آزادسازی پتاسیم و آهن از کانی بیوتیت و فسفر از تری کلسیم فسفات توسط هفت سویه از باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی

جواد کشاورز زرجانی[1]، ناصر علی اصغر زاد، شاهین اوستان و سید مصطفی عمادی

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز؛ **j.keshavarz37@gmail.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **oustan@hotmail.com**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **mostafaemadi@gmail.com**

دریافت: **1391/8/20** و پذیرش: **1392/9/12**

چکیده

فسفر، پتاسیم و آهن در زمره عناصر غذائی ضروری گیاهان هستند که نقش مهمی در رشد و توسعه گیاهان ایفا می‌کنند. هدف از این تحقیق بررسی کارائی هفت سویه از باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر از کانی‌های نامحلول در شرایط آزمایشگاهی بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. تیمارها شامل هفت سویه از باکتری‌ها و شاهد (بدون تلقیح با سویه باکتری‌ها) بودند. باکتری‌های مورد آزمایش شامل پنج سویه (JK3 JK4 JK5 JK6 و JK7) Bacillus megaterium و دو سویه Lysinibacillus fusiformis و Arthrobacter sp (JK1 و JK2) بودند. محیط کشت الکساندروو حاوی کانی بیوتیت و محیط کشت پیکووسکیا حاوی تری کلسیم فسفات در غلظت‌های به ترتیب 0/2 و 0/5 درصد برای بررسی توانائی آزادسازی عناصر توسط سویه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. pH نهائی و آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر در محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفتند. pH نهائی و مقدار فسفر محلول در محیط‌های کشت پیکووسکیا رابطه معکوس با هم داشته، در حالی که بعد از پنج روز انکوباسیون تفاوت معنی‌داری در کاهش pH محیط کشت مایع حاوی بیوتیت مشاهده نشد. توانائی باکتری‌های مورد آزمایش در آزادسازی فسفر بیشتر از پتاسیم و آهن بود، در مقایسه با تیمار بدون باکتری، همه سویه‌های مورد آزمایش از هر دو محیط کشت به طور معنی‌داری پتاسیم، آهن و فسفر آزاد کرده بودند (p<0/01). بیشترین مقدار پتاسیم آزاد شده مربوط به سویه JK7 (3/1 میلی‌گرم در گرم) بود اما تفاوت معنی‌داری با سویه‌های JK6 و JK3 نداشت. همچنین سویه JK7 دارای بیشترین مقدار آهن (0/29 میلی‌گرم در گرم) آزاد شده از محیط کشت اصلاح شده الکساندروو حاوی بیوتیت داشت و با بقیه سویه‌ها تفاوت معنی‌داری داشتند. سویه JK7 دارای بیشترین مقدار فسفر (61/26 میلی‌گرم در گرم) آزاد شده از محیط کشت پیکووسکیا حاوی تری کلسیم فسفات بود و با بقیه سویه‌ها دارای تفاوت معنی‌دار بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در بین سویه‌های مورد آزمایش، سویه JK7 کارآمدترین باکتری در آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد هر چند که بقیه سویه‌ها نیز در آزادسازی این سه عنصر مؤثر واقع شدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل کننده کانی‌ها، محیط‌های کشت پیکووسکیا

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: تبریز، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، گروه علوم خاک

