوس در ماه اول اثر ندارد و اثر آن تدریجی است در ماه دوم فسفر قابل جذب بیشتر بوده که به دلیل اثر تدریجی تیمارها بوده که در تیوباسیلوس بیشتر است. چون داده‌ها میانگین ۳ ماه است و حجم زیادی از ریشه خاک گلدان‌ها را احاطه کرده و تغییرات محیط ریزوسفر هم بوده است می‌تواند دلیل بر بالا بودن تیمار شاهد باشد ولی اختلاف بین تیمارها معنی‌دار است. Khademi و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک و اگزالیک در شرایط کمبود عناصر نسبت به بقیه اسیدها به مقدار نسبتا زیادی از ریشه گیاهان آزاد شده و در افزایش حل‌پذیری عناصر غذایی در ریزوسفر مشارکت دارند. این اسیدها به علت داشتن گروه‌های کربوسیلیک قادرند با این کاتیون‌های فلزی تشکیل کمپلکس محلول بدهند این اسیدها با کاهش مقدار pH خاک باعث حل‌پذیری ترکیبات نامحلول محتوی این عناصر می‌شوند.

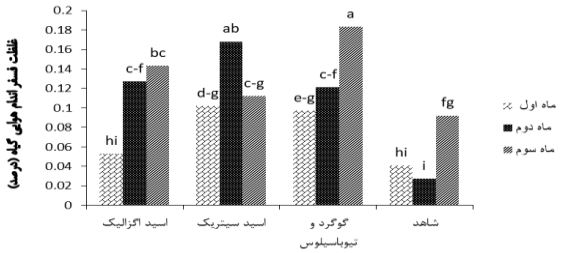


شکل ۱ نمودار تاثیر تیمارهای آلی و بیولوژیک بر فسفر قابل جذب خاک

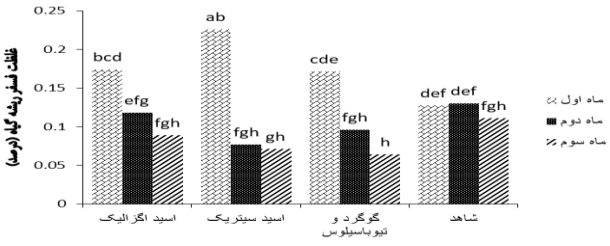


شکل ۲ نمودار تاثیر زمان بر فسفر قابل جذب خاک

غلظت فسفر اندام هوایی به‌طور معنی‌دار تحت تاثیر اثرات تیمار و زمان برداشت گیاه و اثرات متقابل تیمار و زمان در سطح ۰/۱ درصد قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد بیشترین میزان غلظت فسفر در گیاه در تیمار مخلوط تیوباسیلوس - گوگرد در ۳ ماه پس از کاشت گیاه با میانگین ۰/۱۸۳ درصد بود که به‌جز اسید سیتریک در ۲ ماه پس از کاشت با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳). غلظت فسفر در ریشه تحت تاثیر زمان برداشت در سطح ۰/۱ درصد و اثرات متقابل تیمار و زمان در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). حداکثر میزان غلظت فسفر در ریشه مربوط تیمار اسید سیتریک در ماه اول با میانگین ۰/۲۲۶درصد می‌باشد که به‌جز اسید اگزالیک در ۱ ماه پس کاشت با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۴). در اندام هوایی با گذشت زمان غلظت فسفر افزایش پیدا کرده و در ریشه با گذشت زمان غظت فسفر کاهش پیدا کرده که نشان می‌دهد فسفر از ریشه به اندام هوایی منتقل شده است و تغییرات عکس هم هستند. اسیدهای آلی احتمالا با کاهش مقدار pH خاک باعث افزایش انحلال فسفر در خاک شده و به جذب بهتر آن کمک کرده‌اند. با توجه به اینکه عنصر فسفر فاقد منبع مشخصی در خاک می‌باشد و بر خلاف عناصر پرمصرف دیگر دارای حداقل تحرک در خاک است (Sarikhani و همکاران، ۲۰۱۴)، لذا می‌تواند جهت تامین فسفر گیاهان موثر واقع شود.



شکل ۳ نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل مخلوط تیوباسیلوس – گوگرد، اسیدهای آلی و زمان برداشت بر غلظت فسفر اندام هوایی گیاه (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار نیستند)



شکل ۴ نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل مخلوط تیوباسیلوس – گوگرد، اسیدهای آلی و زمان برداشت بر غلظت فسفر در ریشه گیاه (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار نیستند)

بسیاری از محققین گزارش کرده‌اند اکسیداسیون گوگرد و تولید اسید سولفوریک باعث کاهش pH خاک و افزایش دسترسی به فسفر و عناصر کم مصرف می‌شود و باکتری تیوباسیلوس باعث تسریع این فرایند می‌شود (Tisdal و همکاران، ۱۹۹۳). در گزارش بشارتی و همکاران (۱۳۸۹) نیز تیوباسیلوس و گوگرد بر عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و مقدار فسفر جذب شده توسط بخش هوایی گندم تاثیر مثبت گذاشت.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که اسیدهای آلی باعث افزایش غلظت فسفر قابل جذب خاک در مقایسه با تیمار شاهد شدند. بنابراین کاربرد اسیدهای آلی در خاکهای زراعی آهکی برای افزایش قابلیت جذب فسفر می‌تواند مفید باشد. اثرات گوگرد چون تدریجی بوده می‌تواند ناشی از اکسیداسیون تدریجی گوگرد و جذب تدریجی آن باشد.

منابع

امیر مکری، ه.، و ملکوتی م. ج. ۱۳۸۲. نگاهی به صنعت تولید و مصرف گوگرد و نقش آن در کشاورزی، نشریه شماره ۳۲۴.

بشارتی، ح.، سادات نوری، س.ا. بردیا نیکنیایی، ا. ایران‌نژاد، ح. اکبری، ع. فلاح نصرت‌آبادی، ع. ر: ۱۳۸۹. بررسی کارایی گوگرد و مایه تلقیح باکتری‌های جنس تیوباسیلوس بر جذب فسفر و عملکرد گندم در خاک‌های آهکی مختلف. تحقیقاتی آب و خاک ایران: ۱، ۴۱، صفحات ۱۲۹-۱۲۱.

حسنی، ا.، اعتمادیان، م.، نورزاده حداد، م.، حنیفه‌ئی، م. ۱۳۹۷. تأثیر کاربرد برخی اسیدهای آلی بر ویژگی‌های رشدی و غلظت عناصر غذایی ذرت علوفه‌ای. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد ۳۲، ۳، صفحات ۵۵۸-۵۴۷.

Ezawa T., Smith S.E., and Smith F.A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. Plant and Soil, 244:221-230.

Khademi Z., Jones D. L., Malakouti M. J., Asadi F., and Ardebili M. 2009. Organic acid mediated nutrient extraction efficiency in three calcareous soils. Australian Journal of Soil Research, 47:213-220.

Modaihsh, S., W. A. Al-mustafa, and Metwally, A. E. 1989. Effect of elemental sulfur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils. Plant and Soil, 116:95-101.

Mukherjee, D and Singh, R. K. 2002. Influence Sulfur, iron and silicon nutrition on growth and yield of irrigated mustard. Haryana J. Agron. 18 (1 and 2): 2-50.

Olsen, S. R., Cole, C. V., & Watanabe, F. S. Dean, LA. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *USDA. Circ*, 939-943.

Pathirathna, L. S. S., U. P. De. S. Waidyanatha, and O. S. Peries. 1989. The effect of apatite and elemental sulfur mixtures on the growth and P content of Centrocema pubescent. Fertilizer Research, 21:374.

Patrik, A. W., V. Hees, D. L. Jones, G., Jenteschk, and Godbold, D. L. 2005. Organic acid concentrations in soil solution: Effect of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi. Soil Bio. Biochem, 37:771776.

Raghothama, K. G., & Karthikeyan, A. S. 2005. Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, *274*(1-2), 37.

Tisdale, S. L., W. L. Nelson, J. D. Beaton and Havlin, J. L. 1993. Soil Fertility and fertilizers. 5th ed. Mcmillon Publishing Co. New York.

Vidyalakshmi, R., and Sridar, R. 2007. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria. J. of Culture Collections, 5: 73-77.

Walker, T. W., & Adams, A. F. R. 1958. Studies on soil organic matter: I. Influence of phosphorus content of parent materials on accumulations of carbon, nitrogen, sulfur, and organic phosphorus in grassland soils. Soil science, 85(6), 307-318.

Walkley, A., & Black, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil science, 37(1), 29-38.

Yang, Z., S. Haneklaus, B. R. Singh, and E. Schnug. 2008. Effect of repeated applications of elemental sulfur on microbial pollution, sulfate concentration, and pH in soils. Communications in soil Sci.& plant Anal, 39(1&2): 124-14

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil genesis and classification

Soil Biology and Biofertilizers

Effect of sulfur- *Thiobacillus* inoculum and some organic acids on soil available P and soybean Pconcentratio

Chahkandi Nezhad, F.,[*1] Sarcheshmehpour[2], M., Hejazi Mehrizi[3], M

[1] M. Sc. Graduate, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
[3] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

Abstract

Achieving agricultural and environmental sustainability is considered vital, which requires the realization and management of agricultural inputs and their environmental impacts. Organic acids such as citric acid and oxalic acid play an important role in soil rhizosphere reactions, especially in the absorption of nutrients. The use of sulfur to reduce the pH of the soil (even topically) is one of the methods for increasing the solubility of the stabilized elements and the efficiency of fertilizers in calcareous soils. The condition of exploiting the potential of sulfur is the presence of microorganisms oxidizing this material, especially the bacteria of *Thiobacillus* genus in the soil. In the present study, the effects of two factors include including control, *Thiobacillus* (4 $g.kg^{-1}$) and sulfur (levels 0/3 %), citric acid (concentration of 150 $mg.kg^{-1}$) and oxalic acid (concentration of 150 $mg.kg^{-1}$) and time of measurement (1, 2 and 3 after planting) were investigated on increasing soil phosphorus absorption and plant in a calcareous soil. To obtain this aim, a completely randomized design with 3 replications was performed in a research greenhouse of Shahid Bahonar University of Kerman. Based on the result, the highest phosphorous absorbability was detected in treated soil by oxalic acid than control. The results showed that the highest available phosphorous in soil was found two months after planting. showed The highest concentration of phosphorus in the shoot was observed in the treatment of thiobacillus and sulfur 3 months after planting.

Keywords: Time, Biological and organic treatments, phosphorus absorption

[*] Corresponding author, Email: f.chahkandi95@gmail.com

محور مقاله: بیواوژی خاک و کودهای زیستی

ارزیابی استفاده از بازدارنده DCD بر تولید نیترات در یک خاک آهکی

عبدالله غیبی[۱*]، احمد گلچین[۲]، طاهره منصوری[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

[۳] دکترای علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

چکیده

به منظور کندسازی فرایند نیترات سازی و استفاده مؤثر از نیتروژن در خاک‌های کشاورزی درراستای کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و توسعه پایدار، از بازدارنده‌های نیترات سازی همراه با کودهای شیمیایی نیتروژنه استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر به منظور کاهش مقدار تولید نیترات از بازدارنده نیترات سازی دی‌سیان‌دی‌آمید (DCD) استفاده شد. در همین راستا آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در شرایط انکوباسیون انجام شد. فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از: سطوح کود اوره (صفر ،۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلو گرم خاک) و سطوح بازدارنده نیترات سازی دی‌سیان‌دی‌آمید (صفر، ۱، ۲ و۴ درصد میزان ازت مصرفی). نتایج آزمایش نشان داد که اثر کاربرد بازدارنده DCD بر میزان تولید نیترات در خاک آهکی معنی‌دار بود($p<۰/۰۱$). با افزایش سطح مصرف بازدارنده از مقدار تولید نیترات در خاک نسبت به تیمار شاهد کاسته شد و بیشترین میزان کاهش زمانی حاصل شد که میزان دی‌سیان‌دی‌آمید مصرفی ۴درصد میزان نیتروژن مصرفی بود. در مقابل با افزایش سطوح اوره مصرفی در خاک میزان نیترات تولید شده افزایش یافت.

کلمات کلیدی: اوره، بازدارنده نیترات سازی DCD، نیتروژن.

مقدمه

نیتروژن (N) جزء کلیدی در تولید محصول به شمار می‌آید (Stevenson، ۱۹۸۲). یکی از روش‌های نگهداری نیتروژن خاک به شکل آمونیوم، افزودن بازدارنده‌های نیترات‌ساز به کودهای شیمیایی دارای نیتروژن آمونیومی است (Ladha و همکاران ۲۰۰۵). بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون ترکیباتی هستند که اکسایش زیستی آمونیوم به نیترات را به‌واسطه کاهش فعالیت باکتری نیتروزوموناس و بدون تأثیر بر اکسایش نیتریت به نیترات به تأخیر می‌اندازند (Pasda و همکاران ۲۰۰۱). امروزه بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون انواع مختلف داشته و بر اساس نوع خاک‌ها، شرایط زمانی و مکانی، شرایط آب و هوایی و اهداف تحقیقاتی دسته‌بندی می‌شوند. از رایج‌ترین بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون می‌توان به؛ ۳ و ۴دی متیل‌پیرازول فسفات[۱] (DMPP)، دی‌سیان دی‌آمید[۲] (DCD)، ۲ کلرو ۶ تری کلرومتیل‌پیریدین (Nitrapyrin)، ۴ کلرمتیل‌پیرازول[۳] (CIMP)، متیل‌هیدروژن-بنزوتریازول[۴] (MBz) و بازدارنده اوره‌آز، ان‌بوتیل‌تیوفسفوریک‌تری‌آمید (NBPT) اشاره کرد (Tindaone و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعات مختلف به نقش بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون در کنترل هدررفت نیتروژن به شکل نیترات اشاره شده است. در این راستا Suter و همکاران (۲۰۱۰) توانایی دو بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و DMPP در کاهش نیتریفیکاسیون و انتشار N_2O از کودهای نیتروژنه را در خاک‌های مرتعی استرالیا مورد بررسی قرار دادند نمونه خاک‌ها در مقادیر ۱۵۰ گرمی در بطری‌های کوچک (۱۵ سانتی‌متر در ۳۵ سانتی‌متر مربعی) توزین شدند، سپس اوره گرانولی به مقدار ۱۷۵ میکروگرم در گرم خاک خشک به همراه ۰/۷۱ میکروگرم بازدارنده دی‌متیل‌پیرازول‌فسفات (DMPP) در گرم خاک و میزان ۳/۸ میکروگرم بازدارنده دی‌سیان دی آمید (DCD) در گرم خاک استفاده شد. نمونه خاک‌ها به مدت ۷۰ روز در دماهای ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۶۰

* ایمیل نویسنده مسئول: abdollah.gheibi70@gmail.com

[1] - 3.4Dimethylpyrazolephosphat
[2] - Dicyandiamide
[3] - 4-Chlormethylpyrazole
[4] - methylhedrogenbenzotriazole

درصد ظرفیت مزرعه خوابانیده شدند. نتایج آن‌ها نشان داد که افزودن بازدارنده‌های نیتریفیکاسیونDCD و DMPP تأثیر چندانی بر تشکیل نیترات در خاک سطحی نداشتند ولی تشکیل نیترات در خاک عمقی را کاهش دادند. DCD در دماهای سردتر کمی بهتر از DMPP فرآیند نیتریفیکاسیون را مهار کرد. Pasda و همکاران (۲۰۰۱) اثر کودهای نیتروژنی به همراه بازدارنده نیتریفیکاسیون دی‌متیل‌پیرازول‌فسفات (DMPP) و دی‌سیان‌دی‌آمید (DCD) را بر روی کیفیت و عملکرد محصولات باغی و زراعی در نیوزیلند مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بازدارنده DMPP متوسط عملکرد محصولات را افزایش داد و سبب بهبود کیفیت محصولات (کاهش غلظت نیترات در سبزی‌ها برگی) شد. اثر مثبت DMPP روی عملکرد محصول به‌ویژه در موقعیت‌های با میزان بارندگی بالا یا آبیاری شدید و یا خاک با زهکشی ضعیف مشاهده شد. استفاده همزمان از دو روش تقسیط کود نیتروژنه و مصرف بازدارنده نیتریفیکاسیون DMPP، بهره‌وری نیتروژن را بیش روش از استاندارد تقسیط کود نیتروژنه و بدون DMPP افزایش داد. Wang و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که پس از مصرف نیتروژن(به شکل اوره) در خاک، مقادیر انتشار N_2O و تولید نیتروژن نیتراتی افزایش یافت، اما با کاربرد اوره به همراه بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD از مقدار انتشار N_2O و تولید نیترات کاسته شد.

