

مدل سازی کمی رهاسازی پتاسیم از فلدسپار توسط باکتری باسیلوس

ساناز اشرفی سعیدلو^۱، میرحسن رسولی صدقیانی^۲، فرخ اسدزاده^{۳*}، محسن برین^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

۲. دانشیار، گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

۳. استادیار، گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

۴. استادیار، گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

(تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۹)

چکیده

پتاسیم یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاهان بوده و در ساختار بسیاری از کانی‌های سیلیکاته‌ی خاک یافت می‌شود. برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گل‌سنگ‌ها کارایی بالایی در تجزیه سیلیکات‌ها و آزادسازی عناصری نظیر پتاسیم از آن‌ها را دارند. این مطالعه با هدف مدل‌سازی و ارزیابی تأثیر متغیرهای pH، زمان انکوباسیون و مقادیر مختلف کانی فلدسپار بر میزان رهاسازی پتاسیم توسط باکتری *Bacillus sp.* انجام شد. برای این منظور دامنه‌های متفاوتی از این سه متغیر شامل pH (۵-۹)، زمان انکوباسیون (۱-۱۷ روز) و فلدسپار (۷-۱ گرم در لیتر) در نظر گرفته شده و طرح مرکب مرکزی با ۲۰ آزمایش و بر اساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل طراحی شد. نتایج نشان داد که مدل طرح مرکب مرکزی قابلیت مطلوبی ($R^2 = 0/892$ و $RMSE = 1/96 \text{ mg l}^{-1}$) در پیش‌بینی مقدار پتاسیم محلول دارد. تحلیل حساسیت مدل طرح مرکب مرکزی نشان داد که از بین سه متغیر مورد بررسی، مقدار کانی فلدسپار و pH بیشترین تأثیر را بر آزادسازی پتاسیم دارند بطوری‌که درصد اثر این دو متغیر بر مقدار پتاسیم محلول به ترتیب برابر با ۳۷/۴۸ و ۳۱/۸۰ درصد به دست آمد. حداکثر غلظت پتاسیم محلول در پایین‌ترین pH و بیشترین مقدار کانی فلدسپار مشاهده شد. زمان انکوباسیون نیز تأثیر معنی‌داری بر آزادسازی پتاسیم داشت. روند آزادسازی پتاسیم در مراحل اولیه انکوباسیون افزایشی، در مراحل میانی کاهش و در ادامه افزایشی بود. به‌طور کلی افزایش مقدار کانی فلدسپار و طول دوره‌ی انکوباسیون همراه با pH اولیه‌ی پایین محیط، سبب افزایش قابل توجه کارایی باکتری *Bacillus sp.* در انحلال پتاسیم شد.

واژه‌های کلیدی: میکروارگانیسم‌های خاک، آزادسازی پتاسیم، طرح مرکب مرکزی

مقدمه

بوده و سریعاً در دسترس گیاه قرار می‌گیرد (Lotfi Parsa et al., 2012; Parmar and Sindhu, 2013). پتاسیم غیرتبادلی نیز از مکان‌های گوه‌ای و بین‌لایه‌ای میکاها که یون پتاسیم را تثبیت می‌کنند، آزاد می‌شود (Mengel and Kerkby, 2001). پتاسیم ساختمانی نیز که بیشترین مقدار پتاسیم خاک را تشکیل می‌دهد، در ساختار کانی‌های اولیه پتاسیم‌دار نظیر میکاها، فلدسپارها و سیلیکات‌های رسی شبه‌میکایی وجود دارد. این کانی‌ها منشأ اصلی تأمین پتاسیم و ذخیره این عنصر در خاک‌ها محسوب می‌شوند (Tisdale et al., 2003). اگرچه اشکال تبادلی و محلول پتاسیم به‌عنوان دو شکل قابل‌دسترس برای گیاهان محسوب می‌شوند، ولی نتایج پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که شکل‌های غیرتبادلی و ساختمانی پتاسیم نیز می‌توانند در تغذیه گیاه نقش داشته باشند (Sparks and Huang, 1985).

پتاسیم یکی از عناصر ضروری رشد گیاه بوده و اهمیت آن در کشاورزی به‌خوبی شناخته شده است. گیاهان پتاسیم‌موردنیاز خود را از طریق کودهای شیمیایی افزوده‌شده و یا پتاسیم موجود در خاک تأمین می‌نمایند. پتاسیم در خاک به چهار شکل محلول، تبادلی، غیرتبادلی و ساختمانی وجود دارد که قابلیت استفاده این اشکال برای گیاه متفاوت بوده و انتقال پتاسیم بین آن‌ها به‌صورت برگشت‌پذیر صورت می‌گیرد (Syers, 2002). تعادل بین اشکال مختلف پتاسیم در خاک، منجر به تداوم تأمین پتاسیم با آبشویی و یا مصرف آن توسط گیاه می‌گردد. علیرغم اینکه مقدار کل پتاسیم در اکثر خاک‌ها عموماً زیاد است، باین‌حال فقط بخش کوچکی از آن به شکل محلول

* نویسنده مسئول : f.asadzadeh@urmia.ac.ir

(Exo polysaccharide) و آنزیم‌ها از دیگر عوامل تأثیرگذار بر انحلال کانی‌ها می‌باشند (Baker *et al.*, 1998; Groudev, 1987). فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه توانایی آزادسازی پتاسیم توسط آن‌ها تحت تأثیر متغیرهای فیزیکی و شیمیایی گوناگونی نظیر pH، دما، طول دوره انکوباسیون، شرایط تهویه، نوع و مقدار کانی است.