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فسفر، پتاسیم و آهن در زمره عناصر غذائی ضروری گیاهان هستند که نقش مهمی در رشد و توسعه گیاهان ایفا می‌کنند. وقتی که خاک دارای کمبود فسفر قابل استفاده برای گیاه است، این عنصر به صورت کود شیمیائی نسبتاً محلول و قابل استفاده برای گیاه به خاک اضافه می‌شود، ولی به آسانی با کربنات کلسیم، اکسیدهای آهن و آلومینیوم و آلومینوسیلیکات‌های متبلور و غیرمتبلور ترکیب شده و ایجاد کمپلکس‌های نامحلول می‌کند (سمپل و همکاران، 1980). در نتیجه، برای رسیدن به عملکرد بهینه محصول، کودهای فسفاتی محلول باید به میزان بالا استفاده شوند که موجب مشکلات اقتصادی و زیست محیطی می‌شود (برادی، 1990). از طرف دیگر، چون کمبود پتاسیم قابل استفاده در خاک به آسانی به علت جذب توسط محصول، رواناب، آبشوئی و فرسایش رخ می‌دهد، بنابراین این کمبود نیز مشکل‌ساز می‌باشد (شنگ و همکاران، 2002). خاک‌ها به طور معمول حاوی 5-1 درصد آهن می‌باشند که بخش عمده آن در کانی‌های سیلیکاتی، اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن و به شکل غیرقابل استفاده برای گیاهان وجود دارد (شولتی، 2004). در صورت کمبود آهن قابل استفاده در خاک می‌توان از کودهای شیمیائی مثل سولفات آهن و یا کلات‌های آهن استفاده کرد. وقتی کودهای شیمیائی آهن‌دار به خاک اضافه می‌شوند آهن اضافه شده در خاک به سرعت تغییر ظرفیت داده و به شکل غیر قابل استفاده برای گیاه در می‌آید (شولتی، 2004). از طرفی استفاده از کلات‌های آهن در بعضی مواقع موفقت آمیز است، با این حال کلات‌های آهن در خاک پایدار نیستند و در بازه گسترده‌ای از pH تغییر می‌کنند. همچنین حضور عناصر دیگری مثل کلسیم پایداری آنها را کاهش می‌دهد (شولتی، 2004). بنابراین استفاده از منابع معدنی بومی خاک مثل فلدسپارها، میکاها و سنگ فسفات می‌تواند جایگزین مناسبی برای کودهای ذکر شده باشد (بدر و همکاران، 2006)، این منابع هم سودمندتر هستند و هم سازگاری بالایی با محیط زیست دارند (راجان و همکاران، 1996). هر چند که سنگ فسفات و کانی‌های آهن و پتاسیم‌دار برای تأمین پتاسیم، آهن و فسفر مورد نیاز گیاه نسبت به کودها منابع ارزان‌تری هستند، با این حال بیشتر آنها به راحتی قابل استفاده برای گیاه نیستند. زیرا این عناصر به کندی آزاد شده و استفاده از آنها به عنوان کود اغلب باعث می‌شود که تفاوت معنی‌داری در تولید محصول مشاهده نگردد (زاپاتا و روی، 2004). استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) شامل باکتری‌های آزاد کننده فسفر، آهن و پتاسیم به عنوان کود میکروبی برای تغذیه بهتر گیاه و افزایش تولید به عنوان یک راه حل پایدار پیشنهاد شده است. باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB) قادر به تبدیل سنگ فسفات نامحلول به شکل‌های محلول قابل استفاده برای رشد گیاه هستند (ناهاز و همکاران، 1990؛ بوجینووا و همکاران، 1997). این تبدیل از طریق تولید اسید، ترکیبات کلات کننده و واکنش‌های تبادلی رخ می‌دهد (گرکی، 1992). باکتری‌های جنس باسیلوس جزو باکتری‌های متداول خاک هستند که نقش مهمی در تجزیه سیلیکات‌ها در طی فرایند خاکسازی ایفا می‌کنند (هان و همکاران، 2006؛ لی و همکاران، 2006). توانائی باسیلوس مگاتریوم سویه فسفوتیکوم برای انحلال سنگ فسفات شناخته شده است (سکلینگ و همکاران، 1998). از طرف دیگر، باکتری‌های سیلیکاتی قادر به آزادسازی عناصری مثل پتاسیم، آهن، آلومینیوم و سیلیسیوم از کانی‌های سیلیکاتی حاوی این عناصر مثل میکا، ایلایت و فلدسپار از طریق تولید و ترشح اسیدهای آلی هستند (فردریچ و همکاران، 1991؛ آلمن و همکاران، 1996). این نشان می‌دهد که باکتری‌های سیلیکاتی آزاد کننده پتاسیم و آهن مثل باسیلوس موسیلوژنوس[1]، باسیلوس مگاتریوم، باسیلوس سریوس[2] و باسیلوس پومیلوس[3] قادر به افزایش پتاسیم و آهن قابل استفاده در خاک و افزایش مقدار این عناصر معدنی در گیاه می‌باشند (هو و بویر، 1996؛ شنگ و همکاران، 2002؛ ستیکووا، 2003). هدف از این مطالعه ارزیابی پتانسیل هفت سویه از باکتری‌های سیلیکاتی در آزادسازی فسفر، پتاسیم و آهن از کانی‌های حاوی این عناصر در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

تعدادی ایزوله باکتری با روش سری رقت از اراضی استان آذربایجان شرقی جدا شدند. در بین ایزوله‌های جدا شده هفت سویه پس از غربال‌گری و شناسائی با مشاهدات میکروسکوپی، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی و توالی یابی 16S rDNA به عنوان باکتری‌های سیلیکاتی شناسائی شدند (کشاورز زرجانی، 1390 و Keshavarz-Zarjani et al., 2013). این سویه‌ها شامل Lysinibacillus fusiformis (JK1)، (JK2) Arthrobacter sp و Bacillus megaterium سویه‌های JK3، JK4، JK5، JK6 و JK7 بودند. این سویه‌ها ابتدا در

1. *mucilaginosus Bacillus*
2. *Bacillus cereus*
3. *Bacillus pumilus*

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت نوترینت براث و در دمای 28 درجه سانتی-گراد تکثیر شده و سوسپانسیون باکتریائی با OD= /7. در λ= 600 (جمعیت حدود 1-cfu ml 108) به دست آمد. کانی‌های استفاده شده بیوتیت بوده که به عنوان منبع پتاسیم و آهن و تری کلسیم فسفات به عنوان منبع فسفر در این آزمایش استفاده شدند. در ارزیابی پتانسیل سویه-های مختلف برای آزادسازی فسفر، پتاسیم و آهن توانائی هفت سویه از باکتری‌های مختلف از محیط کشت پیکووسکیا (PVK) (پیکووسکیا، 1948) و محیط کشت اصلاح شده الکساندروو (MA) (زهرا، 1969) برای ارزیابی استفاده شد. محیط کشت پیکووسکیا (PVK) شامل: گلوکز 10 گرم، سولفات آمونیوم 0/5 گرم، کلرید سدیم 0/2 گرم، سولفات منیزیم 0/1 گرم، کلرید پتاسیم 0/2 گرم، عصاره مخمر 0/5 گرم، سولفات منیزیم 0/002 گرم، سولفات آهن 0/002 گرم، تری کلسیم فسفات 5 گرم، آب مقطر 1000 میلی‌لیتر و pH=7/4 بود. محیط کشت اصلاح شده الکساندروو (MA) (زهرا، 1969) شامل ساکاروز 5 گرم، فسفات سدیم 2 گرم، سولفات منیزیم 0/5 گرم، کربنات کلسیم 0/1 گرم، کلرید آهن 0/005 گرم، دی هیدروژن مولیبدات 0/002 گرم، کانی بیوتیت پودر شده 2 گرم*، آب مقطر 1000 میلی‌لیتر و pH=7/4 بود.