مصرف بیش از حد کودهای نیتروژنی در بسیاری از مناطق به دلیل بالا بودن pH، سبب شده است تا نیتروژن آمونیومی به سرعت طی فرآیند نیتریفیکاسیون میکروبی به نیترات تبدیل و از دسترس گیاه خارج شود. بنابراین به دلیل پایین بودن راندمان کودهای نیتروژنی در مناطق خشک و نیمه‌خشک و نظر به این‌که تاکنون از بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون در خاک‌های کشور استفاده نشده است. در پژوهش حاضر سعی بر آن شده است تا تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون رایج دی سیان‌دی‌آمید (DCD) به علت ارزان بودن، حلالیت در آب و فراریت کم (Gitrap et al., 2010) بر کنترل فرآیند نیتریفیکاسیون در یک خاک آهکی مورد بررسی و تحلیل قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی درآزمایشگاه به اجرا درآمد. سطوح نیتروژن مصرفی عبارت بود از: صفر،۱۰۰، ۲۰۰ و۴۰۰ میلی گرم درکیلوگرم خاک (از منبع اوره) و سطوح بازدارنده نیتریفیکاسیون عبارت بود از :صفر ، ۱ ،۲ و۴ درصد ازت مصرفی از DCD که در سه تکرار اعمال گردیدند.

برای انجام این تحقیق از عمق صفر تا ۳۰ سانتیمتری یک قطعه زمین زراعی دیم در روستای قوشه بلاغ شهرستان تکاب استان آذربایجان غربی به عرض جغرافیایی″۲۷ ′۳۶ °۲۹ شمالی و طول جغرافیایی ″۳۱ ′۴۷ °۱۴ شرقی که تحت آیش قرار داشت نمونه برداری شد .پس از هوا خشک کردن و آماده سازی نمونه خاک ها و گذراندن آنها از الک۲ میلیمتری برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها از جمله؛ بافت خاک به روش هیدرومتری(Gee and Bounder, 1986)، واکنش‌خاک در گل اشباع با استفاده از pH سنج، هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک با استفاده از EC سنج، ظرفیت تبادل کاتیونی به روش باور(Page et al, 1987)، کربنات کلسیم معادل به روش خنثی سازی با اسید کلریدریک یک نرمال(Jones, 2001)، درصد کربن آلی خاک به روش والکلی-بلک (Nelson and Sommer, 1982)، فسفر خاک به روش بری ، پتاسیم به روش استات آمونیوم ، عناصر کم مصرف خاک(آهن، منگز، مس و روی) با استفاده از DTPA موردانداره گیری قرار گرفت. سپس خاک ها در واحدهای ۲۰۰ گرمی توزین شده و پس از افزودن سطوح مختلف اوره و بازدارنده های نیتریفیکاسیون، به روش افشانه کردن روی خاک، به میزان۷۵ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه به آنها آب مقطر اضافه شده و سپس در ظرف‌های مخصوص در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۴روز خوابانیده شدند و در فواصل زمانی هر هشت روز یکبار از آنها به مقدار لازم خاک برداشته شده و مقدار ازت کل، ازت معدنی(مجموع N-NH4 با N-NO3)،ازت آمونیومی (N –NH4) و ازت نیتراته (N-NO3)در آنها تعیین شد. برای اندازه گیری مقدار ازت کل از روش کجلدال (Bremner, 1996) و به روش هضم تر استفاده شد. برای تعیین مقدار ازت آمونیومی وازت نیتراتی از عصاره گیری با سولفات پتاسیم و روش رنگ سنجی (Alef and Nannipier 1995) استفاده شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به برخی از ویژگی‌های خاک زراعی مورد استفاده در جدول (۱) ارائه گردیده است. با توجه به مقدار کربنات کلسیم معادل بالا (بیش از ۱۰ درصد)، جزء خاک‌های آهکی تقسیم‌بندی می‌شود (Tan، ۲۰۰۵). همچنین از نظر شوری در گروه خاک‌های با شوری کم (Malakouti و همکاران ۲۰۰۲) قرار دارد. مقدار ماده آلی این خاک حدوداً ۲/۱۵ درصد و مقدار نیتروژن کل آن‌هم ۰/۱۴۵ درصد می‌باشد. نمونه‌برداری از خاک زراعی هنگامی صورت پذیرفت که زمین تحت آیش بود و در سال زراعی قبل از نمونه‌برداری تحت کشت نخود دیم قرار داشت.

جدول۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

شن	سیلت	رس	بافت خاک	نیتروژن کل	کربنات کلسیم	EC	pH	فسفر	پتاسیم	آهن	مس	روی	منگنز
درصد				درصد		µS/cm		میلی‌گرم بر کیلوگرم (قابل جذب)					
۴۳	۴۰/۶۸	۱۶/۳۲	لوم	۰/۱۴۵	۱۲	۴۱۴	۷/۶۵	۸/۱	۲۳۷	۵/۵۱	۰/۹	۰/۵۸	۶/۸۴

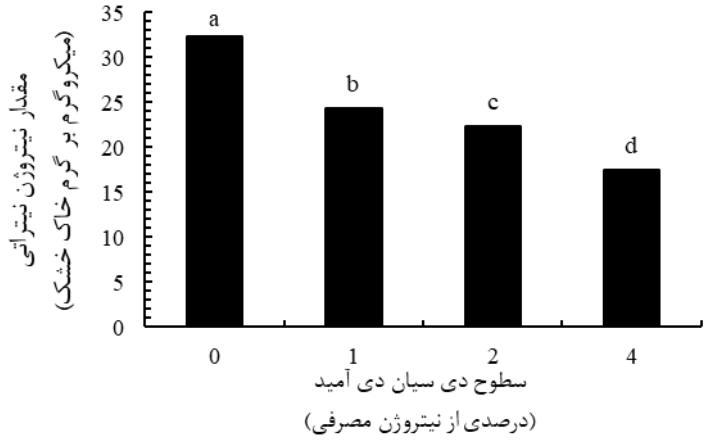
براساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر مقادیر نیتروژن مصرفی (به شکل اوره) و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و همچنین اثرات متقابل ان‌ها بر مقدار نیتروژن نیتراتی (NO_3^--N) تولید شده در خاک، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول۲).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف نیتروژن مصرفی(به‌صورت اوره) و سطوح مختلف بازدارنده DCD بر مقدار نیتروژن نیتراتی NO_3^- تولید شده در خاک N

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
سطوح بازدارنده	۳	۴۵۴/۰۲***
	۳	۵۹۷۹/۹۱***
سطوح نیتروژن		
سطوح بازدارنده× سطوح نیتروژن	۹	۱۳۸/۷۴***
خطای آزمون	۳۲	۰/۲۱
ضریب تغییرات(٪)	-	۱/۹۳

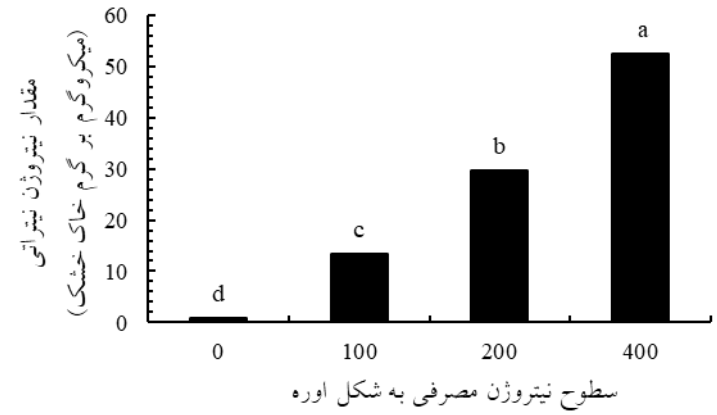
***: معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ درصد

با توجه به شکل ۱ مصرف بازدارنده نیتریفیکاسیون به‌طور کامل قادر به توقف فرایند نیتریفیکاسیون نبوده بلکه آن را کاهش می‌دهد با افزایش سطح مصرف DCD از مقدار نیتروژن نیتراتی تولید شده در خاک کاسته شد و کمترین مقدار نیتروژن نیتراتی به میزان ۱۷/۵ میکروگرم در گرم خاک از مصرف DCD به اندازه چهار درصد نیتروژن مصرفی به دست آمد، که در مقایسه با تیمار شاهد با (غلظت ۳۲/۲۸ میکروگرم در گرم خاک خشک) ۴۵/۷ درصد کاهش داشت. مصرف بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD احتمالا از طریق مهار فعالیت میکروارگانیسم‌های اتوتروف اکسید کننده آمونیوم سرعت نیتریفیکاسیون و مقدار تولید نیترات را کاهش می‌دهد.



شکل ۱. تأثیر سطوح بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بر مقدار نیتروژن نیتراتی(NO_3^--N) در خاک آهکی

با توجه به شکل ۲ با افزایش سطح مصرف نیتروژن مقدار نیتروژن نیتراتی تولید شده در خاک افزایش یافت. در واقع هرچه میزان اوره مصرف شده بیشتر باشد میزان آمونیومی که تولید می‌شود بیشتر خواهد بود چون هیدرولیز اوره توسط آنزیم اوره‌آز تحت تأثیر این بازدارنده قرار نمی‌گیرد، ولی سرعت فرایند تبدیل آمونیوم به نیتریت توسط این بازدارنده کند شده و کاهش می‌یابد. بنابراین چنانچه با حضور DCD درصدی از آمونیوم به نیتریت و متعاقباً به نیترات تبدیل می‌شود، با افزایش مقدار نیتروژن مصرفی، میزان آمونیوم تولید شده در خاک و در نتیجه مقدار نیتروژن نیتراتی بیشتری نیز در خاک به وجود می‌آید (Tao و همکاران ۲۰۱۷).



شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف نیتروژن مصرفی به شکل اوره بر تولید نیتروژن نیتراتی (NO_3^--N) در خاک آهکی

بیشترین مقدار نیتروژن نیتراتی تولید شده در خاک به میزان ۶۸/۴۴ میکروگرم در گرم خاک از مصرف ۴۰۰ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم خاک و بدون مصرف بازدارنده، و کمترین مقدار نیتروژن نیتراتی تولید شده در خاک به مقدار۰/۷۲۷ میکروگرم در گرم خاک از مصرف ۴ درصد بازدارنده (نسبت به نیتروژن مصرفی) و بدون مصرف نیتروژن به دست آمد (جدول ۳). با افزایش سطح مصرف بازدارنده فرایند نیتریفیکاسیون با قدرت بیشتری مهار شده و تولید نیترات در خاک کاهش یافت. زمانی که نیتروژن به‌صورت اوره و به تنهایی در خاک مصرف می‌شود به سرعت توسط میکروارگانیسم‌ها هیدرولیز شده و به آمونیوم تبدیل می‌شود و سپس طی فرآیند نیتریفیکاسیون میکروبی نیتروژن از شکل آمونیومی به نیترات تبدیل می‌شود اما هنگام مصرف اوره به همراه بازدارنده DCD به دلیل جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم‌ها و اکسید کننده آمونیوم از سرعت فرایند نیتریفیکاسیون برای مدت معینی(دو الی سه هفته) کاسته شده و تولید نیترات به تأخیر می‌افتد اما به‌طور کامل متوقف نمی‌شود و باز هم مقداری از نیتروژن مصرفی از فرم آمونیومی به فرم نیتراته تبدیل می‌شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، سرعت نیتریفیکاسیون در خاک آهکی تحت تأثیر سطوح مختلف نیتروژن مصرفی و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD قرار گرفت. طی مدت هشت هفته خوابانیدن، با افزایش سطوح نیتروژن مصرفی (به شکل اوره) مقدار نیتروژن نیتراته افزایش یافت. مصرف بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD به‌طور قابل‌توجهی فرایند نیتریفیکاسیون و تولید نیترات را تا سه الی چهار هفته اول دوره خوابانیدن مهار کرد. مناسب‌ترین غلظت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD برای کاهش تولید نیترات در خاک آهکی به میزان چهار درصد نیتروژن مصرفی بود.

منابع:

Alef, K., Nannipier, A. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London.

Bremner J.M, Mulvaney C.S. 1982. Nitrogen—Total 1. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Jan(methodsofsoilan2):595-624.

Jones, D.L., Owen, A.G. and Farrar, J.F. 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. Soil Biology and Biochemistry, 34(12): 1893-1902.

Malakouti, M.J., Keshavarz, P., Saadat, S. and Khaladbarin, B. 2002. Plants nutrition under saline conditions. 233p. Sana Press. (In Persian).

Gee, G.W., Bouder, J.W. 1986. Particle size analysis. In: Klute, A. (Ed.), Methods of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods. Agron. Monogr. 9, second ed. ASA and SSSA, Madison, 383–411.

Giltrap, D.L., Singh, J., Saggar, S. and Zaman, M. 2010. A preliminary study to model the effects of a nitrification inhibitor on nitrous oxide emissions from urine-amended pasture. Agriculture, Ecosystems & Environment, 136(3-4): 310-317.

Pasda, G., Hähndel, R. and Zerulla, W. 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3, 4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. Biology and Fertility of Soils, 34(2): 85-97.

Suter, H., Chen, D., Li, H., Edis, R. and Walker, C. 2010, August. Comparison of the ability of the nitrification inhibitors DCD and DMPP to reduce nitrification and N 2 O emissions from nitrogen fertilisers. In Proceedings of the 19th World Congress of Soils Science : 1-6.

Tao, R., Wakelin, S.A., Liang, Y. and Chu, G. 2017. Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in calcareous soil to mineral and organic fertilizer application and their relative contribution to nitrification. Soil Biology and Biochemistry, 114: 20-30.

Tindaon, F., Benckiser, G. and Ottow, J.C.G. 2012. Effects of Nitrification Inhibitors on Mineral Nitrogen Dynamics in Agriculture Soils. AGRIVITA, Journal of Agricultural Science, 33(3): 279-290.

Wang, Q., Hu, H.W., Shen, J.P., Du, S., Zhang, L.M., He, J.Z. and Han, L.L. 2017. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on N 2 Oemissions and the abundance of nitrifiers and denitrifiers in two contrasting agricultural soils. Journal of Soils and Sediments, 17(6): 1635-1643.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil and biological fertilizers

Evaluation of the use of DCD inhibitor on nitrate production in a calcareous soil

Gheybi*[1], A., Gholchin[2], A., Mansuri, T.[3]

[1] M. sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran
[2] Full Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran
[3] Ph.D. student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Iran

Abstract

In order to slow down the nitrification process and the effective use of nitrogen in agricultural soils in order to reduce environmental pollution and sustainable development, nitrate inhibitors are used together with nitrogen chemical fertilizers.In the present study, dicyandiamid (DCD) inhibitor was used to reduce nitrate production. In this regard, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in incubation conditions. The experimental factors were: levels of urea fertilizers (0, 100, 200 and 400 mg / kg of soil) and levels of nitrate distillation (0, 1, 2 and 4% nitrogen consumption).The results of the experiment showed that the effect of DCD inhibitor application on nitrate production in calcareous soils was significant ($p < 0.01$). By increasing the level of inhibitory intake, the amount of nitrate production in the soil decreased compared to the control treatment, and the highest reduction time was obtained when the amount of dioxygen used consumed was 4% nitrogen consumed. In contrast, with increased levels of urea consumed in the soil, the amount of nitrate produced increased.

Keywords: Urea, DCD nitration inhibitor, Nitrogen.

* Corresponding author, Email: abdollah.gheibi70@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

نقش باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر برخی شاخص‌های رشدی و مقدار فسفر در نهال‌های پسته

فرهاد آذرمی آتاجان[۱*]، محمد حسن سیاری زهان[۲]

[۱] استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

[۲] دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

چکیده

استفاده از کودهای فسفاتی مرسوم‌ترین روش برای تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان می‌باشد. با توجه به وضعیت آهکی خاک بسیاری از باغ‌های پسته ایران، بخش زیادی از کودهای مصرف شده در خاک تثبیت و کارایی آن‌ها کاهش می‌یابد. بکارگیری باکتری‌های حل کننده فسفات روشی مناسب برای افزایش فراهمی فسفر خاک برای گیاهان می‌باشد. در این پژوهش، تأثیر کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB_0، PSB_1 و PSB_2 به‌ترتیب شاهد و دو سویه *Pseudomonas* sp.) و کودهای فسفاتی (P_0، RP و TSP به‌ترتیب شاهد، سنگ فسفات و سوپرفسفات تریپل) بر رشد و غلظت فسفر نهال‌های پسته بررسی شد. نتایج نشان داد که تلقیح با باکتری‌های حل کننده فسفات موجب افزایش ارتفاع نهال، حجم ریشه، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه و غلظت فسفر اندام‌هوایی و ریشه نهال‌های پسته شد. کاربرد همزمان سویه‌های PSB_1 و PSB_2 و سنگ فسفات ارتفاع نهال را به‌ترتیب ۶۳ و ۴۷ درصد، وزن خشک اندام‌هوایی را به‌ترتیب ۷۰ و ۵۶ درصد و غلظت فسفر اندام‌هوایی را به‌ترتیب ۱۰۰ و ۷۲ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. کاربرد همزمان سوپرفسفات تریپل و باکتری‌ها در افزایش شاخص‌های مطالعه شده بیشتر مؤثر بود. بنابراین، باکتری‌های حل کننده فسفات می‌تواند علاوه‌بر بهبود غلظت فسفر گیاه، کارایی کودهای فسفاتی را نیز افزایش دهد.