ترکیب سطوح مختلف عوامل مؤثر بر رشد و فعالیت باکتری‌ها از روش‌های معمول برای تشخیص شرایط مناسب رهاسازی پتاسیم توسط آن‌ها است در روش‌های معمول برای بررسی اثر عوامل مختلف بر شرایط رشد و قابلیت انحلال و آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌ها یک عامل تغییر داده شده و عوامل دیگر ثابت نگه‌داشته می‌شوند که این امر علاوه بر زمان‌بر بودن، پرهزینه نیز بوده و از سوی دیگر تضمینی برای تشخیص شرایط کاملاً بهینه برای فعالیت متابولیکی باکتری ارائه نمی‌دهد (Padmavathi, 2015). در این ارتباط روش‌های آماری نظیر طرح پلاکت - برمن و روش پاسخ سطح، می‌توانند ابزارهای مفیدی برای مدل‌سازی کمی اثر توأم تعدادی متغیر برای رهاسازی پتاسیم توسط باکتری‌ها به‌منظور نیل به حداکثر کارایی این میکروارگانیسم‌ها در انجام فعالیت‌های زیستی محسوب شوند (Rajendran *et al.*, 2007; Swetha *et al.*, 2014). روش پاسخ سطح (Response Surface Methodology) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است و در بهینه‌سازی فرآیندهایی بکار می‌رود که پاسخ موردنظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون چندجمله‌ای درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها قابل برآورد هستند (Myers *et al.*, 2016). روش پاسخ سطح با استفاده از طرح‌های مختلف مانند باکس-بنکن (Box-Behnken) و یا طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design) انجام‌پذیر است. در سال‌های اخیر این روش‌ها به‌عنوان ابزارهایی توانمند در پژوهش‌های مربوط به مدل‌سازی و بهینه‌سازی فرآیند در علوم مهندسی و بیولوژی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Mousavi *et al.*, 2013). هدف از انجام این پژوهش مدل‌سازی کمی اثر توأم متغیرهایی مانند pH، مقدار کانی فلدسپار و نیز طول دوره انکوباسیون بر میزان آزادسازی پتاسیم از کانی فلدسپار توسط باکتری *Bacillus sp.* است و طی آن تلاش شده تا با استفاده از روش پاسخ سطح و بر مبنای طرح مرکب مرکزی یک مدل کمی همراه با تحلیل حساسیت پارامترهای آن، برای آزاد شدن پتاسیم از کانی فلدسپار ارائه شود.

فلدسپارها عموماً در بخش سیلت و شن خاک‌های جوان و یا خاک‌هایی با تکامل متوسط وجود دارند (Sparks and Huang, 1985). این در حالی است که فلدسپارهای قلیایی در خاک‌هایی با هوادیدگی متوسط حتی در بخش رس نیز وجود دارند. نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که علاوه بر کانی‌های موجود در بخش رس، میکا و فلدسپارهای موجود در بخش شن و سیلت نیز نقش مهمی در رهاسازی پتاسیم دارند. فلدسپارها ساختمان بلوری سه‌بعدی (Tectosilicate) دارند که از اتصال به‌وسیله مشارکت اکسیژن Al_2O_3 و SiO_4 موجود در گوشه لایه-ها به وجود می‌آیند. در ساختمان فلدسپارها یک اتم سیلیس با آلومینیوم جایگزین شده و بار حاصله توسط کلسیم، پتاسیم و یا سدیم خنثی می‌شود (Barth, 1969). رهاسازی پتاسیم از میکاها می‌تواند توسط دو فرآیند، انحلال ساختار بلور و یا تبادل پتاسیم بین لایه‌ای با کاتیون آبپوشیده انجام شود چراکه پتاسیم در میکاها توسط نیروهای الکترواستاتیک نگه‌داری می‌شود، در صورتی که در فلدسپارهای پتاسیم‌دار، پتاسیم به‌وسیله پیوند کووالانسی درون کریستال قرار گرفته و رهاسازی آن از کانی توسط عوامل مختلفی نظیر خصوصیات ساختمانی، ترکیب شیمیایی، اندازه ذرات و خروج فرآورده‌های هوادیدگی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Mousavi *et al.*, 2015; Malakouti *et al.*, 2006; Øgaard and Krogstad, 2005).

در این بین، میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی در چرخه طبیعی پتاسیم ایفا می‌کنند. برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گل‌سنگ‌ها قادرند سیلیکات‌ها را تجزیه و عناصری نظیر پتاسیم، آهن، روی، سیلیس و فسفر را آزاد نمایند که در این میان باکتری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Aleksandrov *et al.*, 1967; Barker *et al.*, 1998). در ارتباط با نقش باکتری‌ها در رهاسازی پتاسیم از طریق تخریب کانی‌های سیلیکاته، پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است (Chen and Chen, 1960; Avakyan, 1985). انحلال کانی‌های پتاسیمی توسط باکتری‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی و معدنی صورت می‌گیرد (Ullman *et al.*, 1996). اسیدهای آلی تأثیر خود در آزادسازی پتاسیم را از طریق تشکیل کمپلکس و تولید H^+ اعمال می‌نمایند. نوع اسید آلی، خواص شیمیایی، پیوند بین اتم‌های موجود در کانی و ساختمان بلوری از جمله عواملی هستند که در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های تحت تأثیر اسیدهای آلی مؤثرند (Vandevivere *et al.*, 1994). تولید دی‌اکسیدکربن در حین فعالیت حیاتی میکروارگانیسم‌ها و نیز تولید اگزو پلی‌ساکاریدها

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های حل کننده سیلیکات:

تعداد ۴۰ نمونه خاک از ریزوسفر گیاه سیب زمینی از مزارع استان آذربایجان غربی تهیه و مجموع ۱۶ سویه باکتریایی خالص سازی شد. برای غربالگری و انتخاب سویه های برتر باکتری های حل کننده سیلیکات، محیط کشت الکساندروف جامد (بررسی کیفی) و مایع (بررسی کمی) استفاده گردید (Hu et al., 2006). در مرحله نخست به منظور ارزیابی توانایی کیفی سویه ها در انحلال پتاسیم غیرتبادلی سویه های جداسازی شده در محیط کشت الکساندروف جامد کشت شده و به مدت ۱۰ روز در دمای 28 ± 1 درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. در پایان دوره انکوباسیون، در سویه هایی که هاله شفاف تشکیل داده بودند قطر کلنی های رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال پتاسیم اندازه گیری شده و شاخص انحلال (Solubility index) برای سویه ها با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید (Ebrahimi Karim-Abad and Rasouli-Sadaghiani, 2014) (شکل ۱).