آماده‌سازی و اسیدشوئی کانی بیوتیت

کانی بیوتیت از معدن قره باغ ارومیه واقع در استان آذربایجان غربی تهیه شد. سپس توسط XRD و XRF آنالیز شد . این کانی در آزمایشگاه به وسیله آسیاب فلزی پودر شده و از غربال 0/1 میلی‌متری عبور داده شد. بخش عبور داده از غربال با HCl 0/01 مولار شستشو داده شد تا پتاسیم قابل استفاده خارج گردد. برای اطمینان از خروج کامل پتاسیم قابل استفاده، پتاسیم با روش استات آمونیم استخراج و اندازه‌گیری شد و اسیدشویی تا حصول اطمینان از خروج کامل پتاسیم قابل استفاده ادامه یافت. سپس pH نهایی با هیدروکسید کلسیم به همان pH اولیه رسانده شد و نمونه تا رسیدن به حجم ثابت در آون در دمای 50 درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت 2 گرم از نمونه خشک شده در آون به محیط کشت اصلاح شده الکساندروو (MA) اضافه شد. آزمایش در ارلن مایر 100 میلی‌لیتری محتوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت پیکووسکیا (PVK) یا محیط کشت اصلاح شده الکساندروو (MA) انجام شد. یک میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریائی (جمعیت حدود $cfu\ ml^{-1}$ 108) به 50 میلی‌لیتر از محیط کشت پیکووسکیا یا محیط کشت اصلاح شده الکساندروو اضافه گردید و در دستگاه شیکر انکوباتور به مدت پنج روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد و دور120 نگهداری شدند. به ازای هر تیمار چهار تکرار بکار برده شد. محیط کشت حاصله را به مدت 10 دقیقه در 3000rpm سانتریفیوژ کرده و pH محیط کشت مستقیماً با دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. در نهایت غلظت فسفر (در محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات)، پتاسیم و آهن (در محیط کشت حاوی بیوتیت) در محلول‌رویی به ترتیب توسط دستگاه اسپکتوفتومتری برای اندازه‌گیری فسفر (السن و همکاران، 1982)، فلیم‌فتومتری برای اندازه‌گیری پتاسیم و جذب اتمی برای اندازه‌گیری آهن استفاده شد.

مقدار پتاسیم قابل استفاده که با استفاده از استات آمونیوم یک نرمال از کانی بیوتیت پودر شده استخراج و اندازه‌گیری شد، 7867 میلی‌گرم در کیلوگرم بود (جدول 1). همچنین جدول 1 مقدار پتاسیم استخراج شده توسط HCl 0/01 مولار طی هر بار استخراج و همچنین مقدار تجمعی پتاسیم آزاد شده از کانی بیوتیت در مقابل مراحل استخراج را نشان می‌دهد. برای اطمینان از خروج کامل پتاسیم قابل استفاده از کانی بیوتیت پودر شده، با HCl 0/01 مولار دو بار به طور متوالی اسیدشوئی انجام گرفت. سویه باکتری‌های مذکور به محیط کشت استریل شده MA حاوی کانی بیوتیت اسیدشویی شده اضافه شد تا پتانسیل باکتری در آزادسازی پتاسیم و آهن از کانی مذکور مورد ارزیابی قرار گیرد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تجزیه واریانس‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16 و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گردید.

نتایج

نتایج آنالیزهای XRD و XRF کانی بیوتیت خالص قبل از آزمایش

نتیجه حاصل از آنالیز XRD نمونه خالص بیوتیت مورد استفاده در این آزمایش در شکل 1 آورده شده است. از طرفی نتیجه XRF این نمونه (جدول 2) میزان عناصر مختلف موجود در این کانی را نشان می‌دهد که درصد بالای پتاسیم موجود در این کانی تائیدی بر خلوص این کانی می‌باشد.

فرمول ساختمانی بیوتیت مورد استفاده در این آزمایش بصورت زیر است:

$K(Mg,Fe^{+2})\ 3(Al,Fe^{+3})\ Si_3O_{10}(OH,F)_2$

Archive of SID

www.SID.ir

توانایی سویه‌های مختلف در آزادسازی پتاسیم از محیط کشت MA (دارای بیوتیت)

سویه‌های مورد آزمایش برای تست از نظر توانایی در آزادسازی پتاسیم به محیط کشت MA که حاوی کانی بیوتیت بود، افزوده شدند. بعد از تلقیح باکتری‌ها به محیط کشت مایع MA و قرار دادن در دستگاه شیکر انکوباسیون به مدت 5 روز، pH و مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی بیوتیت اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس جدول 3 نشان می‌دهد که بین سویه‌ها از نظر آزادسازی پتاسیم در محیط کشت مایع MA تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$). اما هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش pH در محیط کشت مایع نسبت به شاهد بدون باکتری مشاهده نشد. مقایسه میانگین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی بیوتیت در شکل 2 نشان داده شده است. مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی بیوتیت بین 1/88 تا 3/1 میلی‌گرم در گرم بر اثر تلقیح توسط سویه‌ها متفاوت بود.

بیشترین مقدار پتاسیم آزاد شده از محیط کشت MA مربوط به سویه JK7 (3/1 میلی‌گرم در گرم) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 77/14 درصد افزایش نشان داد و با سویه‌های JK1، JK2، JK4 و JK5 دارای تفاوت معنی‌دار بود و تفاوت معنی‌داری با سویه‌های JK6 و JK3 نداشت. در بین تیمارهای باکتریایی، سویه JK5 (1/88 میلی‌گرم در گرم) دارای کمترین مقدار پتاسیم آزاد شده از محیط کشت دارای بیوتیت بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 7/42 درصد افزایش نشان داد و با سویه‌های JK1،JK2 و JK4 تفاوت معنی‌داری نداشت ولی با سویه‌های JK7، JK6 و JK3 دارای تفاوت معنی‌دار بود.