کلمات کلیدی: اسیدهای آلی، باکتری‌های محرک رشد گیاه، پسته، سنگ فسفات، کودهای شیمیایی

مقدمه

پسته یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی ایران است که از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی دارای اهمیت است. سطح زیر کشت این محصول در کشور حدود ۴۷۹ هزار هکتار (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۶) می‌باشد که تغذیه این درختان به دلایل مختلفی مانند مقدار زیاد کربنات‌کلسیم، pH بالا، کوددهی نامتعادل، مواد آلی کم و شوری خاک و آب آبیاری، پایین است. فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی محدود کننده رشد گیاهان مختلف از جمله درختان پسته می‌باشد. اگرچه اغلب خاک‌های کشاورزی حاوی مقادیر زیادی از فسفر به شکل‌های مختلف هستند ولی، بخش اعظم فسفر موجود در خاک به دلیل برهم‌کنش با عناصری مانند کلسیم و آهن در خاک رسوب کرده و از دسترس گیاه خارج می‌شود. غلظت فسفر قابل جذب در خاک کمتر از ۰/۱ درصد فسفر کل می‌باشد (Adesemoye and Kloepper, 2009). رایج‌ترین شیوه برای تامین فسفر مورد نیاز گیاهان استفاده از کودهای فسفاتی است. علی‌رغم نقش عمده کودهای شیمیایی در افزایش تولید و عملکرد محصولات زراعی، مصرف بی‌رویه و نامتعادل این کودها علاوه‌بر افزایش هزینه‌های تولید، تخریب منابع خاکی، آبی و زیست‌محیطی را نیز موجب شده است (Gyaneshwar و همکاران ۲۰۰۲). از طرفی، فسفر افزوده شده به خاک به‌شکل کودهای فسفاتی، به‌دلیل واکنش با کلسیم به‌ویژه در خاک‌های آهکی، به فسفات‌های کلسیم کم‌محلول در خاک تبدیل شده و برای گیاه غیرقابل جذب می‌گردد (Zaidi و همکاران ۲۰۰۹). از طرفی تبدیل سنگ فسفات به کودها فسفاتی هزینه‌بر و زمان‌بر بوده و مصرف مستقیم آن کارایی کافی را ندارد (سرچشمه‌پور و همکاران ۱۳۹۴). تاکنون راهکارهای مختلفی برای افزایش کارایی کودهای فسفاتی و بهبود تغذیه فسفری گیاهان مختلف ارائه شده است. یکی از روش‌های نوین در این زمینه، استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB)[۱] است. باکتری‌های حل کننده فسفات گروهی از ریزجانداران خاک هستند که می‌توانند با سازوکارهای مختلفی مانند تولید اسیدهای آلی، اسیدهای

* ایمیل نویسنده مسئول: farhadazarmi@birjand.ac.ir

[1]- Phosphate Solubilizing Bacteria

معدنی، پروتون و ترشح آنزیم‌های فسفاتاز، pH محیط ریشه را کاهش داده و فراهمی فسفر برای گیاه را افزایش دهند (Khan و همکاران ۲۰۱۴). این باکتری‌ها علاوه بر افزایش فراهمی فسفر برای گیاه، می‌توانند مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های زیست محیطی افزایش دهند. حسنی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی تاثیر تلقیح سویه‌های سودوموناس فلوروسنت با خصوصیات محرک رشدی مختلف بر رشد نهال‌های پسته نشان دادند؛ که تلقیح با این باکتری‌ها موجب افزایش سطح برگ، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک نهال‌های پسته شد. هم‌چنین، کاربرد ریزجانداران بومی باغ‌های پسته همراه با خاک فسفات و گوکرد، علاوه‌بر افزایش رشد و جذب عناصر غذایی مانند فسفر، کارایی خاک فسفات را در شرایط شور افزایش داد (سرچشمه‌پور و همکاران ۱۳۹۴). تأثیر باکتری‌های سودوموناس در افزایش جذب عناصر غذایی فسفر، آهن و روی در نهال‌های پسته نیز گزارش شده است (Azarmi و همکاران ۲۰۱۶). با توجه به مقدار زیاد آهک در باغ‌های پسته ایران و کارایی پایین کودهای فسفاتی در این باغ‌ها، هدف از این پژوهش بررسی نقش باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر رشد و غلظت فسفر در نهال‌های پسته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی نقش باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر برخی شاخص‌های رشدی و غلظت فسفر در نهال‌های پسته در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای پژوهشی شامل باکتری‌های حل کننده فسفات در سه سطح (PSB_0، PSB_1 و PSB_2 به‌ترتیب شاهد و دو سویه *Pseudomonas* sp. با توانایی حل فسفات در آزمایشگاه) و سه سطح کود فسفاتی (P_0، RP و TSP به‌ترتیب شاهد، سنگ فسفات و سوپرفسفات تریپل) بود. برای کشت، گلدان‌ها با ۲ کیلوگرم خاک عبور داده شده از الک ۲ میلی‌متری (جدول ۱) پر شده و در هر گلدان ۵ بذر جوانه‌دار شده پسته رقم بادامی کشت گردید. برای تلقیح با باکتری‌ها، هر بذر با ۲۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح هر باکتری آغشته شده و سپس کشت شد. سنگ فسفات و سوپرفسفات تریپل نیز به‌مقدار ۳۰ میلی‌گرم فسفر (P_2O_5) در گلدان قبل از کشت به گلدان‌ها اضافه شده و به‌طور کامل با خاک مخلوط شد. پس از رشد اولیه نهال‌ها، تعداد آن‌ها به ۳ عدد در گلدان تقلیل داده شده و در طول دوره رشد، با آب معمولی آبیاری شدند. ارتفاع نهال با خط‌کش، حجم ریشه به روش تغییر حجم آب در استوانه مدرج و وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه نیز پس از خشک شدن نمونه‌ها در داخل آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. غلظت فسفر در نمونه‌ها نیز به روش رنگ‌سنجی تعیین گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD انجام شد.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

بافت خاک	EC ($dS\ m^{-1}$)	pH	ماده آلی (در صد)	آهک (درصد)	فسفر قابل جذب ($mg\ kg^{-1}$)
لوم شنی	۱/۸	۷/۷۵	۰/۳۵	۱۲	۸/۵

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و برهم‌کنش باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر ارتفاع نهال، حجم ریشه، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه و غلظت فسفر اندام‌هوایی و ریشه نهال‌های پسته معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر شاخص‌های رشدی نهال‌های پسته

منبع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع نهال	حجم ریشه	وزن خشک اندام‌هوایی	وزن خشک ریشه	غلظت فسفر اندام‌هوایی	غلظت فسفر ریشه
باکتری	۲	۲۵/۷ **	۲۴/۲ **	۰/۳۲ **	۰/۲۱ **	۰/۰۱۷ **	۰/۰۲۲ **
کود فسفاتی	۲	۵۰/۵ **	۸/۴۱ **	۰/۲۱ **	۰/۱۵ **	۰/۰۲۴ **	۰/۰۳۲ **
باکتری × کود فسفاتی	۴	۱/۱۵ *	۰/۴۸ *	۰/۰۱۵ *	۰/۰۰۵ *	۰/۰۰۰۵ *	۰/۰۰۰۳ *
خطا	۱۸	۰/۳۴	۰/۱۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱
ضریب تغییرات		۵/۵۲	۱۱/۴۲	۶/۱۸	۴/۵۴	۶/۸۵	۳/۹۲

* و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد

نتایج نشان داد که تلقیح با باکتری‌های حل کننده فسفات PSB_1 و PSB_2 ارتفاع نهال‌های پسته را به‌ترتیب ۳۱ و ۲۳ درصد نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش داد. از طرفی کاربرد سنگ فسفات به تنهایی تأثیری بر ارتفاع نهال نداشت، ولی کاربرد آن با سویه‌های PSB_1 و PSB_2 ارتفاع نهال‌ها را به‌ترتیب ۶۳ و ۴۷ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد که از نظر آماری تفاوتی با کاربرد سوپرفسفات تریپل نداشت. بیشترین ارتفاع نهال از کاربرد همزمان سویه PSB_1 و سوپرفسفات تریپل (۱۵/۳ سانتی‌متر بر نهال) بدست آمد (جدول ۳). حسنی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی تاثیر تلقیح سویه‌های سودوموناس فلوروسنت با خصوصیات محرک رشدی مختلف بر رشد نهال‌های پسته نشان دادند که تلقیح با این باکتری‌ها موجب افزایش سطح برگ، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک نهال‌های پسته شد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تلقیح با باکتری‌ها موجب افزایش معنی‌دار حجم ریشه نسبت به شاهد شد که سویه PSB_1 در افزایش این پارامتر تأثیر بیشتری نسبت به سویه PSB_2 داشت. از طرفی اگرچه کاربرد سنگ فسفات تأثیر معنی‌داری بر حجم ریشه نشان نداد ولی، سوپرفسفات تریپل این پارامتر را ۸۰ درصد نسبتبه شاهد افزایش داد. کاربرد همزمان باکتری‌ها همراه با سنگ فسفات تأثیر بیشتری در افزایش حجم ریشه نسبت به کاربرد سوپرفسفات تریپل داشت، به‌طوری‌که کاربرد سنگ فسفات در تیمارهای تلقیح شده با سویه‌های PSB_1 و PSB_2 به‌ترتیب موجب افزایش ۳/۵ و ۲ برابری حجم ریشه نسبت به تیمار شاهد شد. هرچند، بیشترین تأثیر در افزایش حجم ریشه را کاربرد همزمان سوپرفسفات تریپل و سویه PSB_1 داشت (جدول ۳). یکی از مهم‌ترین اثرات باکتری‌های مفید خاک افزایش رشد رویشی گیاه از قبیل طول و تعداد ریشه‌ها و تکثیر ریشه‌های جانبی است. Zahir و همکاران (۲۰۰۸) نیز افزایش وزن تر و خشک گیاهان را در اثر تلقیح با باکتری‌های جنس سودوموناس گزارش کرده‌اند.

براساس نتایج بدست آمده، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه نهال‌های پسته تلقیح شده با سویه PSB_1 به‌ترتیب ۵۲ و ۳۹ درصد و در اثر تلقیح با سویه PSB_2 به‌ترتیب ۳۶ و ۱۹ درصد نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش نشان داد. هم‌چنین کاربرد سنگ فسفات بر وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار نبوده ولی کاربرد سوپرفسفات موجب افزایش ۵۳ درصدی وزن خشک اندام‌هوایی و ۳۳ درصدی وزن خشک ریشه نسبت به شاهد شد. از طرفی کاربرد همزمان باکتری‌های حل کننده فسفات و سنگ فسفات نقش بیشتری نسبت به کاربرد تنهای سوپرفسفات تریپل در افزایش وزن خشک نهال‌ها داشت. بیشترین وزن خشک اندام‌هوایی (۱/۳۹ گرم بر نهال) و ریشه (۱/۱۲ گرم بر نهال) از کاربرد همزمان سویه PSB_1 و سوپرفسفات تریپل بدست آمد (جدول ۳). باکتری‌های حل کننده فسفات علاوه‌بر تولید اسیدهای آلی و پروتون و کاهش pH محیط ریشه، با تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و تولید سیدروفور موجب افزایش وزن توده ریشه، افزایش رشد طولی و انشعابات فرعی و تولید ریشه‌های نازک‌تر شده و در نتیجه با افزایش دسترسی بیشتر به آب و عناصر غذایی، وضعیت تغذیه‌ای گیاه را بهبود داده و رشد و عملکرد آن را افزایش می‌دهند (Glick و همکاران ۲۰۰۷).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر شاخص‌های رشدی نهال‌های پسته

باکتری	کود فسفاتی			باکتری	کود فسفاتی		
	P_0	RP	TSP		P_0	RP	TSP
	ارتفاع نهال (سانتی‌متر بر نهال)				حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب بر نهال)		
PSB_0	۷/۲ f	۷/۸ f	۱۱/۵ cd	PSB_0	۱/۵ g	۱/۷ g	۲/۷ ef
PSB_1	۹/۵ e	۱۱/۸ bc	۱۵/۳ a	PSB_1	۳/۸ cd	۵/۳ b	۶/۴ a
PSB_2	۸/۹ e	۱۰/۶ d	۱۲/۸ b	PSB_2	۲/۱ fg	۳/۲ de	۴/۱ c
	وزن خشک اندام‌هوایی (گرم بر نهال)				وزن خشک ریشه (گرم بر نهال)		
PSB_0	۰/۷۵ f	۰/۸۱ e	۱/۱۵ cd	PSB_0	۰/۵۶ e	۰/۵۹ e	۰/۷۵ c
PSB_1	۱/۱۴ de	۱/۲۸ b	۱/۳۹ a	PSB_1	۰/۷۸ c	۰/۹۱ b	۱/۱۲ a
PSB_2	۱/۰۲ e	۱/۱۷ c	۱/۲۶ bc	PSB_2	۰/۶۷ d	۰/۷۹ c	۰/۹۳ b

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تلقیح با سویه‌های PSB_1 و PSB_2 غلظت فسفر اندام‌هوایی را به‌ترتیب ۶۳ و ۳۵ درصد و غلظت فسفر ریشه را به‌ترتیب ۶۰ و ۲۶ درصد نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش داد. از طرفی کاربرد سنگ فسفات اگرچه تأثیری بر غلظت فسفر اندام‌هوایی نداشت ولی، غلظت فسفر ریشه را ۱۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. کاربرد همزمان سنگ فسفات و سویه‌های PSB_1 و PSB_2 موجب افزایش غلظت فسفر

اندام‌هوایی به‌ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۷۲ درصد و غلظت فسفر ریشه به‌ترتیب برابر با ۹۳ و ۵۳ درصد نسبت به شاهد بدون تلقیح شد. بیشترین غلظت فسفر اندام‌هوایی (۰/۲۹ درصد) و ریشه (۰/۳۶ درصد) از کاربرد همزمان سویه PSB_1 و سوپرفسفات تریپل بدست آمد (جدول ۴). باکتری‌های حل کننده فسفات با تولید اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی، پروتون و هم‌چنین آنزیم فسفاتاز موجب افزایش فراهمی فسفات‌های کم‌محلول و فسفر آلی در خاک شده و جذب آن توسط گیاه را افزایش می‌دهند. نقش اسیدهای آلی در افزایش فراهمی فسفر به کاهش pH، کلات نمودن کاتیون‌ها و رقابت با فسفر جهت اشغال مکان‌های جذب در خاک نسبت داده می‌شود. کاربرد ریزجانداران بومی باغ‌های پسته همراه با خاک فسفات و گوکرد، علاوه‌بر افزایش رشد و جذب عناصر غذایی مانند فسفر، کارایی خاک فسفات را در شرایط شور افزایش داد (سرچشمه‌پور و همکاران ۱۳۹۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری‌های حل کننده فسفات و کودهای فسفاتی بر غلظت فسفر در نهال‌های پسته

باکتری	کود فسفاتی			باکتری	کود فسفاتی		
	P_0	RP	TSP		P_0	RP	TSP
	غلظت فسفر اندام‌هوایی (درصد)				غلظت فسفر ریشه (درصد)		
PSB_0	۰/۱۱ f	۰/۱۲ f	۰/۲۲ c	PSB_0	۰/۱۵ h	۰/۱۷ g	۰/۲۷ d
PSB_1	۰/۱۸ d	۰/۲۳ bc	۰/۲۹ a	PSB_1	۰/۲۴ e	۰/۲۹ c	۰/۳۶ a
PSB_2	۰/۱۵ e	۰/۱۹ d	۰/۲۴ b	PSB_2	۰/۱۹ f	۰/۲۳ e	۰/۳۱ b

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات توانست موجب افزایش رشد و غلظت فسفر در نهال‌های پسته گردد. از طرفی، اگرچه کاربرد تنهای سنگ فسفات تأثیر معنی‌داری بر رشد نهال‌های پسته نشان نداد ولی، کاربرد همزمان آن با باکتری‌های حل کننده فسفات موجب افزایش معنی‌دار شاخص‌های مورد مطالعه در این پژوهش شد. در بسیاری از شاخص‌های بررسی شده، تفاوت معنی‌داری بین تیمار سنگ فسفات و باکتری‌ها با کاربرد سوپرفسفات تریپل مشاهده نشد. هر چند، کاربرد همزمان باکتری‌های حل کننده فسفات و سوپرفسفات تریپل تأثیر بیشتری بر شاخص‌های مورد مطالعه نشان داد. بنابراین، کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات به‌ویژه همراه با خاک فسفات به‌عنوان یک نهاده ارزان قیمت، می‌تواند علاوه‌بر افزایش کارایی این نهاده، رشد و عملکرد نهال‌های پسته را افزایش داده و مصرف کود سوپرفسفات تریپل را کاهش دهد. این نتایج از جنبه‌های اقتصادی و زیست‌محیطی نیز حائز اهمیت است.