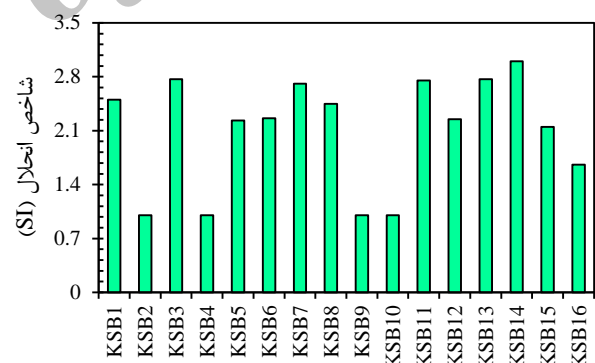
(شکل ۱).

تهیه مایه تلقیح و اندازه گیری پتاسیم:

باکتری *Bacillus sp.* پس از جداسازی در محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) کشت شد. پس از رشد، به منظور آماده سازی مایه تلقیح، ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث (Nutrient Broth) تهیه و باکتری در این محیط تلقیح گردید. پس از ۲۴ ساعت شیک نمودن، ۱ میلی لیتر از مایه تلقیح (با جمعیت برابر $10^8 \times 6/4$ سلول باکتری در یک میلی لیتر محلول در جذب نور با طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ارلن های حاوی محیط کشت الکساندروف افزوده شد. سپس ارلن ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه در دور 60 rpm شیک گردیدند. در زمان های مختلف تعیین شده محتویات ارلن ها پس از سانتریفیوژ با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ۴۱) صاف شده و در عصاره های به دست آمده مقدار پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر قرائت گردید (Champan and Pratt, 1987).

مدل سازی انحلال پتاسیم

به منظور مدل سازی و نیز ارزیابی تأثیر متغیرهای مؤثر بر میزان آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Bacillus sp.* از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. طراحی آزمایش ها با ترکیب مقادیر مختلف هر یک از متغیرهای مستقل با استفاده از روش پاسخ سطح و بر مبنای طرح مرکب مرکزی انجام شد. دامنه ی متغیرهای موردنظر شامل pH، طول دوره انکوباسیون و همچنین مقدار کانی بر اساس مقادیر واقعی و همچنین مقادیر کد شده (+۱)،



شکل ۱- مقادیر شاخص انحلال سویه های باکتریایی حل کننده کانی پتاسیمی (روز دهم)

(رابطه ۱)

(قطر کلونی) ÷ (قطر کلونی + قطر هاله) = شاخص انحلال (SI)
 در مرحله دوم غربالگری جهت برآورد کمی توانایی سویه ها، تمامی سویه هایی که توانایی انحلال بالایی در محیط جامد نشان داده بودند (شاخص انحلال $2/5 \leq$) انتخاب شده و در محیط های کشت مایع حاوی کانی پتاسیم دار (۲ گرم در لیتر فلدسپار پتاسیمی با قطر کمتر از ۶۰ میکرون)، تلقیح گردیدند. سپس در زمان های ۱، ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ روز، ۱۰ میلی لیتر از ارلن های حاوی محیط کشت، برداشت شده و میزان پتاسیم آزاد شده در آن ها توسط دستگاه فلیم فتومتر اندازه گیری گردید (جدول ۱). از بین سویه های مختلف، سویه ای که هاله شفاف بزرگتری داشته و از شاخص انحلال بالا و نیز میزان پتاسیم

جدول ۳- ماتریس مقادیر متغیرهای واقعی و کد شده^{*} در مدل سازی با روش طرح مرکب مرکزی

شماره آزمایش	pH	زمان	مقدار کانی	پتاسیم محلول (mgL ⁻¹)
۱	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۱۲/۰۸
۲	(۸/۱۹)	(۴/۲۴)	(۵/۷۸)	۱۲/۲۱
۳	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۹/۵۸
۴	(۷/۰۰)	(۱/۰۰)	(۴/۰۰)	۹/۷۸
۵	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۱۰/۸۳
۶	(۷/۰۰)	(۱۷/۰۰)	(۴/۰۰)	۲۵/۱۵
۷	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۹/۵۸
۸	(۸/۱۹)	(۱۳/۷۶)	(۵/۷۸)	۱۰/۹۵
۹	(۹/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۷/۰۸
۱۰	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۱۰/۸۳
۱۱	(۸/۱۹)	(۴/۱۴)	(۲/۲۱)	۶/۳۲
۱۲	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۱/۰۰)	۱/۴۱
۱۳	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۹/۵۸
۱۴	(۵/۸۱)	(۴/۲۴)	(۲/۲۱)	۱۱/۳۴
۱۵	(۸/۱۹)	(۱۳/۷۶)	(۲/۲۱)	۷/۱۸
۱۶	(۵/۸۱)	(۴/۲۴)	(۵/۷۸)	۲۳/۸۷
۱۷	(۵/۸۱)	(۱۳/۷۶)	(۵/۷۸)	۲۳/۵۲
۱۸	(۵/۸۱)	(۱۳/۷۶)	(۲/۲۱)	۱۲/۲۱
۱۹	(۵/۰۰)	(۹/۰۰)	(۴/۰۰)	۱۸/۳۳
۲۰	(۷/۰۰)	(۹/۰۰)	(۷/۰۰)	۱۵/۸۳

* مقادیر واقعی هر متغیر در داخل پارانتر (زمان و مقدار کانی به ترتیب برحسب روز و گرم بر لیتر) و مقادیر کدشده آن‌ها بیرون از پارانتر ارائه شده‌اند.