توانایی باکتری‌ها در آزادسازی آهن از محیط کشت MA (حاوی بیوتیت)

تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد که بین سویه‌ها از نظر آزادسازی آهن در محیط کشت مایع MA تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p<0.01$). مقایسه میانگین مقدار آهن آزاد شده از کانی بیوتیت در شکل3 نشان داده شده است. مقدار آهن آزاد شده از کانی بیوتیت بین 0/18 تا 0/29 میلی‌گرم در گرم برای تیمارهای تلقیح شده بود. بیشترین مقدار آهن آزاد شده از محیط کشت MA حاوی کانی بیوتیت مربوط به سویه JK7 (0/29 میلی‌گرم در گرم) بوده که نسبت به شاهد بدون باکتری 93/33 درصد افزایش نشان داد و با بقیه سویه‌ها دارای تفاوت معنی‌داری بود. در بین تیمارهای باکتریایی، سویه JK3 (0/18 میلی‌گرم در گرم) دارای کمترین مقدار آهن آزاد شده از محیط کشت دارای کانی بیوتیت بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 20 درصد افزایش نشان داد و با سویه‌های JK1، JK2، JK4 و JK5 تفاوت معنی‌داری نداشت ولی با سویه JK7 دارای تفاوت معنی‌دار بود. pH محیط کشت MA حاوی بیوتیت نسبت به شاهد طی پنج روز انکوباسیون هیچ تغییری نشان نداد. این امر احتمالاً می‌تواند به خاطر وجود ناخالصی‌هائی مثل اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و سدیم در این کانی بوده که در اثر هوازدگی کانی بیوتیت، این ترکیبات آزاد و وارد محیط کشت شده است و در نتیجه موجب قلیائی شدن محیط کشت در اثر تولید یون OH و مانع از اسیدی شدن محیط کشت شده است.

تأثیر تلقیح باکتری‌ها روی آزادسازی فسفر و pH از محیط کشت پیکووسکیا (PVK)

جدول 3 نشان می‌دهد که مقدار فسفر آزاد شده از محیط کشت پیکووسکیا توسط سویه‌های مختلف در مقایسه با شاهد در سطح احتمال یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p<0.01$). جزئیات مقدار فسفر آزاد شده در محیط کشت بعد از پنج روز انکوباسیون و pH در شکل 4 و 5 نشان داده شده است. انحلال تری کلسیم فسفات در محیط کشت مایع توسط سویه‌های مختلف به طور معنی‌داری با کاهش pH افزایش پیدا کرد. دامنه تغییرات غلظت فسفر در محیط کشت مایع تلقیح شده با سویه‌های مختلف باکتری بین 44/94 تا 61/26 میلی‌گرم در گرم بود.

بیشترین غلظت فسفر در محیط کشت مایع مربوط به سویه JK7 (61/26 میلی‌گرم در گرم) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 48/58 درصد افزایش نشان داد و pH محیط کشت به همان نسبت به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. سویه JK1 (44/94 میلی‌گرم در گرم) به دنبال آن سویه JK2 (48/49 میلی‌گرم در گرم) دارای کمترین فسفر آزاد شده در محیط کشت مایع بودند ولی نسبت به شاهد بدون باکتری 8/99 و 17/6درصد افزایش نشان دادند و pH محیط کشت تلقیح شده با این سویه‌ها نسبت به محیط کشت تلقیح شده با بقیه سویه‌ها بالاتر بودند، هر چند که pH محیط کشت تلقیح شده با تمام سویه‌های مورد آزمایش نسبت به شاهد بدون باکتری به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. با وجود اینکه سویه‌های JK7 و JK1 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تأثیر در آزادسازی فسفر از محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات بودند ولی بین تمام سویه‌های مورد آزمایش از نظر آزادسازی فسفر اختلاف معنی‌دار وجود داشت($p<0.01$).

بحث

با استفاده از استات آمونیوم یک نرمال می‌توان پتاسیم قابل استفاده را از خاک استخراج و اندازه‌گیری

Archive of SID

www.SID.ir

کرد، ولی یون‌های استات باقیمانده در خاک دارای فعالیت ضد باکتری می‌باشند (ایشرات و همکاران، 2011). به همین دلیل در این تحقیق برای خارج کردن پتاسیم قابل استفاده از HCl 0/01 مولار به جای استات آمونیوم یک نرمال استفاده شد تا از هر آسیب ناخواسته به باکتری‌ها جلوگیری شود.