منابع

حسنی، گ.، اخگر، ع. و تاج‌آبادی پور، ا. ۱۳۹۱. بررسي تأثير تلقيح سويه‌هاي سودوموناس فلورسنت داراي توان توليد IAA و ACC دآميناز بر رشد نهال‌هاي پسته. پژوهش‌های خاک، ۲۶، ۹۷-۸۹.

سرچشمه‌پور، م.، بشارتی، ح. و ثواقبی، غ. ۱۳۹۴. افزایش کارایی خاک فسفات با استفاده از برخی ریزجانداران بومی باغ‌های پسته برای بهبود رشد و تغذیه دانهال‌های پسته در تنش شوری. پژوهش‌های خاک، ۲۹ (۳)، ۳۸۱-۳۷۱.

Adesemoye, A. O. and Kloepper, J.W. 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 1–12.

Azarmi, F., Mozaffari, V., Hamidpour, M. and Abbaszadeh-Dahaji, P. 2016. Interactive Effect of Fluorescent Pseudomonads Rhizobacteria and Zn on the Growth, Chemical Composition, and Water Relations of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Seedlings under NaCl Stress. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 47(8): 955-972.

Glick, B. R., Cheng, Z. and Czarny. J. 2007. Promoting of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. European Journal of Plant Pathology, 119: 329-339.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J. and Poole, P. S. 2002. Role of Soil Microorganisms in Improving P Nutrition of Plants, Food Security in Nutrient-stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Springer, pp. 133–143.

Khan, M. S., Zaidi, A. and Ahmad, E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 31–62.

Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H. N., Shaharoona, B. and Arshad M. 2008. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (Pisum sativum) under drought conditions. J Microbiol Biotechnol 18: 958-963.

Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P.A. 2009. Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-solubilizing Microbes. Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer, pp. 23–50.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The role of phosphate solubilizing bacteria and phosphate fertilizers on some growth parameters and phosphorus content in pistachio seedlings

Azarmi-Atajan[*1], F., Sayyari Zahan[2], M. H.

[1] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Birjand, Iran
[3] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Birjand, Iran

Abstract

The use of phosphate fertilizers is the most common method for supplying phosphorus needed by plants. Due to the calcareous condition of many pistachio garden soils in Iran, a large part of the fertilizers used in the soil are stabilized and their efficiency reduced. Application of phosphate solubilizing bacteria (PSB) is a suitable method for increasing soil phosphorus availability for plants. In this study, the effect of PSB (PSB_0, PSB_1 and PSB_2 represented control and two *Pseudomonas* sp. strains, respectively) and phosphate fertilizers (P_0, RP and TSP represented control, rock phosphate and triple super phosphate, respectively) were investigated on growth and P concentration of pistachio seedlings. The results showed that inoculation with PSB increased seedling height, root volume, shoot and root dry weight, and the concentration of P in shoot and root of pistachio seedlings. The simultaneous application of PSB_1 or PSB_2 with RP, increased seedling height by 63% and 47%, shoot dry weight by 70% and 56%, and P concentration of shoot by 100% and 72%, respectively, compared to the control. The combined application of TSP and PSB was more effective in increasing the studied indices. Thus, PSB can increase the efficiency of phosphate fertilizers in addition to improving plant phosphorus concentrations.

Keywords: Organic acids, PGPR, Pistachio, Rock phosphate, Chemical fertilizers

[*] Corresponding author, Email: farhadazarmi@birjand.ac.ir

شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر مواد آلی و مدت زمان خوابانیدن بر برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک‌های شور- سدیمی تحت تنش خشکی

محمد حسین مسلمی مهنی [۱*]، سعید شفیعی [۲]، حسن اعتصامی [۳]، حسین شکفته [۲]، شاپور کوهستانی بهراسمان [۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

[۲] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، [۳] استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تهران، [۴] استادیار گروه مهندسی آب، دانشگاه جیرفت

چکیده

ویژگی‌های شیمیایی خاک جزو مهمترین ویژگی‌های خاک محسوب می‌شوند که علاوه بر تأثیر مستقیم بر فعالیت ریزجانداران، بر ویژگی‌های فیزیکی خاک تأثیر چشم‌گیری داشته و عملکرد گیاه را نیز کاملا تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. اصلاح کننده‌های خاک شامل گروهی از ترکیبات‌اند که برای بهبود مشکلات شیمیایی و فیزیکی خاک مانند اسیدیته، تهویه، شوری، فعال کردن میکروارگانیسم‌های خاک توصیه می‌شوند. به منظور بهبود ویژگیهای شیمیایی یک خاک شور-سدیمی آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار نوع بقایای آلی (کنجد، کنوکالپوس، کینوا و خرما) در دو سطح (۱ و ۲) ، دو سطح تنش خشکی (۳۵ و ۷۵ درصد)، دو زمان خوابانیدن (۹۰ روز و ۱۸۰ روز) و یک نمونه شاهد انجام گردید. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد که نوع سطوح تنش خشکی و مقدار بقایای گیاهی ویژگی های قابلیت هدایت الکتریکی (EC) و pH خاک را تحت تاثیر قرار داده است. اگرچه زمان خوابانیدن تاثیر معنی‌داری بر قابلیت هدایت الکتریکی (EC) و pH نداشته است، اما با افزایش زمان خوابانیدن قابلیت هدایت الکتریکی (EC) و pH افزایش یافت. با افزایش سطح کاربرد بقایای گیاهی در خاک قابلیت هدایت الکتریکی (EC) افزایش و pH خاک نسبت به شاهد کاهش یافت.

کلمات کلیدی: اصلاح کننده، خرما، کینوا، کنجد، کنوکالپوس، هدایت الکتریکی

مقدمه

شوری پس از خشکی از مهمترین و متداول‌ترین تنش‌های محیطی در سطح جهان و از جمله ایران است (Akhaii and Ghorbanli, 1993). خاک‌هایی با غلظت بالای نمک‌ها، اسیدیته و نسبت جذب سدیم بالا، مجموعاً بعنوان خاک‌هایی که تحت تاثیر شوری قرار داشته‌اند تعریف می‌شوند. عموماً، اول خاک شور می‌شود و بعد با جایگزین شدن سدیم بجای کلسیم و منیزیم در محل‌های تبادل کاتیون، خاک‌ها وضعیت سدیمی پیدا می‌کنند. خاک‌های شور-سدیمی معمولاً خصوصیات فیزیکی ضعیفی دارند، به‌طوری‌که نفوذپذیری آب در آن‌ها کم است. خاک‌های شور-سدیمی پایداری خاکدانه‌ها در آنها کم بوده و در این خاک‌ها ورودی موادآلی کمتر و تنش سدیم بالاتر موجب می‌شود مقدار زیادی از موادآلی موجود به شدت معدنی شوند و خاکدانه‌ها تخریب شوند (Qadir و همکاران ۲۰۰۷). شور و سدیمی شدن خاک از جنبه‌های مهم تخریب اراضی به ویژه در مناطق‌خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود. از دیگر مشکلات خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک ایران می‌توان به بالا بودن pH و آهک آنها اشاره کرد که باعث کاهش قابلیت جذب برخی از عناصر غذایی مثل فسفر، آهن و روی توسط گیاه می‌گردد (ملکوتی و همایی، ۱۳۷۳). این خاک‌ها عموما دارای ماده آلی کمتر از یک درصد هستند که این مسئله به علت تشکیل خاکدانه‌های ضعیف باعث ناپایداری ساختمان خاک در این مناطق گردیده است (Eghbal *et*

* ایمیل نویسنده مسئول: mohammadhoseinmoslemi71@gmail.com

(Shirani *et al*., 2002 ;Hagabbasi and Hemmat, 2000; *al*., 1996). ویژگی‌های شیمیایی خاک جز مهمترین ویژگی‌های خاک محسوب می-شوند که علاوه بر تأثیر مستقیم بر فعالیت ریزجانداران، بر ویژگی‌های فیزیکی خاک تأثیر چشم‌گیری داشته و عملکرد گیاه را نیز کاملا تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. اینگونه به نظر می‌رسد، تجزیه و تحلیل ویژگی‌های شیمیایی خاک بتواند بخشی از توانایی خاک در تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاه را آشکار کند (Foth, 1990). برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک از قبیل هدایت الکتریکی و pH جز ویژگی‌هایی هستند که در اکثر مطالعات آب و خاک مورد بررسی قرار گرفته‌اند و حتی هدف خیلی از مطالعات بهبود این ویژگی‌های به منظور افزایش قدرت حاصلخیزی خاک نیز بوده است. اهمیت تعیین pH خاک به این دلیل است که بر قدرت حلالیت محلول خاک و متعاقب آن بر میزان جذب مواد غذایی توسط گیاهان تأثیر می‌گذارد (Brady, 1990). هدایت الکتریکی خاک از این جهت مورد بررسی قرار می‌گیرد که با افزایش آن گیاه بایستی انرژی بیشتری برای جذب آب مصرف کند (Bauder and Brock, 2001). عوامل مختلفی ویژگی‌های شیمایی خاک را تحت تأثیر خود قرار می‌دهند که شاید اضافه کردن انواع اصلاح کننده و کیفیت آب آبیاری از جمله عوامل بسیارمؤثر در این خصوص باشند.

اصلاح کننده‌های خاک شامل گروهی از ترکیبات‌اند که برای بهبود مشکلات شیمیایی و فیزیکی خاک مانند اسیدیته، تهویه، شوری، فعال کردن میکروارگانیسم‌های خاک توصیه می‌شوند. در نتیجه با استفاده از آنها سرعت چرخش عناصر در خاک بیشتر شده و عناصر غذایی در دسترس ریشه‌ها قرار می‌گیرند. کاربرد مواد آلی اصلاح کننده غالبا می‌تواند راهکاری مناسب در اصلاح ویژگی‌های فیزیکی و بهبود باروری خاک‌های شور و سدیمی باشد (Yuan و همکاران ۲۰۰۷). اگرچه حاصلخیزی کم زمین‌های شور به مقادیر زیاد نمک‌ها نسبت داده می‌شود، اما کاهش ماده‌آلی و فراهمی عناصر غذایی ضروری به ویژه نیتروژن، فسفر و پتاسیم نیز از عوامل اصلی کاهش حاصلخیزی خاک‌های شور است، به طوریکه نگرانی‌ها در مورد خطرات شوری و کاهش کیفیت اکوسیستم‌های کشاورزی موجب توسعه عملیات مدیریتی جهت حفظ ذخایر و حاصلخیزی خاک شده است. Casado-vela و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند کاربرد لجن فاضلاب در مناطق خشک و نیمه خشک که مواد آلی خاک کمتر از ۱/۷ درصد است مفید است. لجن فاضلاب علاوه بر تاثیر بر غلظت عناصر غذایی موجود در خاک، بر خواص شیمیایی خاک از قبیل pH ، هدایت الکتریکی و ظرفیت تبادل کاتیونی نیز اثر می‌گذارد. از طرفی وجود مقدار فراوان ماده آلی در ترکیب لجن فاضلاب، ویژگی‌های فیزیکی خاک از جمله هدایت هیدرولیکی، پایداری خاکدانه‌ها و رطوبت خاک را برای رشد بهتر گیاهان بهبود می‌بخشد (افیونی و همکاران، ۱۳۷۷ ;Bauer and Black, 1992).

با توجه به اینکه کشور ایران در منطقه‌ی خشک و نیمه‌خشک قرارگرفته است، مقدار ماده آلی در خاک بسیار اندک است. بنابراین کاربرد اصلاح-کننده‌های آلی در این خاک‌ها جهت حفظ پایداری خاک الزامی است. داشتن دانش کافی درباره توسعه زمین‌های شور و سدیمی، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی این خاک‌ها، مقاومت گیاهان به شوری یا سدیم می‌تواند در بهره‌وری بهینه از این‌خاک‌ها موثر باشد. این تحقیق تاثیر اصلاح کننده‌های آلی بر برخی ویژگی‌های شیمیایی یک خاک شور و سدیمی تحت تنش خشکی را مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر اصلاح کننده‌های آلی بر برخی ویژگی‌های شیمیایی در خاک شور سدیمی تحت تنش خشکی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در شرایط گلخانه اجرا شد. جهت انجام این تحقیق نمونه‌برداری از خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری از منطقه اطراف شهرستان جیرفت با مختصات جغرافیایی (28°35’20/9”N ; 57°48’38/8”E) انجام شد. برخی از ویژگی‌های اولیه خاک و اصلاح کننده‌های آلی مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارها شامل چهار نوع اصلاح کننده در دو سطح (۲ و ۴ درصد)، دو سطح تنش خشکی (۳۵ و ۷۰ درصد)، دو زمان خوابانیدن (۹۰ روز و ۱۸۰ روز) و شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های شیمیایی اولیه خاک و اصلاح کننده‌های آلی مورد استفاده در این مطالعه

پارامتر	واحد	مقدار				
		خاک	کنجد	خرما	کنو کالپوس	کینوا
pH	---	۸	۸/۱۵	۸/۰۶	۷/۷۹	۸/۱۹
قابلیت هدایت الکتریکی (EC)	$dS\ m^{-1}$	۲۵	۶/۲۸	۸/۰۹	۶/۲۸	۶/۹۵

مراحل اجرای طرح بدین صورت بود که در ابتدا اصلاح‌کننده‌ها به خاک گلدان‌های ۶ کیلوگرمی اضافه شدند. نمونه‌ها در رطوبت ۳۵ و ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه به مدت سه ماه انکوباسیون(خوابانیده) شدند. سپس نمونه‌برداری از خاک گلدان‌ها انجام شد، نمونه خاک‌ها را پس از هوا خشک شدن از الک ۲ میلی متری عبور داده به ازمایشگاه منتقل و برخی ویژگی‌های شیمیایی آنها طبق دستور العمل موسسه تحقیقات خاک انجام شد(شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک، ۱۳۷۲). اندازه‌گیری قابلیت هدایت الکتریکی و pH خاک در عصاره ۱:۵ خاک به آب انجام شد. داده‌های حاصل از آزمایش با نـرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسهٔ میـانگین‌هـا بـا آزمـون دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.

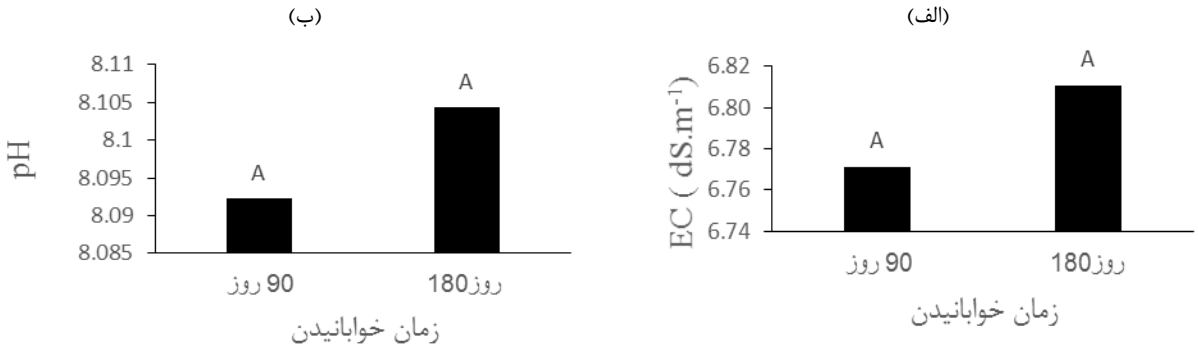
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی سطوح تنش، سطوح اصلاح کننده‌ها و و اثر متقابل دوگانه این فاکتورها با هم بر روی هدایت الکتریکی (EC) خاک و اثرات اصلی سطوح تنش و سطوح اصلاح کننده‌ها بر روی pH خاک در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد با افزایش زمان خوابانیدن خاک، مقدار هدایت الکتریکی (EC) و pH در همه تیمارها افزایش یافت اما به لحاظ آماری این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۱). عبدالهی قراولی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند هدایت الکتریکی خاک با گذشت زمان، از ۳۰ روز به ۹۰ و ۱۸۰ روز به طور معنی‌داری افزایش یافت. دلیل آن می‌تواند این باشد که گذشت زمان و انکوباسیون در شرایط رطوبتی و حرارتی مناسب باعث انحلال و آزادسازی تدریجی املاح موجود در اصلاح کننده‌ها گردید.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس زمان خوابانیدن، سطوح تنش، سطوح بقایا و اثرات متقابل تنش و سطوح بقایا بر ویژگی‌های شیمیایی خاک

منابع تغییرات		میانگین مربعات	
	درجه آزادی	قابلیت هدایت الکتریکی (EC)	pH
سطوح تنش	۱	۹/۸۷۴۰۹۲۵۷*	۰/۱۶۴۷۸۵۰۹*
زمان	۱	۰/۰۴۲۷۳۴۵۲ns	۰/۰۰۳۹۵۱۳۸ns
سطوح بقایا	۸	۶/۰۸۲۸۰۷۸۶*	۰/۳۸۲۲۰۷۲۵*
سطوح تنش× سطوح بقایا	۸	۸/۶۶۹۳۰۸۷۴*	۰/۰۳۳۷۵۲۷۶ns
خطا آزمایشی	۷۲	۲/۱۹۲۱۱۲۸	۰/۰۱۹۸۹۱۶۷
ضریب تغییرات	---	۲۱/۸۰۲۰۱	۱/۷۴۱۵۴۶

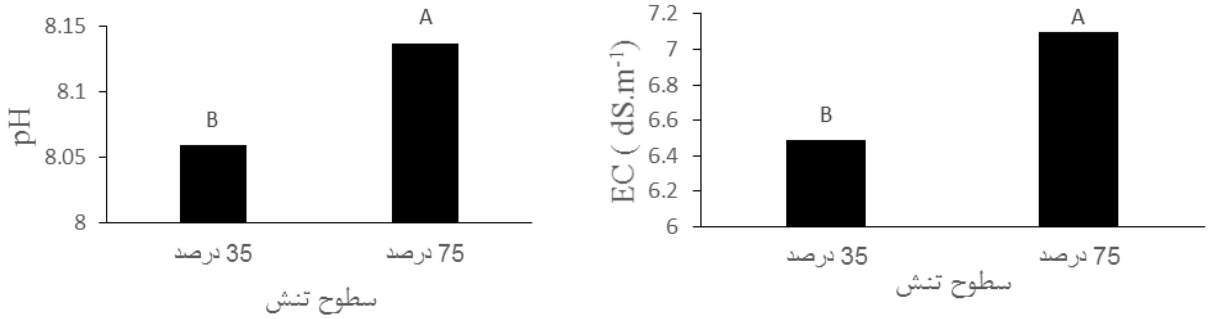
ns و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد.