+α، ۰، -α، -۱) در جدول (۲) ارائه شده است. کدبندی مقادیر واقعی متغیرها با استفاده از معادله‌ی (۲) انجام شد.

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در این رابطه X_i ، x_i و x_0 به ترتیب نشان‌دهنده‌ی مقدار کدشده‌ی متغیر، مقدار واقعی هر متغیر و میانگین دامنه‌ی هر متغیر است. Δx نیز مقدار تغییر گام (Step Change) هر پارامتر است. بر اساس جدول (۲) مقدار x_0 برای متغیرهای pH، زمان انکوباسیون و مقدار کانی به ترتیب برابر با ۷، ۹ و ۴ گرم بر لیتر بود. مقدار Δx نیز برای این متغیرها به ترتیب برابر با ۲، ۸ و ۳ در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تجزیه و تحلیل‌های مربوط به طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 14 انجام شد.

جدول ۲- دامنه مقادیر آزمایشی متغیرهای مورد استفاده در مدل سازی

متغیر مستقل	برگ خرید					دامنه و مقادیر
	-۱	-α	۰	+α	+۱	
pH	۵	۵/۸۱	۷	۸/۱۹	۹	X_1
زمان (day)	۱	۴/۲۴	۹	۱۳/۷۶	۱۷	X_2
کانی (gl ⁻¹)	۱	۲/۲۱	۴	۵/۷۸	۷	X_3

در روش پاسخ سطح از یک تابع چندجمله‌ای درجه دوم (معادله‌ی ۳) که شامل ترکیب خطی، درجه دوم و همچنین برهمکنش بین متغیرها بر اساس مقادیر کد شده است، برای پیش‌بینی متغیر وابسته استفاده می‌شود. (رابطه ۳)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{0i} X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad i \neq j$$

در این معادله، Y متغیر پاسخ (مقدار پتاسیم محلول)، X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده، k تعداد متغیرهای مستقل، ε باقیمانده‌های مدل (اختلاف بین مقادیر مشاهده‌ای و برآورد شده مدل) و $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ نیز به ترتیب نشان‌دهنده‌ی اثر عرض از مبدأ (ضریب ثابت)، اثر توابع خطی، درجه دو و برهمکنش بین متغیرها است.

نتایج و بحث

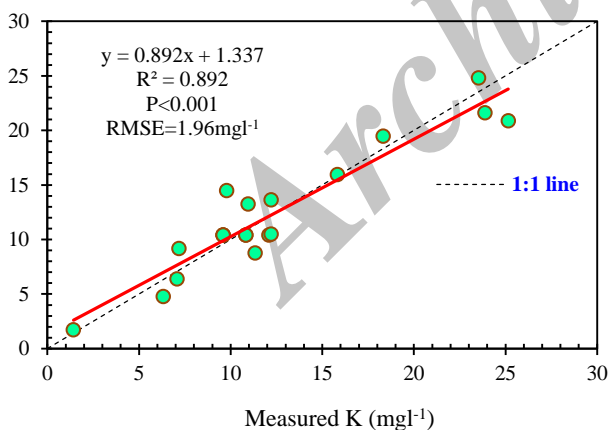
ترکیب آزمایش‌های موردنیاز بر مبنای طرح مرکب مرکزی با سه متغیر pH، زمان انکوباسیون و مقدار کانی در جدول (۳) ارائه شده است. در این جدول مقدار پتاسیم محلول اندازه‌گیری شده برای هر آزمایش نیز ارائه شده است.

کانی ($P < 0.001$) بر مقدار انحلال پتاسیم معنی‌دار است. در بخش درجه‌ی دوم معادله نیز اثر زمان بر مقدار انحلال پتاسیم معنی‌دار است ($P < 0.001$). نتایج جدول (۴) نشان‌دهنده‌ی این است که برهمکنش متغیرهای موردبررسی بر میزان انحلال پتاسیم از کانی فلدسپار معنی‌دار نیست. هر چند در بین متغیرهای موردبررسی برهمکنش بین pH و مقدار کانی دارای مقدار P value کمتری ($P = 0.102$) نسبت به اثر متقابل سایر پارامترها است که نشان‌دهنده‌ی برهمکنش نسبتاً زیاد ولی غیرمعنی‌دار این دو متغیر است.

بر مبنای طرح مرکب مرکزی و بر اساس ورودی‌های جدول (۳) برای متغیرهای مستقل (شامل pH، زمان انکوباسیون و مقدار کانی) و متغیر پاسخ (مقدار پتاسیم محلول) جدول (۴) برای ضرایب هر یک از پارامترهای خطی، درجه دوم و برهمکنش متغیرها به دست آمد. در این جدول ضرایب هر یک از بخش‌های معادله‌ی چندجمله‌ای به همراه سطح معنی‌داری آن‌ها بر اساس آماره P ارائه شده است. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، اثر خطی همگی متغیرهای مستقل شامل pH ($P < 0.001$)، زمان انکوباسیون ($P < 0.05$) و مقدار

جدول ۴- ضرایب تابع چند جمله‌ی طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی غلظت پتاسیم