مطالعات نشان دادند که باکتری‌ها با تجزیه کانی‌های فسفر، آهن و پتاسیم‌دار مثل سنگ فسفات، میکا و فلدسپار می‌توانند باعث آزادسازی فسفر و پتاسیم و عناصر دیگر مثل آهن و سیلیسیم شوند (آلمن و همکاران، 1996؛ چن، 2006؛ شنگ و هی، 2006؛ سونگ و همکاران، 2007؛ شنگ و همکاران، 2008؛ گایرگیس، 2008). نتایج نشان داد که غلظت پتاسیم، آهن و فسفر در محیط کشت مایع تلقیح شده با سویه‌های مختلف به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. تحقیقات نشان دادند که توانائی باکتری‌ها در تجزیه کانی‌ها می‌تواند به علت تولید و ترشح پروتون، اسیدهای آلی، سیدروفورها و پلی-ساکاریدهای خارج سلولی باشد (گرودیو، 1987؛ ولچ و همکاران، 1999؛ لیرمن و همکاران، 2000؛ روجرس و بنت، 2004). هنریچز و همکاران (2003) و چن و همکاران (2006) گزارش کردند که بعضی سویه‌های باسیلوس مگاتریوم و آرتروباکتر قادر به تولید اسیدهای آلی و سیدروفور هستند. این گزارش پیشنهاد می‌کند که اسیدهای آلی و سیدروفور می‌توانند نقش مهمی در آزادسازی عناصری مثل پتاسیم، آهن، و فسفر از کانی‌های بیوتیت و تری کلسیم فسفات به وسیله حداقل سه مکانیسم ایفا کنند: 1- تجزیه کانی در اثر کاهش pH محیط کشت (با تولید و ترشح اسیدهای آلی)2- تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی (از طریق سیدروفور و اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌ها) 3- پلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌ها که به طور غیر-مستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارد: این پلی ساکاریدها، اسیدهای آلی و سیدروفورها را به شدت جذب کرده و منجربه تشکیل غلظت بالائی از اسیدهای آلی و سیدروفورها در نزدیکی سطح کانی شده و با اکسید سیلیسیم موجود در سطح کانی کمپلکس کرده است و این عنصر از سطح کانی آزاد شده و وارد محیط کشت محلول شده است از طرفی پلی‌ساکاریدهای موجود در محیط کشت این عنصر را جذب کرده و باعث به هم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع شده است و در نهایت منجربه آزاد شدن عناصری مثل پتاسیم و آهن گردیده است (لی و همکاران، 2006؛ دریور و ستلینگز، 1997). روابط مشاهده شده بین کاهش pH و مقدار فسفر آزاد شده از محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات نشان می-دهد که به احتمال زیاد اسیدهای آلی تولید شده توسط سویه‌های JK1 تا JK7 یک نقش معنی‌داری در اسیدی کردن محیط کشت ایفا می‌کنند. روابط مشابهی بین کاهش pH و انحلال فسفر از محیط کشت حاوی سویه‌های آرتروباکتر و باسیلوس مگاتریوم توسط چن و همکاران (2006) گزارش شد. این محققان گزارش کردند که مکانیسم اصلی در کاهش pH، تولید و ترشح اسیدهای آلی در محیط کشت مایع می‌باشد. از طرفی pH محیط کشت حاوی بیوتیت نسبت به شاهد طی پنج روز انکوباسیون هیچ تغییری نشان نداد که این احتمالاً می‌تواند به خاطر وجود ناخالصی‌هائی مثل اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و سدیم در این کانی بوده که در اثر هوازدگی کانی بیوتیت، این ترکیبات آزاد و وارد محیط کشت شده است و در نتیجه موجب قلیائی شدن محیط کشت در اثر تولید یون OH و مانع از اسیدی شدن محیط کشت شده است. گرودیو (1987)و ساگمارن و جانارتام (2007)گزارش کردند که pH محیط کشت حاوی مسکوویت، میکروکلین و یا ارتوکلاز تلقیح شده با باسیلوس موسیلوژنوس هیچ تغییری در طول پنج روز انکوباسیون رخ نداد و به نظر می‌رسد که پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده توسط این باکتری در تجزیه این کانی‌ها و آزادسازی پتاسیم مؤثر واقع شده است. چون در pH محیط کشت حاوی بیوتیت تلقیح شده با سویه‌های نام برده تغییری مشاهده نشد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که از مکانیسم-های احتمالی در آزادسازی پتاسیم و آهن، تولید اسیدهای آلی و سیدروفور بوده که با عناصر موجود در سطح کانی کمپلکس کرده و موجب آزادسازی این عناصر شده است و یا اکسید سیلیسیم از طریق تشکیل کمپلکس با ترکیبات آلی از سطح کانی آزاد شده و در محلول با پلی‌ساکاریدها ترکیب شده است و باعث به هم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع شده است و در نهایت منجربه آزاد شدن پتاسیم و آهن گردیده است. پتانسیل آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر بین سویه‌های مورد آزمایش متفاوت بود و به نظر می‌رسد که نوع و مقدار ترکیبات آلی تولید شده توسط سویه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده است. هر چند که pH محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات تلقیح شده با سویه JK3 نسبت به سویه‌های JK4 و JK5پایین‌تر بود، ولی مقدار فسفر آزاد شده توسط این سویه کمتر از سویه‌های JK4 و JK5 بود و این نشان می-دهد که احتمالاً ترکیبات آلی کمپلکس کننده، تولید شده توسط این دو سویه بیشتر بوده و در آزادسازی فسفر با توجه به پایین‌تر بودن pH محیط کشت تلقیح شده با