شکل ۱- تاثیر زمان خوابانیدن بر مقدار هدایت الکتریکی (EC (الف)) و مقدار pH (ب)

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با افزایش سطح تنش، مقدار هدایت الکتریکی (EC) و pH در همه تیمارها افزایش یافت، بطوریکه مقدار هدایت الکتریکی از ۶/۴۸ دسی‌زیمنس بر متر در سطح تنش ۳۵ درصد به مقدار۷/۰۹ دسی‌زیمنس بر متر در سطح تنش ۷۵ درصد رسید (شکل ۲ (الف)). کمترین مقدار pH مربوط به سطح تنش ۳۵ درصد و برابر با ۸/۰۵ و بیشترین مقدار آن مربوط به سطح تنش ۷۵ درصد و برابر ۸/۱۳ بود (شکل ۲(ب)). عشقی زاده و همکاران (۱۳۹۴) هم افزایش هدایت الکتریکی و pH را در خاک تحت تاثیر تنش خشکی و شوری گزارش کردند که این نتایج با نتایج حاضر همخوانی داشت. دلیل افزایش در مقدار هدایت الکتریکی و pH با افزایش سطح تنش می‌تواند بدلیل افزایش میزان نمک فلزات قلیایی و مقدار املاح باشد.

(ب) (الف)

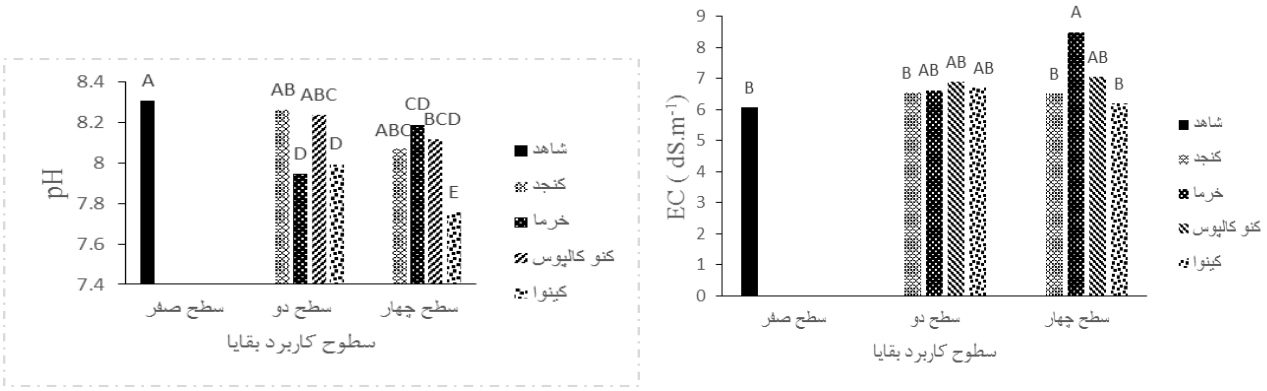


شکل ۲- تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر مقدار هدایت الکتریکی (EC (الف)) و مقدار pH (ب)

نتایج این تحقیق نشان داد کاربرد اصلاح کننده‌ها موجب کاهش مقدار pH نسبت به شاهد شده است، ولی بسته به نوع اصلاح کننده و سطوح کاربرد متفاوت است. مقدار pH در شاهد ۸/۳۱ بود که با کاربرد اصلاح کننده‌ها این مقدار کاهش یافت. بطوریکه کمترین مقدار pH مربوط به سطح کاربرد چهار درصد در بقایای کینوا و برابر با ۷/۷۵ بود. با افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها از دو درصد به چهار درصد مقدار pH در بقایای کنجد، کنوکالپوس و کینوا کاهش یافته اما در بقایای خرما روند افزایشی داشته است اما بررسی‌های آماری نشان داد این اختلاف‌ها معنی دار نبوده فقط در بقایای کینوا افزایش سطح موجب کاهش معنی‌دار مقدار pH شده است (شکل ۳ (ب)). Wang و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند افزودن لجن فاضلاب به مقادیر ۲۵، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۵۰ گرم بر کیلوگرم به یک خاک شنی، پس از ۷۰ روز انکوباسیون به علت افزایش CO_2 آزاد شده در اثر فعالیت میکروبی باعث کاهش معنی‌دار pH خاک گردید. همچنین خدیوی بروجنی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش کردند با افزایش سطوح و دفعات کوددهی با لجن فاضلاب pH کاهش یافت، ولی این کاهش به علت ظرفیت بالای بافری خاک معنی‌دار نبود.

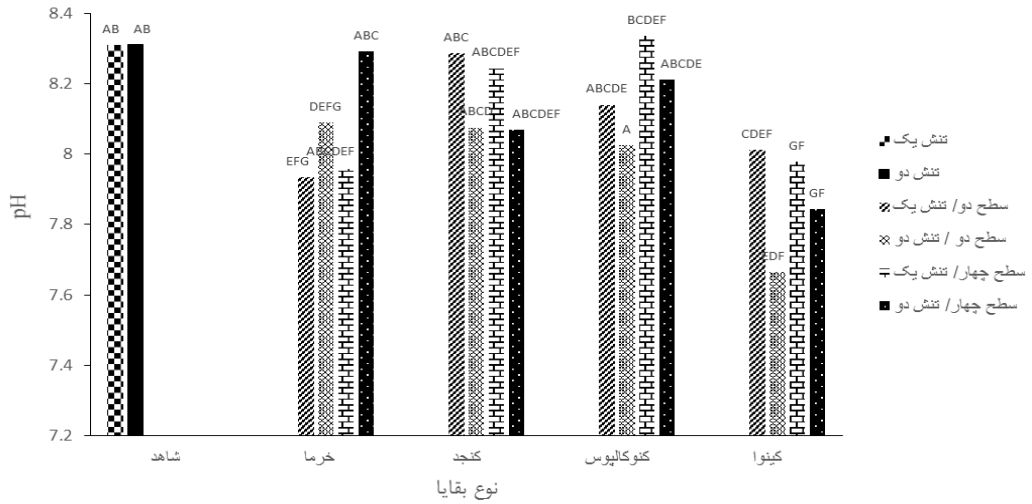
افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها تاثیر معنی‌داری بر هدایت الکتریکی (EC) نداشته تنها سطح چهار درصد در بقایای خرما موجب افزایش هدایت الکتریکی خاک نسبت به شاهد شده است (شکل ۳ (الف)). نتایج آزمایش گلخانه ای Wangو همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که افزودن لجن فاضلاب به مقادیر ۲۵، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۵۰ گرم بر کیلوگرم در یک خاک شنی، پس از ۷۰ روز انکوباسیون باعث افزایش معنی‌دار هدایت الکتریکی همه تیمارها گردید که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر تا حد زیادی همخوانی نداشت.

(ب) (الف)



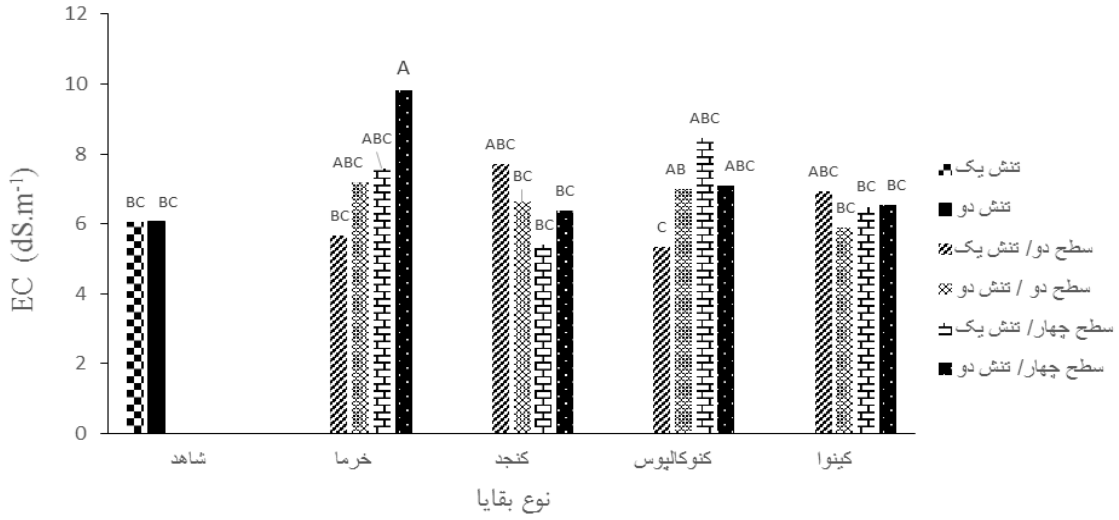
شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف کاربرد بقایا بر مقدار هدایت الکتریکی(EC (الف)) و مقدار pH (ب)
نتایج اثر متقابل سطوح

نتایج اثر متقابل سطوح تنش با سطوح کاربرد اصلاح کننده‌ها نشان داد که کمترین (۷/۶۶) و بیشترین (۸/۳۳) مقدار pH به ترتیب از تیمارهای سطح کاربرد دو درصد اصلاح کننده در سطح تنش ۷۵ درصد در بقایای کینوا و سطح کاربرد دو درصد اصلاح کننده در سطح تنش ۷۵ درصد در بقایای کنوکالپوس حاصل شد (شکل ۴). همانگونه که در شکل نشان داده شده است در سطح تنش ۳۵ درصد با افزایش سطح کاربرد مقدار pH در بقایای خرما و کنوکالپوس روند افزایشی و در بقایای کنجد و کینوا روند کاهشی داشته است، اما هیچ‌کدام به لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است. در سطح تنش ۷۵ درصد با افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده ها مقدار pH روند افزایشی داشته و بیشترین مقدار مربوط به بقایای خرما می‌باشد. ابریشم و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثر سه سطح مصرف ماده اصلاح کننده زئولیت (صفر، ۱۰، و ۱۵ درصد وزنی) و تیمار آبیاری (آبیاری معمول در منطقه: هر ۳۰ روز یکبار و کم آبیاری: هر ۶۰ روز یکبار) مشاهده کردند با افزایش سطح کاربرد ماده اصلاح کننده و تنش آبیاری تغییرات pH به لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است. همچنین وفایی و همکاران (۱۳۹۷) با بررسی اثر گچ (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد نیاز گچی) به تنهایی و توام با کاربرد مواد آلی از منابع مختلف (بدون بقایا، بقایای گیاه یونجه، ضایعات میوه خرما، بقایای گیاه ذرت و خاک اره) به میزان ۱/۵ و ۳ درصد گزارش کردند بقایای مانند خاک اره تاثیری بر اصلاح خاک سدیمی نداشت که دلیل آن مقاومت زیاد به تجزیه میکروبی می‌باشد و بر عکس ضایعات میوه خرما به دلیل تجزیه بیشتر نقش موثرتری در اصلاح خاک سدیمی داشت. همچنین pH خاک پس از کاربرد گچ و کربن آلی پس از آبشویی در همه تیمارها کاهش یافت.



شکل ۴- اثرات متقابل سطوح مختلف کاربرد بقایا و سطوح مختلف تنش خشکی بر مقدار pH

هدایت الکتریکی در سطح تنش ۳۵ درصد با افزایش سطوح کاربرد اصلاح کننده‌ها در بقایای خرما و کنوکالپوس روند افزایشی هدایت و در بقایای کنجد و کینوا روند کاهش داشته است(شکل ۵). به طور کلی افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها در سطح تنش ۳۵ درصد تاثیر معنی‌داری بر مقدار هدایت الکتریکی (EC) خاک نداشته است. سطح تنش ۷۵ درصد فقط در بقایای خرما با افزایش سطح کاربرد مقدار هدایت الکتریکی (EC) به طور معنی‌داری افزایش یافته است. ابریشم و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثر سه سطح مصرف ماده اصلاح کننده زئولیت (صفر، ۱۰، و ۱۵ درصد وزنی) و تیمار آبیاری (آبیاری معمول در منطقه: هر ۳۰ روز یکبار و کم آبیاری: هر ۶۰ روز یکبار) مشاهده کردند با افزایش سطح کاربرد ماده اصلاح کننده و تنش آبیاری تغییرات هدایت الکتریکی به لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.



شکل ۵ – اثرات متقابل سطوح مختلف کاربرد بقایا و سطوح مختلف تنش خشکی بر هدایت الکتریکی (EC)

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد با افزایش زمان خوابانیدن خاک، مقدار هدایت الکتریکی (EC) و pH در همه تیمارها افزایش یافت اما به لحاظ آماری این افزایش معنی‌دار نبود. دلیل آن می‌تواند این باشد که گذشت زمان و انکوباسیون در شرایط رطوبتی و حرارتی مناسب باعث انحلال و آزادسازی تدریجی املاح موجود در اصلاح کننده‌ها گردید. با افزایش سطح تنش، مقدار هدایت الکتریکی (EC) و pH در همه تیمارها افزایش یافت احتمالا بدلیل افزایش میزان نمک فلزات قلیایی و مقدار املاح باشد. کاربرد اصلاح کننده موجب کاهش مقدار pH نسبت به شاهد شده است، ولی بسته به نوع اصلاح کننده و سطوح کاربرد متفاوت است. با افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها از دو درصد به چهار درصد مقدار pH در بقایای کنجد، کنوکالپوس و کینوا کاهش یافته اما در بقایای خرما روند افزایشی داشته است اما بررسی های آماری نشان داد این اختلاف ها معنی دار نبوده فقط در بقایای کینوا افزایش سطح موجب کاهش معنی‌دار مقدار pH شده است، افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها تاثیر معنی‌داری بر هدایت الکتریکی (EC) نداشته است.

اثر متقابل سطوح تنش با سطوح کاربرد اصلاح کننده‌ها نشان داد در سطح تنش ۳۵ درصد با افزایش سطح کاربرد مقدار pH به لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است. در سطح تنش ۷۵ درصد با افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها مقدار pH روند افزایشی داشته و بیشترین مقدار مربوط به بقایای خرما می‌باشد. افزایش سطح کاربرد اصلاح کننده‌ها در سطح تنش ۳۵ درصد تاثیر معنی‌داری بر مقدار هدایت الکتریکی (EC) خاک نداشته است. سطح تنش ۷۵ درصد فقط در بقایای خرما با افزایش سطح کاربرد مقدار هدایت الکتریکی (EC) به طور معنی‌داری افزایش یافته است. به طور کلی با افزایش سطح تنش خشکی مقدار هدایت الکتریکی و pH هر دو افزایش می‌یابد و درسطوح مختلف اصلاح کننده‌ها مقدار آن متفاوت است.

منابع

آذین ابطحی، آ.، هودجی، م.، و افیونی، م. ۱۳۹۲. تاثیر پسماندهای آلی بر خواص شیمیایی خاک و قابلیت جذب عناصر کم مصرف(روی و آهن) توسط گیاه ذرت در دو خاک آهکی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)جلد ۲۷، شماره ۱، ۱۰.