بخش مدل	پارامترهای مدل	ضریب	آماره T	آماره P
ثابت مدل	Constant	۱۰/۴۰۵۲	۹/۱۶۸	۰/۰۰۰
خطی	pH	-۳/۸۹۵۴	-۵/۱۷۳	۰/۰۰۰
	Time	۱/۹۰۲	۲/۵۲۶	۰/۰۳۰
	Mineral	۴/۲۲۸۹	۵/۶۱۶	۰/۰۰۰
درجه‌ی دو	pH × pH	۰/۸۸۷۷	۱/۲۱۱	۰/۲۵۴۰
	Time × Time	۲/۵۷۱۳	۳/۵۰۸	۰/۰۰۶۰
	Mineral × Mineral	-۰/۵۵۶۱	-۰/۷۵۹	۰/۴۶۶۰
	pH × Time	-۰/۱۱۵۶	-۰/۱۱۷	۰/۹۰۹۰
برهمکنش	pH × Mineral	-۰/۷۷۴۱	-۱/۸۰۳	۰/۱۰۲۰
	Time × Mineral	-۰/۴۱۶۶	-۰/۴۲۳	۰/۶۸۱۰
		$R^2_{adj} = 79.5\%$	$R^2 = 89.2\%$	



شکل ۲- مقایسه غلظت پتاسیم محلول مشاهده‌ای و پیش‌بینی شده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی

جدول (۵) نتایج مربوط به تجزیه واریانس بخش‌های خطی، درجه دوم و برهمکنش تابع چندجمله‌ای طرح مرکب مرکزی را به صورت کلی و تفکیک‌شده نشان می‌دهد. نتایج تجزیه واریانس مربوط به مدل طرح مرکب مرکزی حاکی از اثر معنی‌دار بخش خطی ($P < 0.001$) و درجه‌دو ($P < 0.05$) بر میزان انحلال پتاسیم بود.

بر اساس نتایج جدول (۴) و با توجه به سطح معنی‌داری عوامل مؤثر بر انحلال پتاسیم معادله‌ی (۴) با ضریب تبیین 0.892 ($P < 0.001$) برای پیش‌بینی میزان پتاسیم محلول بر اساس مقدار کد شده‌ی متغیرهای مستقل قابل ارائه خواهد بود. (رابطه ۴)

$$\text{Potassium (mg l}^{-1}\text{)} = 10.4052 - 3.8954X_1 + 1.902X_2 + 4.2289X_3 + 2.5713X_2^2$$

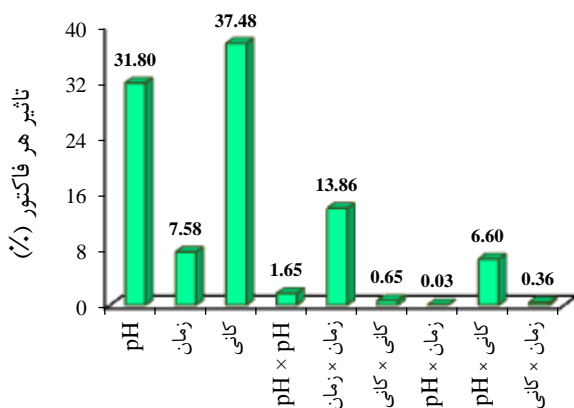
$$R^2 = 89.2\% \quad R^2_{adj} = 75.5\%$$

معادله‌ی ۳ به‌روشنی نشان می‌دهد که pH (X_1) اثر منفی و معنی‌دار بر مقدار انحلال پتاسیم دارد. درحالی‌که زمان (X_2) و مقادیر غلظت کانی فلدسپار (X_3) تأثیر مثبت و افزایش‌دهنده‌ی بر آزادسازی پتاسیم داشتند. به‌منظور ارزیابی کارایی مدل حاصل از طرح مرکب مرکزی، در شکل (۲) مقادیر اندازه‌گیری شده پتاسیم محلول از آزمایش‌ها و مقدار برآورد شده‌ی آن از معادله-ی (۳) در مقابل یکدیگر ترسیم شده‌اند. همان‌گونه که در این شکل مشاهده می‌شود، مدل طرح مرکب مرکزی توانایی بسیار مطلوبی در پیش‌بینی پتاسیم محلول داشته و ۸۹/۲ درصد از تغییرات پتاسیم محلول اندازه‌گیری شده توسط مدل طرح مرکب مرکزی قابل تبیین است.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس مدل طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی

پتاسیم محلول				
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره T	آماره P
مدل	۹	۷۱/۰۷	۹/۱۸	۰/۰۰۱۰
خطی	۳	۱۶۶/۹۵	۲۱/۵۶	۰/۰۰۰۰
درجه دو	۳	۳۷/۳۸	۴/۸۳	۰/۰۲۵۰
برهمکنش	۳	۸/۸۹	۱/۱۵	۰/۳۷۷۰

متغیر سوم در مقدار متوسط خود ثابت نگه‌داشته شده است. برای نمونه شکل (۴-الف) نشان‌دهنده‌ی اثر ترکیبی pH و مقدار کانی بر مقدار پتاسیم محلول تحت زمان انکوباسیون معادل با ۹ روز (کد مساوی صفر) است. همان‌گونه که در شکل (۴) مشاهده می‌شود کاهش pH و افزایش مقدار کانی منجر به افزایش میزان انحلال پتاسیم از کانی فلدسپار شده است (شکل ۴-الف). در زمان‌های اولیه انکوباسیون مقادیر قابل‌توجهی از پتاسیم آزادشده اما با گذشت زمان از غلظت پتاسیم کاسته شد و درنهایت مجدداً با گذشت زمان مقدار انحلال پتاسیم همچنان روند افزایشی داشته است (شکل ۴-ب).