Archive of SID

www.SID.ir

سویه JK3 مؤثرتر واقع شده است. در بین تمام سویه‌های مورد آزمایش سویه JK7 در آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر از محیط کشت حاوی بیوتت و تری کلسیم فسفات نسبت به بقیه سویه‌ها مؤثرتر واقع شد هر چند که بین این سویه و سویه‌های JK6 و JK3 از نظر آزادسازی پتاسیم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. می توان احتمال داد که هم ترکیبات آلی کمپلکس کننده و هم اسیدهای آلی (که در کاهش pH نقش دارند) توسط سویه‌های نام برده تولید شده است چون از یک طرف pH محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات به طور معنی‌داری کاهش نشان داد و از طرف دیگر آزادسازی پتاسیم و آهن تلقیح شده توسط این سویه‌ها معنی‌دار شد بدون اینکه pH کاهش پیدا کند. مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که *Lysinibacillus fusiformis* سویه JK1، *Arthrobacter sp*(JK2) و *Bacillus megaterium* سویه‌های JK3، JK4، JK5، JK6 و JK7 می‌توانند به طور معنی‌داری منجربه آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر از کانی‌های بیوتیت و تری کلسیم فسفات شوند ولی مکانیسم‌های واقعی که باعث تجزیه این کانی‌ها و آزادسازی عناصر نام برده شده در این کار تحقیقاتی ناشناخته باقی ماند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تمام سویه‌های مورد آزمایش جدا شده از خاک منطقه به طور معنی‌داری قادر به آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر از کانی‌های بیوتیت و تری کلسیم فسفات در شرایط درون شیشه‌ای شدند هر چند که پتانسیل آزادسازی این عناصر بین سویه‌های مورد آزمایش متفاوت بود. در محیط کشت مایع حاوی بیوتیت و تری کلسیم فسفات سویه JK7 نسبت به بقیه سویه‌ها در آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر کارآمدتر بود. چون این آزمایش در داخل انکوباتور با دمای ثابت و بهینه و در داخل ارلن مایر صورت گرفته لذا نتایج آزمایش فقط برای شرایط مندرج در این تحقیق صادق است و برای تعمیم دادن آن به سایر شرایط و طبیعت باید آزمایش تکمیلی صورت پذیرد. بنابراین می‌توان این سویه‌ها را بخصوص سویه JK7 به عنوان باکتری‌های کارآمد در آزادسازی پتاسیم، آهن و فسفر در کارهای تحقیقاتی آتی استفاده کرد

جدول 1- اسیدشوئی کانی بیوتیت مورد آزمایش

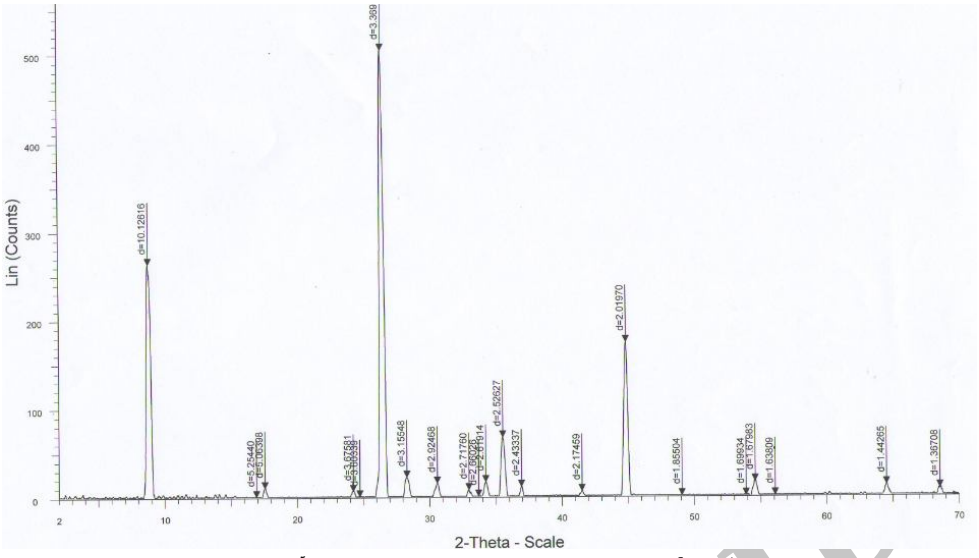
تعداد مراحل استخراج	مقدار پتاسیم استخراج شده توسط 0/01 مولار HCl (میلی‌گرم در گرم)	مقدار تجمعی پتاسیم استخراج شده (میلی‌گرم در گرم)	زمان تجمعی (دقیقه)	پتایسم قابل استفاده اندازه‌گیری شده توسط استات آمونیوم (میلی‌گرم در گرم)
	بیوتیت	بیوتیت		
مرحله اول	5900	5900	30	
مرحله دوم	3700	**9600**	60	
مرحله سوم	1640	11240	90	
مرحله چهارم	1380	12620	120	7867
مرحله پنجم	1180	13800	150	
مرحله ششم	860	14660	180	
مرحله هفتم	760	15420	210	
معادله بیوتیت شسته شده با 0/01HCl مولار		Y=6003+4835 Lnx R^2= 99.87		

جدول 2- ترکیب عناصر کانی بیوتیت مورد استفاده بر حسب درصد با استفاده از فلورسانس پرتو ایکس

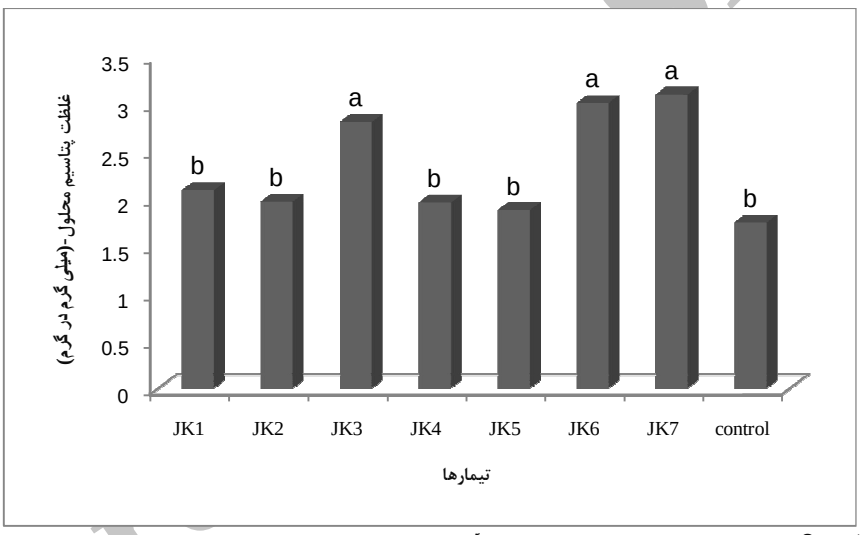
کانی	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MgO	CaO	Na_2O	K_2O	MnO
بیوتیت	39/30	18/18	15/75	12/21	0/11	0/22	9/44	0/45