ابریشم، ا.ا.، جعفری، م.، و طویلی، ع. ۱۳۹۳. اثر تنش خشکی و کاربرد زئولیت بر برخی خصوصیات خاک و ویژگی‌های رویشی گونه *Holothamnus glaucus* در مناطق خشک. نشریه علمی پژوهشی مرتع، سال نهم، ش ۲، ص ۱۲۸-۱۲۰.

خدیوی بروجنی، ا.، نور بخش، ف.، افیونی، م.، و شریعتمداری، ح. ۱۳۸۶. شکلهای مختلف سرب، نیکل و کادمیم در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال یازدهم، ش ۱، ص ۴۱-۵۳.

عشقی زاده، ح.ر.، کافی، م.، نظامی، ا.، خوشگفتارمنش، ا.ح.، و کرمی، م. ۱۳۹۴. تاثیر کم آبیاری و تنش شوری در تولید ارزن پادزهری بر برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک. نشریه علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، سال نوزدهم، ش ۷۳.

علی احیایی، م.، و بهبهانی زاده، ع. ا. ۱۳۷۲. شرح روشهای تجزیه شیمیایی خاک، جلد اول. شماره ۸۹۳.

عبد الهی قراولی، ف.، اصغری، ش.ا.، و علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۹. اثر لجن بیولوژیکی کارخانه پتروشیمی تبریز بر برخی خصوصیات شیمیایی و بیولوژیکی خاک مزرعه تحقیقاتی بابلان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی.

ملکوتی، م.ج.، و همایی، م. ۱۳۷۳. حاصلخیزی مناطق خشک (مشکلات و راه حل ها). انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، چاپ اول، ص ۱۰۰-۱۰۴.

افیونی، م.، رضایی نژاد، ی.، و خیامباشی، ب. ۱۳۷۷. اثر لجن فاضلاب بر عملکرد و جذب فلزات سنگین به وسیله کاهو و اسفناج. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ج ۲، ش ۱، ص ۱۹-۲۹.

وفایی، م.، گلچین، ا.، و شفیعی، س. ۱۳۹۷. تاثیر گچ، کربن آلی و مدت زمان خوابانیدن بر برخی ویژگی‌های یک خاک سدیمی. نشریه پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب)، جلد۳۳، شماره ۱.

Akhaii, H., and Ghorbanli, M. 1993. A contribution to the halophytic vegetable and flora of Iran. In: Leith and A. A. Almasson (eds) towards the rational use of high salinity tolerant. National Mastitis Council. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfections published since 1980. Pages 82–92 in Natl. Mastitis Counc. Reg. Mtg. Proc., Harrisburg, PA. Natl. Mastitis Counc., Inc., Madison, WI.

Bauder, J.W., and Brock, T.A. 2001. Irrigation water quality, soil amendment, and crop effects on sodium leaching. *Arid* Land Research and Management. 15:101-113.

Bauer, A., and Black, A. L. 1992. Organic carbon effect on available water capacity of three soil textural groups. J. Soil. Sci. Am. 24; 527-534.

Brady, N.C. 1990. The Nature and Properties of Soils (10th Edn.). Macmillan, New York.

Casado-vela, J., Selles, S., Navarro, J., Bustamanate, M. A., Mataix, J., Guerrero, C., and Gomez, I. 2005. Evaluation of composted sewage sludge as nutrional source for horticultural soils. Waste Manage. 26: 946-952.

Eghbal, M. K., Hajabbasi, M. A., and Golsefidi, H. T. 1996. Mechanism of crust formation on a soil in central iran. Plant and Soil. 180: 67-73.

Foth, H. 1990. Fundamentals of Soil Science(8th Edn). John Wiley & Sons, New York.

Hajabbasi, M.A., and Hemmat, A. 2000. Tillage impact on aggragate stability and crop productivity in a clay loam soil in central iran. Soil and tillage research. 56: 205-212.

Qadir, M., Oster, J.D., Schubert, S.A., Noble, D., and Sahrawat, K. L. 2007. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. Advances in Agronomy.96: 197-247.

Shirani, H., Hajabbasi, M.A., Afyuni, M., and Hemmat, A. 2002. Effect of farmyard and tillage system on soil phtsical properties and corn yield in central iran. Soil and tillage research. 68: 101-108.

Wang, J.W.C., Lai, K.M., Fang, M., and Ma, K.K. 1998.Effect of sewage sludge amendment on soil microbial activity and nutrient mineralization. Environment International. 24: 935-943.

Yuan, B.C., Li, Z.Z., Liu, H., Gao, M., and Zhang, Y.Y. 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Applied Soil Ecology.35(2): 319-328.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of organic matter and incubation times on some chemical properties of a salin- sodic soil under drough stress

Moslemi Mehni[*1], M.H., Shafiei[2], S., Etesami[3], H., Shekofteh, H., [2] Kohestani Bahrasman[4], Sh.

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Jiroft, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Jiroft, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Tehran, Iran
[4] Assistant Prof., Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture University of Jiroft, Iran

Abstract

Chemical characteristics of the soil are considered as the most significant properties of which in addition to direct impact on microorganisms, impact significantly on physical properties of soil and also influence the plant's function, quietly. Soil modifiers include a group of compounds that are recommended to improve soil chemical and physical properties such as acidity, ventilation, salinity, and soil activation of microorganisms. In order to improve the chemical features of a saline soil, an experiment carried out In perfectly randomized design with for types of Organic debris (Sesame, Konokalpos, Kinova and dates) in two levels (1 and 2 percent), two levels of dryness stress (35 and 75 % of the field capacity), two times of keeping (90 and 180 days) and one control sample. The analysis of data variance indicated that the dryness stress levels, type and amount of plant residues had a affected the electrical conductivity and salinity-sodium pH, considerably. Although the time of keeping, had not a meaningful impact on electrical conductivity and salinity-sodium pH, by increasing the keeping time electrical conductivity and pH will be raised. By increasing the application level of the residues, the soil electrical conductivity increased and the pH of the soil decreased compared to the control.

Keywords: corrector, dates, electrical conductivity, Konokalpos, Kinova, Sesame

[*] Corresponding author, Email: mohammadhoseinmoslemi71@gmail.com

محورهای مقالات (فارسی و انگلیسی)

Topics	محورها
Water Erosion, Flood , Soil and Water Conservation	فرسایش آبی، سیلاب و حفاظت خاک و آب
Dust, Environmental Problems and Controlling Methods	گرد و غبار، مسائل زیست‌محیطی و مهار آن
Soil Physics and Plant Growth	فیزیک خاک و رشد گیاه
Water Deficit Stress and Methods of Water Conservation	تنش کم‌آبی گیاه و روش‌های نگهداری آب در خاک
Soil and Climate Change	خاک و تغییر اقلیم
Soil Chemistry	شیمی خاک
Soil Fertility, Plant Nutrition and Greenhouse Cultivation	حاصلخیزی خاک، تغذیه گیاه و کشت گلخانه‌ای
Soil Biology and Biofertilizers	بیولوژی خاک و کودهای زیستی
Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation	آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی
Soil Genesis and Classification	پیدایش و رده‌بندی خاک
Pedometery and Soil Evaluation	پدومتری و ارزیابی خاک‌ها
Novel Technologies in Soil Science	فناوری‌های نوین در علوم خاک
Soil Quality and Sustainable Soil Management	کیفیت خاک و مدیریت پایدار خاک
Challenges Facing Soil Science Graduates and Users	مسائل اشتغال فارغ‌التحصیلان و بهره‌برداران خاک
Soil, Culture, Art and Clarifying its Importance	خاک، فرهنگ، هنر و ترویج جایگاه آن
Specific Topics	محورهای ویژه
Soil Erosion and Sedimentation in Zanjan’s Marl Formations	فرسایش خاک و رسوب در سازندهای مارنی زنجان
Soil and Water Pollution and Crop Health	آلودگی خاک و آب و سلامت محصولات کشاورزی
The Soltanieh Rangeland and its Remediation	چمنزار سلطانیه و راهکارهای احیاء آن
Waste Management to Reduce Environmental Risks	مدیریت پسماند برای کاهش خطرات زیست‌محیطی

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد، قارچ میکوریز و قارچ اندوفیت بر جذب برخی عناصر در گیاه گندم تحت شرایط شور

زهرا رویدل*[۱]، محسن برین[۲]، میرحسن رسولی صدقیانی[۳]، مریم خضری[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۳] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۴] استادیار گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

شوری خاک از جمله ویژگی‌های پویای خاک است که بشر از هزاران سال پیش در مبارزه با آن بوده است استفاده از کودهای بیولوژیک جهت بهبود تغذیه غلات به عنوان یکی از راه‌حل‌های اساسی و مفید در شرایط تنش شوری مطرح می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد (Pseudomonace fluorescens, Stenotrophomonas maltofilia, Pseudomonace aeruginose)، قارچ میکوریز آربوسکولار (Glomus versiform, Glomus fasciulatum, Glomus intraadices) و قارچ Pirformospora indica بر روی میزان جذب عناصر (NPK) گیاه گندم در شرایط شور بررسی شد. آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل شامل دو فاکتور میکروبی (چهار سطح) و شوری (سه سطح) در سه تکرار انجام شد. گیاهان بعد از ۶۰ روز برداشت شدند. نتایج نشان داد که اثر اصلی سطوح شوری و میکروبی بر نیتروژن، فسفر و پتاسیم معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) بود همچنین اثر متقابل شوری و تلقیح میکروبی بر غلظت نیتروژن ($P <۰/۰۱$) و فسفر ($P <۰/۰۰۱$) معنی‌دار بود در بین تیمارهای میکروبی بیشترین غلظت نیتروژن در تیمار میکروبی قارچ اندوفیت با ۲/۵۲۹ درصد و بیشترین غلظت فسفر با ۰/۴۸۶ و ۰/۴۷۳ به ترتیب مربوط به تیمار میکوریز و باکتری در شرایط غیر شور بدست آمد. بیشترین مقدار پتاسیم در بین تیمارهای میکروبی ۲/۰۵۶ درصد مربوط به تیمار باکتری بود چنین استنباط می‌گردد که تحت تنش شوری می‌توان از ریزجانداران محرک رشد بعنوان افزاینده رشد گیاهان بهره گرفت.

کلمات کلیدی: کشاورزی پایدار، تلقیح میکروبی، گندم، باکتری‌های محرک رشد گیاه

مقدمه

خاک شور خاکی است که دارای غلظت زیادی از املاح محلول باشد که در رشد گیاه اختلال ایجاد کند (Lauchli and Grattan, 2007). محلول خاک های شور دارای مقدار زیادی املاح محلول است که کاتیون ها و آنیون های غالب آن را Na^{+}، K^{+}، Mg^{2+}، Ca^{2+}، Cl^{-} و SO_4^{2-} تشکیل می دهند در محیط شور پتانسیل اسمزی آب خاک منفی است و جذب آب از چنین خاکی ضرورت تغذیه جمعیت رو به رشد، در کنار مبارزه با آلودگی خاک، شوری خاک و بیابانزایی اهمیت حیاتی به پژوهش‌های بهره‌وری خاک و گیاه داده است در چنین شرایط محیطی، بهبود بهره‌وری محصول علاوه بر بیوتکنولوژی مناسب به برهمکنش ریشه گیاهان با ریزجانداران خاک به منظور حفظ سلامت خاک نیاز دارد هزینه زیاد تولید کودهای شیمیایی و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از استفاده از این کودها لزوم تجدید نظر در روش‌های افزایش تولید محصولات زراعی را دوچندان نموده است استفاده از کودهای بیولوژیک جهت بهبود تغذیه غلات به عنوان یکی از راه‌حل‌های اساسی و مفید مطرح می‌شود این کودها با افزایش قابلیت جذب و دسترسی عناصر غذایی گیاهان و افزایش تحمل آنها به کمبود عناصر غذایی از مولفه‌های مهم مدیریت حاصلخیزی خاک در جهت نیل به اهداف کشاورزی پایدار می‌باشند (مغز اردلان و ثوابقی فیروزآبادی، ۱۳۸۱). میکروارگانسیم‌های زیادی وجود دارند که در محیط ریشه زندگی می‌کنند و رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند از میان این میکروارگانسیم‌ها برخی دارای اثرات مثبت بر رشد گیاه می‌باشند کاربرد باکتری‌های محرک رشد علاوه بر فراهمی عناصر غذایی از تشدید تنش اسمزی که بر اثر افزودن کودهای شیمیایی نه تنها باعث تخریب ساختار فیزیکی شیمیایی و بیولوژیک خاک می‌شود بلکه کیفیت محصول تولید شده را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (Koochaki et al., 2008). باکتری‌های محرک رشد PGPR، قارچ میکوریز و قارچ اندوفیت از جمله این میکروارگانسیم‌ها است که در تهیه کودهای بیولوژی مورد استفاده قرار تلقیح قارچ میکوریز با گیاهان گندم و ذرت موجب افزایش غلظت روی و ماده خشک شد همچنین آنها بیان داشتند که شاخص‌های مذکور در شرایط کاربرد عنصر Zn و تلقیح قارچ میکوریز با گیاهان نسبت به کاربرد انفرادی این عنصر افزایش یافت اگرچه تحقیقات متعددی با استفاده از قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه در شرایط کمبود Zn صورت

[۱] نویسنده مسئول: zahra.rouedll@gmail.com

گرفته است (Swaminathan, 1978). گزارش‌ها حاکی از آن است که تلقیح گوجه‌فرنگی با قارچ Pirformospora indica قدرت تحمل گیاه به تنش‌های شوری و کمبود عناصر غذایی را از طریق فعال کردن متابولیسم آنتی‌اکسیدان و در نتیجه تجمع آسکوربات افزایش داده است (Varma et al., 2012). تاثیر مثبت کاربرد کودهای نیتروژن‌دار در افزایش عملکرد کمی و کیفی گندم مورد تاکید پژوهشگران بوده است(Liu et al., 2007) . این اثرات مثبت ممکن است به شاخص‌های فیزولوژیک مثل بهبود شاخص سطح برگ و افزایش تجمع ماده خشک. نسبت داده شود لذا این پژوهش با هدف بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد به همراه قارچ‌های میکوریز و اندوفیت بر روی جذب NPK گیاه گندم در شرایط شور انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه و بررسی اثرات قارچ و باکتری‌های PGPR بر روی خصوصیات رشدی گیاه گندم تحت تنش شوری آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ارومیه در بهار ۹۶ در سه تکرار انجام شد این آزمایش شامل دو فاکتور میکروبی و شوری می‌باشد که فاکتور میکروبی شامل از ۱) باکتری‌های محرک رشد (Pseudomonace fluorescens, Stenotrophomonas maltofilia, Pseudomonace aeruginosa) ۲) قارچ‌های میکوریز آربوسکولار(Glomus versiform, Glomus fasciulatum, Glomus intraadices) ۳) قارچ Pirformospora indica ۴) شاهد و فاکتور شوری در سه سطح (۰، ۸ و ۱۴ dS/m) می‌باشند پس از انتخاب خاک مورد نظر (انجام پیش آزمایش)، نمونه برداری انجام و برخی خصوصیات شامل pH، EC، بافت، خاک مورد استفاده پس از هوا خشک شدن از الک پنج مش عبور داده شد و با نسبت ۱ به ۳ با ماسه دانه‌ریز مخلوط و برای هر گلدان در نظر گرفته شد سپس خاک و ماسه مخلوط شده برای هر گلدان را را به حد FC رسانده و گلدان‌ها با وزن یکسانی از خاک پر شدند باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریز و اندوفیت از آزمایشگاه بیولوژی گروه علوم دانشکده کشاورزی ارومیه تهیه شد. سطوح مختلف شوری از طریق اعمال شوری با NaCl در مقدار و حجم مشخص برای هر سطح شوری اعمال شد تا مقدار NaCl لازم برای اعمال هر سطح شوری برای هر گلدان به دست آید در آزمایش‌های اولیه NaCl در سطوح ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ گرم در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب حل‌شده و سپس به هرکدام از گلدان‌هایی که حاوی ۵۰۰ گرم خاک خشک شده بودند اضافه شد و به حد اشباع رسید بعد از ۲۴ ساعت EC در خاک فوق اندازه‌گیری شد. EC اندازه‌گیری شده با سطوح NaCl که از قبل مشخص شده بود به خاک اضافه شد یک رگرسیون خطی به دست آمد که مقدار NaCl مورد نیاز برای سطوح شوری مورد نظر از معادله رگرسیون محاسبه گردید NaCl به صورت تدریجی در طول دو هفته بعد از انتقال به گلدان‌ها اضافه شد مخلوط آب و نمک به صورت کاملا اندازه گیری شده با مقدار روزانه ۲۰ سی‌سی در مدت دو هفته بعد از کشت به گلدان‌ها داده شد (Naser Aliagharzadeh et al., 2009). بعد از گذشت ۶۰ روز برداشت انجام شد جهت اندازه‌گیری عناصر (اندام هوایی و ریشه) (غیر از نیتروژن) از روش سوزاندن خشک و عصاره گیری با اسید کلریدریک استفاده گردید روش کار به این ترتیب است که نیم گرم نمونه خشک و پودر شده گیاه در بوته چینی و درون کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ ساعت قرار داده شد سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن‌ها اضافه کرده و پس از گذشت نیم ساعت به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد اندازه‌گیری فسفر با روش هضم خشک (سوزاندن)، اندازه‌گیری ازت به روش کجلدال (هضم تر) و برای اندازه گیری پتاسیم به روش نشر نوری با دستگاه فلایم فتومتر مورد استفاده قرار گرفت آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به برخی از ویژگی‌های خاک در جدول (۱) ارائه گردیده است. خاک مورد بررسی دارای آهک نسبتاً زیاد با ماده آلی کم (کمتر از ۱ در صد) و بافت سبک و غیر شور بود.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