شکل ۳- نتایج تحلیل پارتو برای مقایسه اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی بر غلظت پتاسیم

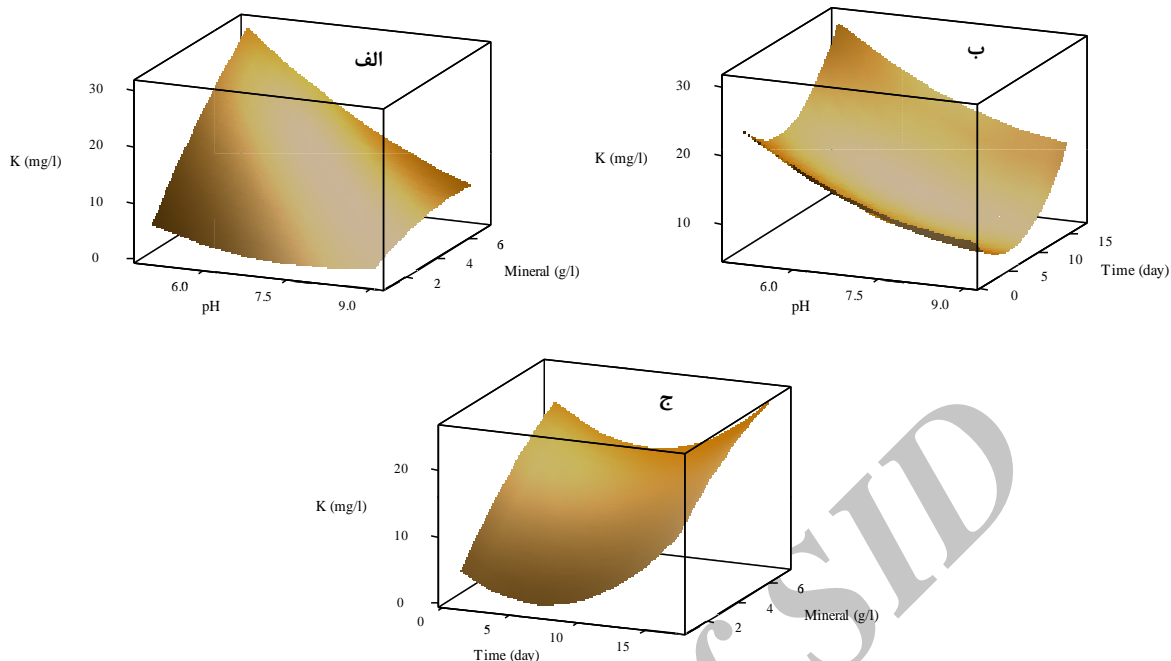
درحالی‌که انتظار می‌رود با گذشت زمان و افزایش دوره انکوباسیون، میزان پتاسیم رهاسده از کانی به تدریج افزایش یابد تا یکنواختی حاصل شود، غلظت پتاسیم در زمان‌های اولیه (یک تا دو روز) در مقایسه زمان‌های میانی مانند ۵ روز بیشتر است. وجود این تناقض را می‌توان به جذب و یا تثبیت دوباره پتاسیم رهاسده از کانی در زمان‌های کوتاه‌مدت نسبت داد (Norouzi et al., 2012). البته افزایش رشد و جمعیت باکتری‌ها با گذشت زمان نیز باعث می‌گردد بخشی از پتاسیم آزادشده از کانی توسط باکتری جذب‌شده و غلظت پتاسیم در زمان‌های میانی کاهش یابد. رهاسازی با سرعت اولیه بالا نیز می‌تواند ناشی از آزاد شدن پتاسیم از مناطق لبه‌ای و گوه‌ای شکل کانی باشد (Goulding, 1984). با پیشروی رهاسازی و افزایش انرژی جذب پتاسیم در بین لایه‌ها و از طرفی افزایش فاصله پتاسیم از لبه‌ی کانی‌ها و افزایش فاصله پخشیدگی، سرعت رهاسازی کاهش می‌یابد (Mousavi et al., 2015). بعلاوه با گذشت زمان به دلیل تخلیه منبع کربن و انرژی و همچنین تجمع مواد متابولیکی سمی در محیط کشت، رشد میکروپها متوقف شده و به‌این‌ترتیب از میزان رهاسازی پتاسیم کاسته می‌شود (Lian et al., 2008).

بر این اساس و به‌منظور تحلیل حساسیت مدل طرح مرکب مرکزی برای تشخیص درصد تأثیر هر یک از ورودی‌های مدل بر تغییرات پتاسیم محلول از شاخص تحلیل حساسیت پارتو (Pareto analysis) که با معادله (۵) محاسبه می‌شود استفاده شد (Amanpour et al., 2013).

$$P_i = \left[\frac{\beta_i^2}{\sum \beta_i^2} \right] \times 100 \quad i \neq 0 \quad (\text{رابطه ۵})$$

در این رابطه؛ P_i درصد اثر هر یک از متغیرهای طرح مرکب مرکزی و β_i نیز ضرایب معادله چندجمله‌ای درجه دو (جدول ۴) است. درصد اثر هر یک از پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی براساس تحلیل حساسیت پارتو در شکل (۳) نشان داده شده است. از بین متغیرهای مستقل بررسی‌شده به ترتیب مقدار کانی، pH، توان دوم زمان و زمان بیشترین تأثیر را بر مقدار پتاسیم محلول دارند (شکل ۳). به‌طوری‌که درصد اثر این چهار متغیر به ترتیب برابر با ۳۱/۳۷، ۸۰/۴۸ و ۱۳/۸۶ و ۷/۵۸ بوده و مجموع درصد اثرات این متغیرها نیز برابر با ۹۰/۷۲ درصد است. اسیدهای آلی ناشی از فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها منجر به کاهش pH محیط کشت‌شده و از طریق افزایش اسیدیته کل، ظرفیت آزادسازی کاتیون‌هایی نظیر پتاسیم را افزایش می‌دهند (Badr et al., 2006; Sheng and He, 2006). Bevan and Savage (1989) بیان نمودند که افزایش غلظت H^+ (کاهش pH) و کمپلکس نمودن ترجیحی آلومینیوم در حضور اسیدهای آلی و در محدوده pH ۴ تا ۹ تنها دلیل افزایش انحلال پتاسیم نبوده و بالا بودن انحلال کلی پتاسیم در pHهای خنثی نیز در فرآیند انحلال پتاسیم نقش دارد.