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1- نتیجه XRD کانی بیوتیت مورد استفاده در آزمایش



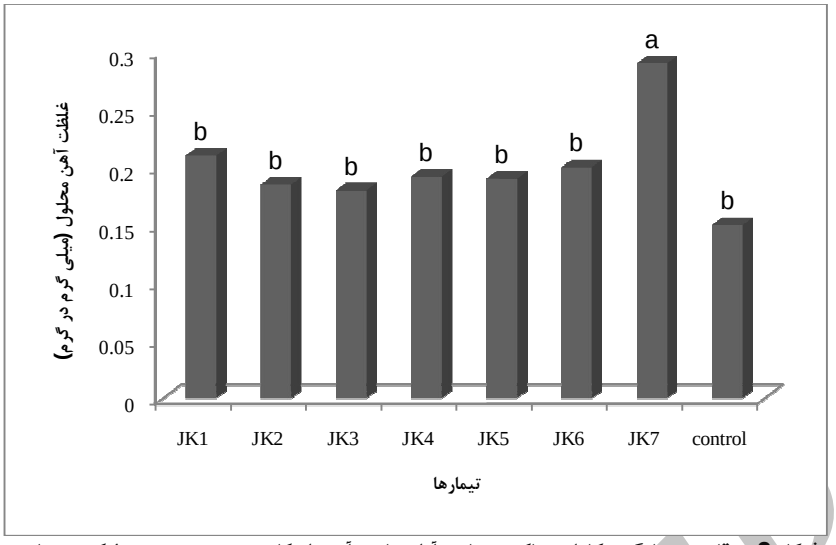
شکل 2- مقایسه میانگین کارایی باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های بیوتیت در محیط کشت مایع

جدول 3- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری در تیمارهای باکتریائی

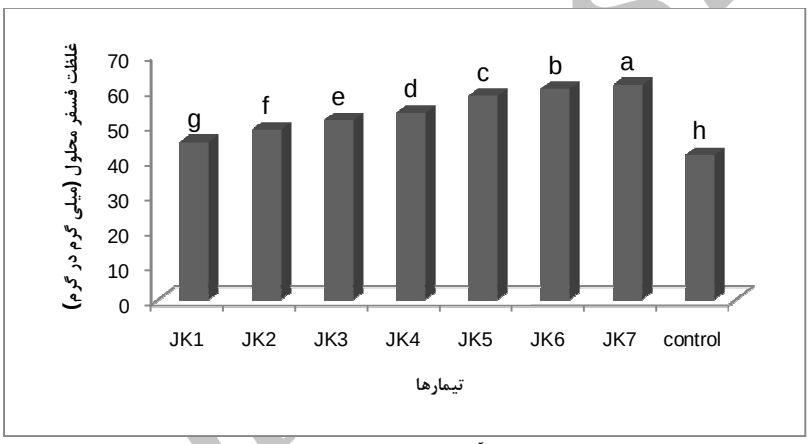
منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	غلظت پتاسیم محلول	غلظت آهن محلول	غلظت فسفر محلول	pH محیط کشت پیکووسکیا
سویه باکتری	7	0/928**	0/006**	211/2**	0/533**
خطا	24	0/067	0/001	0/056	0/022
ضریب تغییرات (%)		11/12	16/08	0/45	2/43

** بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد می‌باشد.

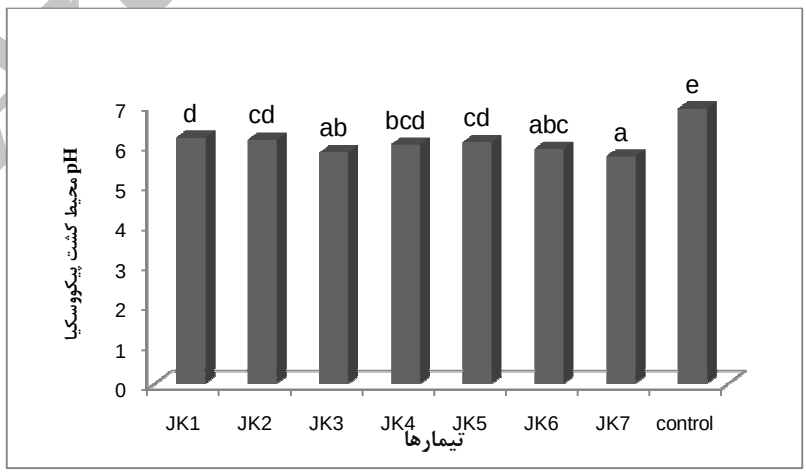
www.SID.ir



شکل 3- مقایسه میانگین کارایی باکتری‌ها در آزادسازی آهن از کانی بیوتیت در محیط کشت مایع



شکل 4- مقایسه میانگین کارایی باکتری‌ها در آزادسازی فسفر از کانی تری کلسیم فسفات در محیط کشت مایع



شکل 5- تأثیر تلقیح باکتری‌ها روی pH از محیط کشت پیکووسکیا

www.SID.ir

فهرست منابع:

1. کشاورز زرجانی ج، 1390. جداسازی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم از خاک و تأثیر آنها بر جذب پتاسیم توسط گیاه گوجه-فرنگی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
2. Badr, M.A., Shafei, A.M., and S.H. Sharaf El-Deen. 2006. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2: 5-11.
3. Bojinova, D., Velkova, R., Grancharov, I., and S. Zhelev. 1997. The bioconversion of Tunisian phosphorite using *Aspergillus niger*. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 47: 227–232.
4. Brady, N.C. 1990. The Nature and Properties of Soils. Macmillan, New York, USA. P. 351–380.
5. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., and F.T. Shen. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology. 34: 33–41.
6. Drever, J.I., and L.L. Stillings. 1997. The role of organic acids in mineral weathering. Colloids Surf. 120: 167-181.
7. Friedrich, S., Platonova, N.P., Karavaiko, G.I., Stichel, E., and F. Glombitza. 1991. Chemical and microbiological solubilization of silicates. Acta Biotechnologica.11: 187–196.
8. Gerke, L. 1992. Phosphate, aluminum, and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. Z. Pfl.-Ernähr. Bodenkde. 155: 17–22.
9. Girgis, M. G. Z., Khalil, H.M.A., and M.S. Sharaf. 2008. In Vitro Evaluation of Rock Phosphate and Potassium Solubilizing Potential of Some *Bacillus* Strains. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2: 68-81.
10. Groudev, S.N. 1987. Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. Acta Biotechnologica. 7: 299–306.
11. Han, H.S., Supanjani, and K.D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant, Soil and Environment. 52: 130-136.
12. Heinrichs, D.E., Rahn, A., Dale, S.E. and Sebulsky, M.T. 2004. Iron transport systems in pathogenic bacteria: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Bacillus*. p. 387-401. In: J.H. crosa et al. (ed.) Iron transport in bacteria. American Society of Agronomy. Wisconsin, DC.
13. Hu, X., and G.L. Boyer. 1996. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. Applied and Environmental Microbiology. 62: 4044-4048.
14. Ishrat, J.B., Laizuman, N., Farhana, A.R., and H. Obaydul. 2011. Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activity of Chloroform, n-hexane and Ethyl Acetate extract of plant Amaranthuss pinosus. International Journal of Pharm Tech Research. 3:1675-1680.
15. Keshavarz-Zarjani, J., Aliasgharzad, N., Oustan, Sh., Emadi, M. and Ahmadi. 2013. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. Archives of agronomy and soil science. In press.
16. Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L., and J.G. Ferry. 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. Geochimica et Cosmochimica Acta. 64: 587- 602.
17. Liu, W., Xu, X., Wu, X., Yang, Q., Luo, Y., and P. Christie. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. Environ. Geochemistry and Health. 28: 133-140.
18. Nahas, E., Banzatto, D.A., and L.C. Assis. 1990. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. Soil Biology and Biochemistry. *22*: 1097–1101.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Olsen, S.R., and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. p. 403–430. In: A.L. Page et al. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. No. 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
20. Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologiya. 17: 362-370.
21. Rajan, S.S.S., Watkinson, J.H., and A.G. Sinclair. 1996. Phosphate rock of for direct application to soils. Advances in agronomy. 57: 77–159.
22. Rogers, J.R., and P.C. Bennett. 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chemical Geology. 203: 91-108.
23. Sample, E.C., Soper, R.J., and G.J. Racz. 1980. Reactions of phosphate fertilizers in soils. p. 263–310. In: F.E. Khasawneh et al. (ed.) the Role of Phosphorus in Agricultures. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.
24. Schilling, G., Gransee, A., Deubel, A., Lezovic, G., and S. Ruppel. 1998. Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. Z. Pfl.- Ernähr. Bodenkde. 161: 465–478.
25. Schulte, E.E. 2004. Soil and applied iron. Proceedings of the May 8 and June 30, 2004 Acts of congress. Wisconsin, wisconsin-Extension.
26. Sheng, X.F., and L.Y. He. 2006. Solubilization of potassium bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian Journal of Microbiology. 52: 66-72.
27. Sheng, X.F., He, L.Y. and W.Y. Huang. 2002. The conditions of releasing potassium by a silicate-dissolving bacterial strain NBT. Agricultural Sciences in China. 1: 662–666.
28. Sheng, X.F., Zhao, F., He, L.Y., Qiu, G. and Chen, L. 2008. Isolation and characterization of silicate mineral solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfacees of weathered feldspar. Canadian Journal of Microbiology. 54: 1064-1068.
29. Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C.T., Hatta, T., and Y. Matsukura. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: a laboratory experiment. Catena. 70: 275-281.
30. Styriakova, I., Styriak, I., Galko, I., Hradil, D., and P. Bezdicka. 2003. The release of Iron-bearing minerals and dissolution of feldespars by heterotrophic bacteria of *Bacillus* species. Ceramics Silikáty. 47: 20-26.
31. Sugumaran, P., and B. Janarthanam. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Sciences. 3: 350-355.
32. Ullman, W.J., Kirchman, D.L., and S.A. Welch. 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. Chemical Geology. 132: 11–17.
33. Welch, S.A., and W.J. Ullman. 1999. The effect of microbial glucose metabolism on feldspar dissolution rates between 5 and 35 °C. Geochimica et Cosmochimica Acta 63: 3247-3259.
34. Zahra, M.K. 1969. Studies on silicate bacteria. Master's Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, pp: 44-71.
35. Zapata, F., and R.N. Roy. 2004. Use of Phosphate Rock for Sustainable Agriculture. FAO and IAEA, Rome, Italy.

Archive of SID

www.SID.ir