بافت خاک	پهاش	هدایت الکتریکی dS/m^{-1}	آهک (در صد)	کربن آلی (در صد)
لوم رسی	۷/۶۹	۰/۵	۱۹/۵	۰/۵۹

تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح شوری و تلقیح میکروبی در تمامی پارامترها معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) بود اثر متقابل این دو فاکتور نیز بر میزان غلظت ازت (P<۰/۰۱) و بر میزان غلظت فسفر (P<۰/۰۰۱) معنی‌دار بود همچنین اثر متقابل سطوح شوری و تلقیح میکروبی بر میزان غلظت پتاسیم معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح شوری و تلقیح میکروبی بر صفات اندازه‌گیری شده اندام هوایی گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		K	P	N
سطوح شوری (S)	۲	۴/۴۶۵***	۰/۲۲۱***	۲/۵۴۴***
تلقیح میکروبی (M)	۳	۲/۲۹۳***	۰/۰۶۵***	۰/۳۵۸***
S*M	۶	۰/۱۴۳ ns	۰/۰۱۸***	۰/۱۴۱**
خطا	۲۲	۰/۱۴۶	۰/۰۰۰	۰/۰۳۳

***، **، * به ترتیب نشاندهنده وجود اختلاف معنی‌دار درسطح احتمال ٪ ۰/۱، ٪ ۱ و ٪۵ و ns نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار هستند

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و تلقیح میکروبی بر میزان غلظت نیتروژن اندام هوایی نشان داد (جدول ۳). بیشترین و کمترین میزان غلظت نیتروژن با ۲/۵۲۹۳ و ۱/۰۶۴۰ درصد به ترتیب مربوط به تیمار اندوفیت در سطح اول شوری و تیمار شاهد در سطح سوم شوری بود تیمار باکتری در سطح اول شوری اختلاف معنی‌داری را با تیمار اندوفیت در همان سطح شوری نشان نداد در رابطه با تاثیر تیمارهای قارچی و باکتریایی می‌توان بیان کرد که جذب نیتروژن تابع دو عامل رشد و توسعه ریشه و فراهمی بیشتر نیتروژن در خاک و در نهایت جذب بیشتر آن توسط ریشه گیاه است برخی شواهد حاکی از آن است که میسلیوم قارچ از خود موادی ترشح می‌کند که در تحرک عناصر و جذب آن‌ها توسط گیاه بسیار موثر است در بعضی موارد علت افزایش غلظت ازت در گیاه به افزایش جذب فسفر نسبت داده شده است قارچ‌ها تاثیر زیادی بر فیزیولوژی ریشه گیاه گذاشته که سبب فعال ساختن گلوتامین سنتتاز، آرژیناز و اوره‌آز شده و از این طریق غلظت نیتروژن را در گیاهان افزایش می‌دهند (Auge , 2001). نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح شوری و تلقیح میکروبی بر میزان غلظت فسفر در اندام هوایی گیاه نشان داد (جدول ۴). که بیشترین و کمترین میزان غلظت فسفر با ۰/۴۸۶۳ و ۰/۰۴۴۱ درصد به ترتیب مربوط به تیمار میکوریز در سطح اول شوری و تیمار شاهد در سطح سوم شوری بود تیمار باکتری نیز در هر ۳ سطح شوری اختلاف معنی‌داری را با میکوریز نشان نداد افزایش جذب فسفر در تیمارهای قارچی علاوه بر تاثیر همزیستی مایکوریزایی در افزایش سطح جذب ریشه به عقیده Gilri و همکاران (۲۰۱۳) می‌تواند به دلیل تاثیر این قارچ‌ها در ترشح فسفاتازها، اگزالات‌ها و تراوش یون پروتون نیز صورت بگیرد Almas و Saghir (۲۰۰۵) نشان دادند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد به همراه خاک فسفات در شرایط گلخانه فسفر گیاه را به ترتیب ۴۲ و ۴۷ درصد افزایش دادندکه می‌تواند ناشی از ترشح اسیدهای آلی باشد و کاهش میزان جذب آن را در شرایط شور به کاهش طول ریشه نسبت داد افزایش شوری در خاک قابلیت دسترسی گیاه به فسفر کاهش می‌دهد با توجه به اینکه فسفر و کلر هر دو آنیون هستند بنابراین جذب آن‌ها توسط گیاه از مکانسیم مشابهی پیروی می‌کند یون کلر که در محلول خاک‌های شور به مقدار فراوان یافت می‌شود با آنیون فسفات رقابت کرده و به مقدار بیشتری جذب گیاه می‌گردد برخی شواهد حاکی از آن است که میسلیوم قارچ از خود موادی ترشح می‌کند که در تحرک عناصر و جذب آن‌ها توسط گیاه بسیار موثر است در بعضی موارد علت افزایش غلظت ازت در گیاه به افزایش جذب فسفر نسبت داده شده است.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و تلقیح میکروبی بر غلظت ازت (٪) اندام هوایی گندم

	ازت (g/100)			
سطوح شوری	شاهد بدون تلقیح	BAC	PN	MY
S1	۱/۶۴۲۷^{cd}	۲/۰۶۲۷^{b}	۲/۵۲۹۳^{a}	۲/۱۳۷۳^{b}
S2	۱/۲۶۹۳^{ef}	۲/۸۷۶^{bc}	۱/۴۹۳۳^{de}	۱/۳۸۱۳^{def}
S3	۱/۰۶۴۰^{g}	۱/۳۲۵۳^{def}	۱/۱۸۵۳^{ef}	۱/۱۶۶۷^{ef}
$LSD_{0/05}$		۰/۶۳۷		

میانگین‌هایی دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

BAC، PN، MY به ترتیب باکتری، قارچ اندوفیت و قارچ مایکوریز می‌باشند.

S1، S2 و S3 به ترتیب سطح اول شوری،سطح دوم شوری و سطح سوم شوری می‌باشند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و تلقیح میکروبی بر غلظت فسفر (٪) اندام هوایی گندم

	فسفر (g/100)			
سطوح شوری	شاهد بدون تلقیح	BAC	PN	MY
S1	۰/۱۱۰۹^{e}	۰/۴۷۳۱^{a}	۰/۳۴۱۹^{b}	۰/۴۸۶۳^{a}
S2	۰/۰۹۰۳^{e}	۰/۰۹۰۳^{c}	۰/۱۹۷۵^{d}	۰/۱۷۴۶^{c}
S3	۰/۰۴۴۱^{f}	۰/۱۰۰۲^{e}	۰/۱۰۱۸^{e}	۰/۱۱۰۱^{e}
$LSD_{0/05}$		۰/۰۶۸		

میانگین‌هایی دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

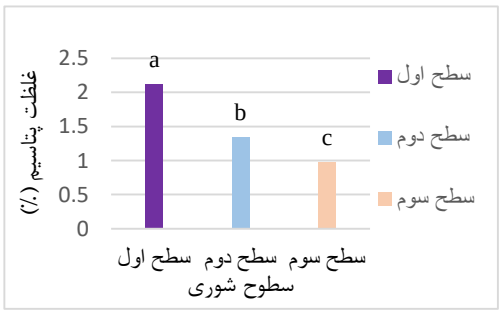
BAC، PN، MY به ترتیب باکتری، قارچ اندوفیت و قارچ مایکوریز می‌باشند.

S2، S1 وS3 به ترتیب سطح اول شوری،سطح دوم شوری و سطح سوم شوری می‌باشند.

بیشترین مقدار پتاسیم اندام هوایی با ۲/۱۱۹ درصد در سطح اول شوری مشاهده گردید (شکل ۱). در بین تیمارهای میکروبی هم بیشترین و کمترین مقدار پتاسیم با ۲/۰۵۶ و ۱/۰۳۴ درصد به ترتیب مربوط به تیمار باکتری و شاهد بود بیشترین مقدار پتاسیم در حضور باکتری و میکوریز مشاهده شد که به ترتیب ۱/۹۸ و ۱/۶۴ برابر تیمار شاهد بود (شکل ۲). بین تیمار اندوفیت و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد قابلیت دسترسی پتاسیم برای گیاه در خاک با کاهش محتوای آب خاک کاهش می‌یابد که منجر به کاهش تحرک پتاسیم تحت شرایط خشکی و شوری می‌شود بنا به‌نظر پژوهشگران غالبیت یون سدیم در سطوح بالای شوری از جذب پتاسیم جلوگیری می‌نماید (Mosali et al., 1992). تاثیر تیمار باکتری و قارچ در افزایش پتاسیم می‌تواند به دلیل فعالیت بیشتر ACC دی‌آمیناز توسط باکتری و افزایش سطح جذب توسط ریشه در قارچ‌ها بیان کرد افزایش جذب پتاسیم در تیمارهای میکروبی را می‌توان به توانایی میکروارگانسیم‌ها در افزایش انحلال پتاسیم و تولید انواع فیتو هورمون‌ها و همچنین اثر هم‌افزایی حضور توام باکتری و قارچ‌های میکوریز نسبت داد (Rabie and Almadin , 2005).



شکل ۱- تاثیر تلقیح میکروبی بر غلظت پتاسیم



شکل۲-تاثیر سطوح شوری بر غلظت پتاسیم

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش تلقیح میکروبی می‌تواند باعث افزایش میزان جذب عناصر ازت، فسفر و پتاسیم در گیاه شود و از طریق مکانسیم‌های مختلفی موجب افزایش رشد گیاه و نهایتا محصول بهتر در شرایط تنش شوری شود ضمنا با استفاده درست و کافی از این کودها می‌توان در جهت کاهش آلودگی و کاهش شوری آب و خاک گامی بزرگ برداشت می‌توان از کودهای زیستی به عنوان جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی بهره گرفت که همگام و همراه با حفظ امنیت غذایی جامعه از نظر کیفیت و کمیت باشد کودهای زیستی همچنین می‌توانند در زمینه اجتماعی و اقتصادی نیز مفید واقع شود.

منابع

مغزاردلان ، م. و غ. ثوابقی فیروزآبادی. ۱۳۸۱ مدیریت حاصلخیزی خاک برای کشاورزی پایدار (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران.

Aliasgharzadeh N, Hajboland R, Farsad Laiegh SH, Poschenieder Ch . 2009.Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (Solanum lycopersicum L.) plants. Plant soil 331:313-327.

Almas, Z. and Saghir, K. (2005) Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of wheat. Canadian Journal of Microbiology 28: 2079-2092. Farsi.

Auge, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11: 3-42.

Giri, B., Kapoor, R. and Mukerji, G. (2003) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of Acacia auriculiformis. Biology and Fertility of Soil 38: 170-175.

Koochaki, A., L. Tabrizi, and R. Ghorbani. 2008. Effect of biofertilizers on growth characteristics, yield and qualitycharacteristics of herb hyssop (Hyssopus officinalis). Iranian Journal of Agricultural Research 6: 127-134 .

Lauchli, A., Grattan, S.R. 2007. Plant growth and development under salinity stress advances. Molecular Breading Toward Drought and Salt Tolerant Crops. 1-32 levels of zinc and phosphorus. Biology and Fertility of soil, 8: 317-328.

Liu, X., L. Qing-Chang, W. Zhen-Lin, H. Ming-Rong and Y. Yan-Ping. 2007. Effects of nitrogen rates on grain

Momeni, A. (2009). Geographic distribution of soil salinity levels of Iran Journal of Soil Science (soil and water), 24(3), 215-204 .

Mosali, J., Desta, K., Teal, K. R., Freeman, K. W., Martin, K. L., Lawles, J., Raun, W. R. and Oertli, J. J. (1992) Nutrient management under water and salinity stress. In: Proceedings of the International Symposium of Nutrient management for sustained productivity. Department of Soil Science. Punjab Agricultural University. Ludhiana, India p. 138-165.

Rabie, G. H. and Almadini, A. M. (2005) Role of bio inoculants in development of salt tolerance of Vicia faba plants. African Journal of biotechnology 4(3): 210-222.

Swaminathan, K. 1978. Responses of three crop species to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on zincdeficient indian soils. New Phytol. 82: 481-487.

Varma, A., M. Bakshi, B. Lou, A. Hartmann and R. Oelmueller. 2012. Piriformospora indica: A novel plant Vegetative Bioremediation. Arid Soil Research, 11: 343-352.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Evaluation of effect of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria bacteria, mycorrhizal fungi and endophytic fungi on the uptake of some elements in wheat under saline conditions

Zahra roydel[1,2], Mohsen Barin [2], Mir Hassan Rasouli Sadaghiani [3], Maryam Khezri [4]

[1] MSc student., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran
[3] Profr., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran
[4] Assistant Prof, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture University of Urmia, Iran

Abstract

Soil salinity is one of the soil dynamic properties that human beings have been struggling against thousands of years ago. The use of biological fertilizers to improve the nutrition of cereals is considered as one of the most important and effective methods in salinity stress conditions. The aim of this study was to investigate the effect of growth promoting bacteria (Pseudomonace fluorescens, Stenotrophomonas maltofilia, Pseudomonace aeruginose), mycorrhizal fungi (Glomus vresiform, Glomus fasciulutum, Glomus intraadices) and endophyte fungi (Pirformospora indica) on uptake (N, P and K) in wheat under saline conditions. The experiment carried out as a completely randomized design (CRD) with two factors, microbial factors (4 levels) and salinity (3 levels) in three replications. Plants harvested after 60 days. Results showed that the effects of salinity and microbial levels in Nitrogen, phosphorus and potassium were significantly ($P < 0.01$). The interaction of salinity and microbial inoculation were significant in nitrogen concentration ($P < 0.01$) and significant concentration of P ($P < 0.001$). The highest nitrogen concentration was observed in the treatment microbial endophyte treatment with 2.529% and the highest concentration of phosphorus 0.486 and 0.477 %, obtained in bacteria and mycorrhiza treatments in non-saline conditions, respectively. The highest amount of potassium was 2.056% was in microbial treatments. It is concluded that at salinity condition, inoculation with PGPR, Endophyte and AMF could sustain and promote plant growth.

Keywords: Sustainable Farming, Microbial Inoculation, Wheat, PGPR

[2]Corresponding author, Email:Zahra.rouedll@gmail.com

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر برخی شاخص‌های تغذیه‌ای گندم تحت کشت گلخانه

اکبر قدم‌خانی[۱*]، نعیمه عنایتی‌ضمیر[۲]، مجتبی نوروزی مصیر[۳]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

چکیده

کمبود آهن در خاک‌های آهکی یکی از عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان است. مقدار آهن قابل‌دسترس خاک برای جذب گیاهان پایین است. بسیاری از ریزجاندارن نقش مهمی در رهاسازی عناصر از خاک دارند. استفاده از ریزجانداران محرک رشد گیاه (PGPR) یک راهکار جدید برای بهبود دسترسی به عناصر و افزایش سطح تغذیه‌ای برای گیاهان است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر روی جذب آهن در دانه، پروتئین دانه و نسبت مولی اسید فیتیک بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح باکتری (شاهد بدون مایه‌زنی، *انتروباکتر کلوآسه* R33، *انتروباکتر کلوآسه* R1 و مخلوط دو باکتری) و سه سطح کود سولفات آهن (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد نیاز کودی) بودند. نتایج نشان داد بیشترین غلظت آهن و پروتئین در دانه (۴۴/۷ درصد افزایش) در تیماره ۵۰ درصد کودی و کاربرد همزمان دو باکتری نسبت به تیمار ۵۰ درصد کودی و عدم حضور باکتری مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار نسبت مولی اسیدفیتیک به آهن (II) در تیمار ۵۰ درصد کودی و عدم حضور باکتری نسبت به سایر تیمارها مشاهد شد.