اثر ترکیبی دو متغیر مانند pH و زمان انکوباسیون بر میزان انحلال پتاسیم را می‌توان با ثابت نگه‌داشتن متغیر سوم (برای مثال مقدار کانی) در یک سطح دلخواه با استفاده از منحنی‌های ۳ بعدی و طرح‌های کنتور نشان داد. نمودار سه‌بعدی تغییرات غلظت پتاسیم آزادشده برای pH، زمان و کانی به‌صورت دو به دو و بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی در شکل (۴) ارائه شده است در این شکل در هنگام بررسی اثر دو متغیر،



شکل ۴- نمایش سه بعدی تغییرات مقدار پتاسیم در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی

برون سولی و تغییر و تبدیلات آنزیمی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌ها دخیل باشند. برای مثال در مطالعه رهاسازی پتاسیم از فلدسپار و ایلاتیت توسط باکتری‌های حل کننده سیلیکات، Lian *et al.* (2002) یک مدل چندمرحله‌ای پیشنهاد دادند که در مرحله اول کمپلکس باکتری-کانی به کمک پلی ساکاریدهای برون سلولی تشکیل می‌شود در ادامه انحلال کانی و رهاسازی پتاسیم در محیط میکرو (Microenvironment) با pH پایین و حاوی لیگاندهای آلی صورت می‌گیرد. تشکیل کمپلکس باکتری-کانی ممکن است با تسهیل اتصال سلول‌های میکروبی و کریستال‌های کانی منجر به افزایش گستره و زمان واکنش شود. با توجه به اینکه pH بهینه برای اغلب باکتری‌ها در دامنه ۵ تا ۷ است لذا با افزایش pH به بیشتر از آستانه تحمل میکروارگانیسم، میزان فعالیت آن‌ها کاهش یافته و متعاقب از مقدار رهاسازی پتاسیم کاسته می‌شود (Dix and Webster, 1995).

نتیجه‌گیری

تأمین پتاسیم موردنیاز گیاهان از کانی‌ها حاوی پتاسیم موجود در خاک از دیدگاه افزایش باروری خاک و کاهش هزینه‌های مربوط به استفاده از کودهای شیمیایی حائز اهمیت می‌باشد. از این رو شناخت و مدل سازی کمی عوامل مؤثر بر انحلال پتاسیم از کانی‌های حاوی آن، دارای اهمیت فراوانی است. در این پژوهش اثر متغیرهایی مانند pH، زمان انکوباسیون و مقدار کانی

پژوهش‌های متعدد نشان‌دهنده‌ی این واقعیت هستند که باکتری‌ها و قارچ‌ها با تجزیه کانی‌های حاوی پتاسیم، فسفر و آهن نظیر میکا و فلدسپار، منجر به آزادسازی این عناصر می‌شوند (Štyriaková *et al.*, 2003). تجزیه کانی‌ها در اثر کاهش pH محیط کشت مانند آنچه که در نتایج این تحقیق مشاهده شد می‌تواند به دلیل تولید اسیدهای آلی و یا تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی (به واسطه اسیدهای آلی و سیدروفور تولیدشده) باشد.

علاوه بر این پلی ساکاریدهای تولیدشده توسط باکتری‌ها به طور غیرمستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارند. پلی ساکاریدها اسیدهای آلی و سیدروفورها را به شدت جذب کرده و منجر به تشکیل غلظت بالایی از اسیدهای آلی یا سیدروفورها در نزدیکی سطح کانی شده و با اکسید سیلیسیم موجود در سطح کانی کمپلکس ایجاد می‌نمایند، به این ترتیب عناصر از سطح کانی آزاد شده و وارد محیط کشت محلول می‌شوند. از سوی دیگر پلی ساکاریدهای موجود در محیط کشت با جذب سیلیسیم باعث به هم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع می‌شوند و از این طریق منجر به آزاد شدن عناصری مثل پتاسیم و آهن می‌گردد (Liu *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2008). نتایج پژوهش Bin (1998) نشان داد که میزان پتاسیم آزادشده از فلدسپار و ایلاتیت در اثر تلقیح باکتری در محیط کشت به ترتیب ۸ و ۱۶ درصد افزایش یافت. احتمال داده می‌شود واکنش‌هایی نظیر تولید اسید، تشکیل کمپلکس توسط پلی ساکاریدهای

استفاده از شاخص پارتو بیانگر اهمیت بیشتر مقدار کانی و pH محیط بر انحلال پتاسیم از کانی فلدسپار بود. به طور کلی کاهش pH محیط و افزایش مقدار کانی سبب افزایش پتاسیم محلول در محیط شد. در رابطه با اثر زمان آنکوباسیون نیز نتایج نشان داد که هرچند در زمان‌های میانی از میزان پتاسیم محلول کاسته می‌شود اما با گذشت زمان بیشتر و در زمان‌های بیش از ۱۰ روز مجدداً مقدار پتاسیم محلول افزایش می‌یابد. در این پژوهش حداکثر مقدار پتاسیم محلول در pH=۵ و زمان برابر با ۱۷ روز و سطح کانی معادل با ۷ گرم در لیتر مشاهده شد.