کلمات کلیدی: آهن خاک، اسید فیتیک، پروتئین دانه

مقدمه

آهن برای رشد و نمو گیاه ضروری و به عنوان یک کوفاکتور برای پروتئین‌هایی که در تعدادی از فرآیندهای مهم متابولیکی شامل فتوسنتز و تنفس شرکت دارند، موردنیاز است. با توجه به اینکه میزان آهن قابل‌دسترس در خاک‌های آهکی بسیار پایین است، بنابراین کمبود جذب آهن یک علت شایع برای کاهش رشد گیاهان و همچنین کاهش میزان پروتئین در بافت‌های گیاه میشود در جهان است (Liu و همکاران ۲۰۱۷). امروزه استفاده از مایه تلقیح میکروبی به عنوان یک جایگزین سازگار با محیط‌زیست نسبت به کودهای شیمیایی در کشاورزی پایدار مورد توجه محققان در سراسر جهان قرارگرفته است. ریزوسفر محیط در دسترس گیاه و دارای حداکثر فعالیت ریزجانداران است که دارای توانایی قابل‌دسترس کردن عناصر پرمصرف و کم-مصرف هستند. جمعیت میکروبی موجود در ریزوسفر نسبت به محیط اطراف خود نسبتاً متفاوت است، زیرا ترشحات ریشه‌ای به‌عنوان منبع مواد مغذی برای رشد میکروبی عمل می‌کند (Baral و همکاران ۲۰۱۴). ریزجاندارن محرک رشد گیاه بطور مستقیم با ترشح سیدروفور و هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و اتیلن موجب افزایش قابلیت دسترسی آهن در خاک شده)رومرا و همکاران و همچنین با افزایش توسعه ریشه، و دسترسی به حجم بیشتری از خاک مایه افزایش غلظت و جذب عناصر غذایی توسط گیاه میشوند(Dong ۲۰۱۰). از سوی دیگر با توجه به اینکه گندم در محدوده وسیعی از شرایط آب و هوایی جهان رشد میکند اراضی زیادی در سرتاسر جهان در مقایسه با سایر گیاهان زراعی به کشت آن اختصاص داده شـده است زیرا گندم غذای اصلی انسان است که به‌طور مستقیم مـورد مصرف قرار می‌گیرد. با توجه به اهمیت استراتژیک و موقعیت مهم گندم در سبد محصولات مصرفی، برنامه-ریزی مناسب و دقیق برای مدیریت و تامین آن با حفظ فاکتورهای تغذیه‌ای بدون شک یکی از نیازهای مهم کشورها است. مطالعات افزایش غلظت و جذب آهن، کلروفیل، و فعالیت ریشه گیاه بادام زمینی در یک خاک آهکی مایه‌زنی شده با *Paenibacillus illinoisensis* و *Bacillus sp.* را گزارش دادند (Liu و همکاران ۲۰۱۷). Mishra و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که مایه‌زنی خاک با سودوموناس موجب افزایش کلروفیل و جذب آهن و فسفر در گیاه عدس می‌شود.

همچنین Jin و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که اسید فیتیک به طور معنی‌داری فراهمی زیستی آهن را کاهش می‌دهد. از این‌رو مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر روی شاخص‌های تغذیه‌ای گندم رقم چمران و همچنین برای اولین بار بررسی تاثیر این باکتری‌ها بر روی نسبت مولی اسید فیتیک به آهن تحت شرایط گلخانه‌ای پرداخته است.

* ایمیل نویسنده مسئول: akbar.gh.khani@gmail.com

مواد و روش‌ها

نمونه‌خاک از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انتخاب و پس از هوا خشک شدن و کوبیدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده و در گلدان‌های ۶ کیلوگرمی ریخته شد. برخی ویژگی‌های اولیه خاک شامل پ. هاش، هدایت الکتریکی خاک، ماده آلی خاک و مقدار نیتروژن(کلدال)، فسفر (اولسن)، پتاسیم (استات آمونیوم) و آهن (DTPA) اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

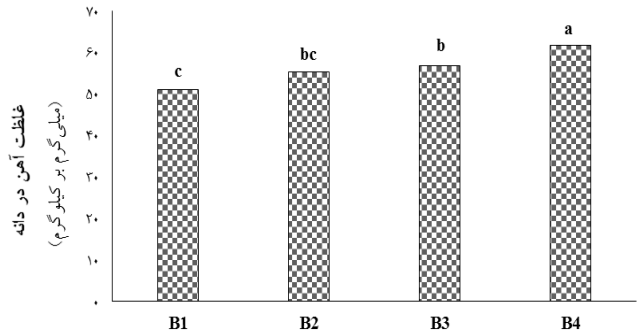
pH	EC($dS\ m^{-1}$)	ماده آلی(٪)	نیتروژن(٪)	فسفر(mg/kg)	پتاسیم(mg/kg)	آهن‌قابل‌تبادل(mg/kg)
۷/۳	۳/۱	۰/۶۵	۰/۰۶	۱۱/۲	۲۵۰	۰/۸۵

پژوهش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای به اجرا در آمد. فاکتورهای آزمایش شامل مایه‌زنی باکتری به خاک در چهار سطح [شاهد(B1)، انتروباکترکلوآسه(B2) R33، انتروباکتر کلوآسه (B3) R1 و ترکیب انتروباکترکلوآسهR33 و انتروباکتر کلوآسه R1 (B4)] و فاکتور دوم شامل سه سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد نیاز کودی از منبع سولفات آهن (بدون افزودن کود سولفات آهن ((0 Fe، 10 کیلوگرم در هکتار (50 Fe) و ۲۰ کیلوگرم در هکتار (100 Fe) که با در نظر گرفتن مقدار آهن قابل‌دسترس اولیه خاک و توصیه کودی آهن برای کشت گندم سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰درصد نیاز کودی بود (ملکوتی و غیبی۱۳۷۹). بذر گندم، رقم چمران پس از ضد عفونی کردن با هیپوکلریت سدیم یک درصد در عمق ۱-۲ سانتی‌متری پس از اضافه شدن مایه تلقیح میکروبی، کشت شد. مدیریت کودی بر اساس آزمون خاک انجام گردید. در پایان دوره غلظت آهن در دانه به روش کوره و قرائت با دستگاه جذب اتمیک، پروتئین دانه(Peck و همکاران ۲۰۰۸) و نسبت مولی اسید فیتیک به آهن(II) به روش Haug Lantzsch (۱۹۸۳) با نسبت زیر اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS انجام و مقایسه مقادیر میانگین بین تیمارها به وسیله آزمون توکی انجام خواهد شد.

$$\text{نسبت مولی اسید فیتیک به آهن} = \frac{\frac{\left(\frac{mg}{100g}\right)_{\text{اسید فیتیک}}}{660}}{\frac{\left(\frac{mg}{100\,g}\right)_{\text{آهن}}}{56}}$$

نتایج و بحث

نتیجه مقایسه میانگین اثر ساده باکتری بر غلظت آهن در دانه در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین غلظت آهن در دانه با افزایش ۲۰/۹ درصدی در تیمار دارای کاربرد همزمان دو باکتری نسبت به عدم حضور باکتری مشاهده شد.

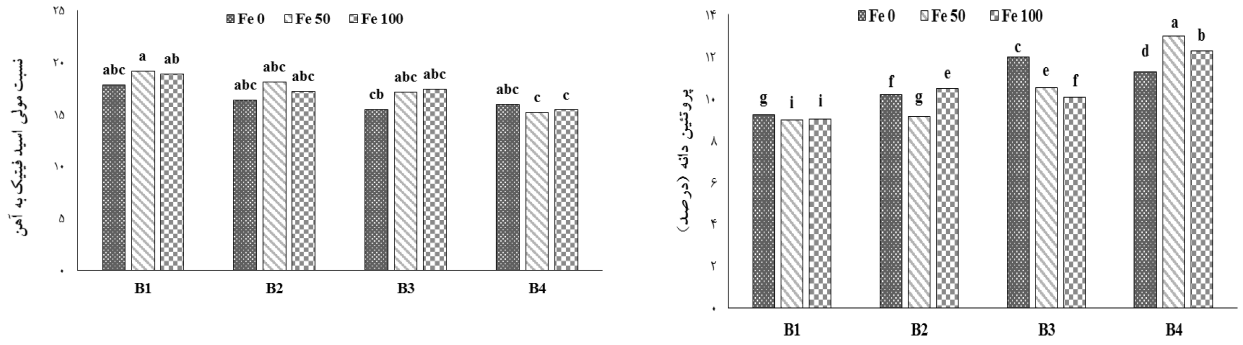


شکل ۱. مقایسه میانگین تاثیر باکتری بر غلظت آهن در دانه

B1: بدون حضور باکتری، B2: انتروباکتر کلوآسه R33، B3: انتروباکتر کلوآسه R1، B4: ترکیب انتروباکتر کلوآسه R33 و انتروباکتر کلوآسه R1

ریزجاندارن محرک رشد گیاه با ترشح هورمون‌های گیاهی اکسین و اتیلن و همچنین سیدروفور در پاسخ به کمبود آهن ممکن است از طریق اسیدی کردن موجب افزایش قابلیت دسترسی آهن در خاک شوند (Romer و همکاران ۲۰۰۶) با ترشح هورمون‌های گیاهی تحت تاثیر ریزجانداران توسعه ریشه افزایش یافته و با دسترسی ریشه به حجم بیشتری از خاک و افزایش غلظت و در نهایت جذب عناصر غذایی همچون آهن توسط گیاه افزایش می-یابد. پژوهشگران دیگر افزایش غلظت آهن، کلروفیل، و فعالیت ریشه گیاه بادام زمینی در یک خاک آهکی مایه‌زنی شده با *Paenibacillus illinoisensis* و *Bacillus sp*. با توانایی ترشح سیدروفور را گزارش دادند (Liu و همکاران،۲۰۱۷).

تاثیر تیمارها بر مقدار پروتئین دانه و نسبت مولی اسیدفیتیک آهن نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار ($P<0.01$) سطوح کودی و سویه‌های باکتری و اثر متقابل این دو عامل بر مقدار پروتئین دانه و نسبت مولی اسیدفیتیک به آهن بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر مقدار پروتئین دانه در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشترین مقدار پروتئین دانه در تیمار ۵۰ درصد نیاز کودی و کاربرد همزمان دو باکتری (Fe50B4) با مقدار ۴۴/۷ درصد افزایش نسبت به تیمار ۵۰ درصد کودی و عدم حضور باکتری (Fe50B1) و افزایش ۴۰/۹ درصد نسبت به عدم استفاده از کود و باکتری (Fe0B1) مشاهده شد (شکل ۲). همچنین بیشترین مقدار نسبت مولی اسید فیتیک به آهن در تیمار ۵۰ درصد کودی و عدم حضور باکتری نسبت به سایر تیمار-ها مشاهد شد (شکل ۳). مطالعات مختلف تاثیر باکتری-های محرک رشد بر روی عملکرد دانه، جذب عناصر غذایی و پروتئین دانه را با توجه به ویژگی.های محرک رشد بودن نشان دادند (نظرلی و همکاران، ۱۳۹۲). کاربرد باکتری سودوموناس (سویه ۱۶۹) موجب افزایش پروتئین دانه باقلا با میانگین ۲۶ درصد نسبت به خاک شاهد (عدم مایه‌زنی) شد (ذرشین‌زنوش و همکاران ۱۳۹۴). همچنین استفاده از سویه های مورد آزمایش می‌توانند از طریق سازوکارهای مختلف همانند کاهش موجب افزایش آهن قابل دسترس برای گیاه شده باشند و در نهایت کاهش نسبت مولی اسیدفیتیک به آهن را ایجاد کنند. استفاده از سویه‌های سودوموناس (*Pseudomonas aeruginosa* strain MPFM و *Pseudomonas fluorescens* strain 187) و روی موجب افزایش روی خاک و غلظت روی دانه و کاهش نسبت مولی اسید فیتیک به روی شدند (محمدی و همکاران ۱۳۹۳).



شکل ۲. تاثیر باکتری های محرک رشد و سطوح کودی بر درصد پروتین دانه شکل ۳. تاثیر باکتری های محرک رشد و سطوح کودی بر نسبت مولی اسیدفیتیک به آهن

B1بدون حضور باکتری، B2انتروباکترکلوآسهR33 ، B3انتروباکترکلوآسهR1 ، B4کاربرد همزمان دو باکتری

Fe 0: صفر درصد نیاز کودی، Fe 50 پنجاه درصد نیاز کودی، Fe 100 صد درصد نیاز کودی

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده استفاده از باکتری محرک رشد موجب افزایش غلظت آهن در دانه و درنهایت جذب آن بوده است. در همچنین بیشترین بازدهی مربوط به تیمارهای دارای باکتری با کود کمتر در مقایسه به تیمارهای عدم حضور باکتری بود که این امر نشان‌دهنده استفاده کمتر از کودهای شیمیایی و حرکت به سمت کشاورزی پایدار می‌باشد.

منابع

درشین‌زنوش، ر، انصاری، م. ح. و مصطفوی‌راد، م. ۱۳۹۴. اثر پرایمینگ شیمیایی و زیستی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه باقلا (*Vicia faba L.*)، نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی. ۱۰ (۴۰): ۸۳ -۷۳.

محمدی، م، ملکوتی، م. ج، خاوازی، ک، رجالی، ف. و داوودی، م. ح. ۱۳۹۳. تأثیر کاربرد کودهای زیستی و شیمیایی فسفاتی و روی بر عملکرد، غلظت عناصر غذایی و نسبت مولی اسید فیتیک به روی دردانه دو رقم لوبیا چیتی، زیست شناسی خاک. ۲) ۹۹-۱۱۰.

ملکوتی، م. ج. و غیبی، م. ن. ۱۳۷۹. تعیین حد بحرانی عناصر غذایی موثر در خاک، گیاه و میوه در راستای افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات استراتژیک کشور. تهران: آموزش کشاورزی وابسته به دفتر خدمات تکنولوژی آموزشی وزارت جهاد کشاورزی.۹۲-۱.

نظرلی، ح. و سیدشریفی، ر. ۱۳۹۲. بررسی عملکرد کمی و کیفی و برخی خصوصیات زراعی آفتابگردان (*Helianthus annus* L) در پاسخ به تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد در سطوح مختلف نیتروژن. مجله بوم‌شناسی کشاورزی. ۵ (۳): ۳۱۷ -۳۰۸.

Baral, B. R. and Adhikari, P. 2014. Effect of Azotobacter on growth and yield of maize. South Asian Association for Regional Cooperation Journal of Agriculture, 11 (2), 141-147.

Dong H, 2010. Mineral-microbe interactions: a review. Frontiers of Earth Science in China, 4(2):127-147.

Jin, F., Frohman, C., Thannhauser, T.W., Welch, R.M. and Glahn, R.P. 2008. Effects of ascorbic acid, phytic acid and tannic acid on iron bioavailability from reconstituted ferritin measured by an in vitro digestion–Caco-2 cell model. British Journal of Nutrition, 101 (7): 972-981.

Liu, D., Yang, Q., Ge, K., Hu, X., Qi, G., Du, B. and Ding, Y. 2017. Promotion of iron nutrition and growth on peanut by Paenibacillus illinoisensis and Bacillus sp. strains in calcareous soil. Brazilian Journal of Microbiology, 48 (4): 656-670.

Mishra, P.K., Bisht, S.C., Ruwari, P., Joshi, G.K., Singh, G., Bisht, J.K. and Bhatt, J.C. 2011. Bioassociative effect of cold tolerant Pseudomonas spp. and Rhizobium leguminosarum-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (Lens culinaris L.). European Journal of Soil Biology, 47 (1): 35-43.

Peck, A.W., McDonald, G.K. and Graham, R.D. 2008. Zinc nutrition influences the protein composition of flour in bread wheat (Triticum aestivum L.). Journal of Cereal Science, 47 (2): 266-274.

Romera, F. J., Lucena, C. and Alcàntara, E. 2006. Plant hormones influencing iron uptake in plants. In Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Springer, Dordrecht, PP:251-278.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

The Effect of growth stimulating bacteria on some nutrition indicators of wheat under greenhouse culture

Ghadam khani*[1], A., Enayatzamir [2], N, Norouzi Masir, M.[3]

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Shahid Chamran university of Ahvaz, Iran
[2] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Shahid Chamran university of Ahvaz, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Shahid Chamran university of Ahvaz, Iran

Abstract

Iron deficiency in calcareous soils is one of the factors limiting the growth and yield of plants. The amount of iron available to absorb plants is low. Many microorganisms play an important role in releasing elements from the soil. The use of Plant Growth Stimulators (PGPR) is a new strategy to improve access to nutrients and increase nutrition for plants. The aim of this study was to investigate the effect of growth stimulating bacteria on iron absorption in grain, grain protein and phyrtic acid molar ratio. The experiment was conducted as factorial in a completely randomized design with three replications. The treatments consisted of four levels of bacteria (no control, *Enterobacter cholera* R33, *Enterobacter chlorotic* R1 and a mixture of two bacteria) and three levels of iron sulfate fertilizer (0, 50 and 100% fertilizer requirement).The results showed that the highest concentration of iron and protein in grain (44.7% increase) was observed in 50% fertilizer and the simultaneous application of two bacteria as compared to 50% fertilizer treatment and absence of bacteria. Also, the highest amount ratio of phyrtic acid to Fe was observed in 50% fertilizer treatment and absence of bacteria compared to other treatments.

Keywords: Soil Iron, Phyrtic Acid, Protein Grain

* Corresponding author, Email: akbar.gh.khani@gmail.com