بر رهاسازی پتاسیم از کانی فلدسپار توسط *Bacillus sp.* استفاده از روش پاسخ سطح و بر مبنای طرح مرکب مرکزی به صورت کمی مدل‌سازی شد. نتایج نشان داد که مدل‌سازی اثر توأم متغیرهای pH، زمان آنکوباسیون و مقدار کانی بر اساس تعدادی آزمایش محدود با استفاده از طرح مرکب مرکزی موفقیت‌آمیز بوده و مدل توسعه داده شده با دقت قابل قبولی پتاسیم محلول برای دامنه‌ی نسبتاً وسیعی از متغیرهای مستقل را دارد. نتایج تحلیل حساسیت مدل طرح مرکب مرکزی با

REFERENCES

- Aleksandrov, V. G. Blagodyr, R. N. and Ilev, I. P. (1967). Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiol Z (Kiev)*. 29, 111-114.
- Amanpour, J. Salari, D. Niaei, A. Mousavi, S. M. and Panahi, P. N. (2013). Optimization of Cu/activated carbon catalyst in low temperature selective catalytic reduction of NO process using response surface methodology. *Journal of Environmental Science and Health. Part A*, 48(8), 879-886.
- Avakyan, Z. A. Belkanova, N. P. Karavaiko, G. I. and Piskunov, V. P. (1985). Silicon compounds in solution bacteria quartz degradation. *Microbiology*. 54(2), 250-256.
- Badr, M. A. Shafei, A. M. and Sharaf El-Deen, S. H. (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(1), 5-11.
- Barker, W. W. Welch, S. A. Chu, S. and Banfield, J. F. (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist*, 83(11), 1551-1563.
- Barth, T. W. F. (1969). *Feldspars*. New York: Wiley-Interscience.
- Bevan, J. and Savage, D. (1989). The effect of organic acids on the dissolution of K-feldspar under conditions relevant to burial diagenesis. *Mineralogical Magazine*. 53, 415-425.
- Bin, L. (1998). A study on how silicate bacteria GY92 dissolves potassium from illite. *Acta Mineralogica Sinica*. 2, 018.
- Chen, H. and Chen, T. (1960). Characteristics of morphology and physiology and ability to weather mineral bearing phosphorus and potassium of silicate bacteria. *Microorganism*. 3, 104-112.
- Dix, N. J. and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. (p. 57). Cahpman & Hall, Cambridge, UK.
- Ebrahimi Karim-Abad R. and Rasouli-Sadaghiani, M.H. (2014). Isolation of phosphate solubilizing microorganisms from wheat rhizosphere and evaluation of their solubilization potential in vitro and greenhouse conditions. MSc. dissertation, University of Urmia, Iran.
- Goulding, K.W.T. (1984). The availability of potassium in soils to crops as measured by its release to calcium saturated cation exchange resin. *Journal of Agricultural Science*. 103, 265-275.
- Groudev, S. N. (1987). Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. *Acta Biotechnologica*. 7(4), 299-306.
- 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.
- Lian, B. Fu, P. Q. Mo, D. M. and Liu, C. Q. (2002). A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica*. 22(2), 179-183.
- Lian, B. Wang, B. Pan, M. Liu, C. and Teng, H. H. (2008). Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 72(1), 87-98.
- 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(1-2), 133-140.
- Lotfi Parsa, H. Khademi, H. Ayoubi, S.H. and Hadinjad, A. (2012). Time changes of potassium release amount from feldspar in *Medica sativa L.* rhizosphere. *Soil Research Journal*. 26(1), 111-121. (In Farsi)
- Malakouti, M.J. Shahabi, A. and Bazargan, K. (2006). *Potassium in Iran agriculture*. Sana publication. Tehran. (In Farsi)
- Mengel, K. and Kirkby, E.A. (2001). *Principles of plant nutrition* (5th ed.). (p.849) Kluwer Academi. Publishers, Dordrecht.
- Mousavi, S. M. Niaei, A. Salari, D. Panahi, P. N. and Samandari, M. (2013). Modelling and optimization of Mn/activate carbon nanocatalysts for NO reduction: comparison of RSM and ANN techniques. *Environmental technology*. 34(11), 1377-1384.
- Mousavi, A. Khiamim, F. and Shariatmadari, H. (2015). The kinetics of potassium release from

- feldspar, compared with muscovite under the influence of different extractants. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 67, 229-240. (In Farsi)
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., and Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.
- Norouzi, S. Khademi, H. and Shirvani, M. (2012). The kinetics of K release from muscovite and phlogopite with organic acids. *Journal of Soil and Water Research*. 42, 163-173. (In Farsi)
- Øgaard, A. F. and T. Krogstad. (2005). Release of interlayer potassium in Norwegian grassland soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 168, 80-88.
- Padmavathi, T. (2015). Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. *Journal of soil science and plant nutrition*. 15(3), 781-793.
- Parmar, P. and Sindhu, S. S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*. 3(1), 25-31.
- Rajendran, A. Thirugnanam, M. and Thangavelu, V. (2007). Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian Journal of Biotechnology*. 6(4), 469.
- Sheng, X. F. and He, L. Y. (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(1), 66-72.
- Sparks, D. L., and Huang, P. M. (1985). Physical chemistry of soil potassium. *Potassium in agriculture*. (potassiuminagri). (pp. 201-276).
- Štyriaková, I., Štyriak, I., Nandakumar, M. P., & Mattiasson, B. (2003). Bacterial destruction of mica during bioleaching of kaolin and quartz sands by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19(6), 583-590.
- Swetha, S. Varma, A. and Padmavathi, T. (2014). Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, α -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett-Burman experimental design. *Biotechnology*. 4, 439-445.
- Syers, J. K. (2002). *Potassium in soils: current concepts*. Feed the soil to feed the people. The role of potash in sustainable agriculture, 301.
- Tisdale, S.L. Nelson, W.L. Beaton, J.D. and Havlin, J.L. (2003). *Soil Fertility and Fertilizers* (5th ed.). Prentice-Hall of India, New Delhi, India.
- Ullman, W. J. Kirchman, D. L. Welch, S. A. and Vandevivere, P. (1996). Laboratory evidence for microbioally mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology*. 132(1), 11-17.
- Vandevivere, P. Welch, S. A. Ullman, W. J. and Kirchman, D. L. (1994). Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*. 27(3), 241-251.