# بررسی اثرات متقابل منابع مختلف فسفر و پتاسیم در رفتار انحلال فسفر و پتاسیم توسط برخی از جدایه‌های باکتریایی

**شکوفه مرادی، محمدرضا ساریخانی***

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹)

**چکیده**

پتاسیم و فسفر از جمله عناصر ضروری و مهم برای رشد گیاه تلقی می‌شوند و راهکار زیستی یکی از روش‌های تأمین آن‌ها می‌باشد. برای بررسی روابط بین منابع فسفر محلول (فسفات سدیم) و نامحلول (تری‌کلسیم‌فسفات) در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا یعنی بیوتیت و موسکویت و همچنین ارزیابی اثر نوع کانی میکا در انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم‌فسفات، این تحقیق با حضور برخی از باکتری‌های متعلق به جنس *سودوموناس* به نام‌های S10-3، S14-3، S19-1 و S21-1 انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو نوع کانی میکا (بیوتیت و موسکویت) و دو منبع فسفر تری‌کلسیم-فسفات و فسفات سدیم با سه تکرار اجرا گردید. از کشت شبانه این باکتری‌ها به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت الکساندروف افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت یک هفته، میزان آزادسازی پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر و میزان انحلال فسفات با استفاده از روش زرد و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت بیش از موسکویت بود و همچنین جدایه‌ها در حضور تری‌کلسیم‌فسفات نسبت به فسفات سدیم، بین ۱۵ تا ۴۸ درصد پتاسیم بیشتری آزاد کردند. در میان جدایه‌ها، بیشترین پتاسیم آزاد شده با میانگین ۵/۴۵ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به جدایه S19-1 بود. یافته‌های آزمایش نشان داد که آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌ها از کانی بیوتیت حدود ۴/۵ برابر بیش از موسکویت بوده و بنظر می‌رسد سازوکار مشابهی در انحلال فسفر و آزادسازی پتاسیم وجود دارد، زیرا در حضور تری‌کلسیم‌فسفات مقدار بیشتری پتاسیم از کانی میکا آزاد شد. بالاترین میزان انحلال فسفات ۴۸۸ میلی‌گرم بر لیتر بود که در جدایه S19-1 به دست آمد. اثر کانی‌های بیوتیت و موسکویت بر انحلال فسفات جدایه‌ها معنی‌دار نبود و توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها متأثر از کانی‌های میکا نبود اما توان رهاسازی پتاسیم در حضور منابع محلول و نامحلول فسفر متفاوت بود.

**واژه‌های کلیدی:** بیوتیت، تری‌کلسیم‌فسفات، *سودوموناس*، موسکویت

۱-دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* پست الکترونیک: rsarikhani@yahoo.com

**مقدمه**

فسفر و پتاسیم از جمله عناصر ضروری و اصلی برای رشد و نمو گیاهان می‌باشند. غلظت فسفر و پتاسیم محلول در خاک، معمولاً خیلی کم است و بخش اعظم این عناصر در خاک به صورت سنگ‌ها، کانی‌ها و سایر رسوبات نامحلول می‌باشد (Goldstein, 1994) و این منابع عظیم تحت شرایط مناسب می‌توانند برای گیاهان محلول و قابل‌دسترس شوند (Xiufang *et al*., 2006). پتاسیم سومین عنصر ضروری برای تولید محصول بعد از فسفر و نیتروژن می‌باشد و نقش مهمی در فعال کردن آنزیم‌ها، سنتز پروتئین، فتوسنتز و افزایش کیفیت محصول دارد (Sheng *et al*., 2008). درصد چشمگیری از پتاسیم خاک، درون کانی‌ها به‌ویژه میکاها، فلدسپارها و فرآورده‌های هوادیدگی آن‌ها است. زیست‌فراهمی[1] پتاسیم به عوامل فراوانی از جمله مقدار پتاسیم در اشکال گوناگون (محلول، تبادلی و غیرتبادلی) و هوادیدگی کانی‌های پتاسیم‌دار بستگی دارد. کانی‌های میکایی بسته به کاتیون موجود در لایه هشت وجهی، به میکای دی‌اکتاهدرال (موسکویت و گلیکونیت) و میکای تری‌اکتاهدرال (بیوتیت و فلوگوپیت) تقسیم‌بندی می‌شوند (Sparks & Huang, 1985). وید و همکاران (Weed *et al*., 1969) نشان دادند که فراهمی زیستی پتاسیم در میان میکاهای گوناگون به‌صورت بیوتیت> فلوگوپیت> موسکویت می‌باشد.

شماری از ریزجانداران خاک می‌توانند پتاسیم غیرقابل استفاده را فراهم نمایند. این ریزجانداران، با ساخت اسیدهای آلی و کلات کردن عناصر، کانی‌هایی مانند میکاها (ایلایت) و اورتوکلازها را هوادیده می‌کنند و باعث رهاشدن پتاسیم می‌شوند (Solaymanzade *et al*., 2015). بطورکلی ریزجانداران، چندسازوکار برای هوادیدگی کانی‌ها دارند که آزاد کردن اسیدهای آلی و لیگاندهای دیگر و اکسید یا احیا کردن عناصر کانی‌ها از آن جمله می‌باشند (Dong, 2010). بدر و همکاران (Badr *et al*., 2006) انحلال کانی‌های دارای فسفر و پتاسیم را با باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات‌های معدنی در دو شرایط آزمایش گلدانی و محیط کشت خالص (آزمایشگاه) بررسی و گزارش کردند که در محیط کشت خالص، رهاسازی پتاسیم و فسفر در تیمارهای مایه‌زنی شده با سویه‌های باکتری در برابر تیمارهای بدون مایه‌زنی افزایش یافت. پارمر و سیندو (Parmar & Sindhu, 2013) آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های ریزوسفری را در حضور قندهای مختلف به عنوان منبع کربن بررسی کردند. تلقیح ۲۰ سویه باکتری باعث آزادسازی مقدار چشمگیری پتاسیم از میکا شد. مقدار پتاسیم آزاد شده توسط سویه‌های گوناگون باکتری از ۱۵ تا ۴۹ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود.

فسفر یکی از اجزاء ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای زیستی می‌باشد. فرآیندهای اصلی بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز و تنفس به وسیله فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شوند (Raghothama & Karthikeyan, 2005). فسفر، تثبیت نیتروژن را در گیاهان لگوم تحریک کرده و برای تولید قندها ضروری می‌باشد. ریزجانداران حل‌کننده فسفات اگرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند ولی بخشی از آن که در محیط آزاد می‌شود در اختیار گیاهان قرار می‌گیرد (Alam *et al*., 2002). گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم‌فسفات، دی‌کلسیم‌فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات را عنوان کردند. در بین باکتری‌هایی با این قابلیت، جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Rhizobium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Achromobacter* و *Flavobacterium* مشاهده می‌شوند (Sarikhani *et al*., 2015). اطلاعات نشان می‌دهد که جنس‌های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *ریزوبیوم* قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات هستند و تری‌کلسیم‌فسفات و هیدروکسی‌آپاتیت در مقایسه با سنگ فسفات انحلال‌پذیرتر می‌باشند (Rodriguez & Fraga, 1999).

ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم و فسفر در خاک و ریزوسفر گیاهان نقش مهمی در چرخه طبیعی فسفر و پتاسیم ایفا می‌کنند (Diep & Hieu, 2013). زیو فانگ و همکاران (Xiufang *et al*., 2006) توانایی انحلال فسفر و پتاسیم نامحلول را توسط برخی باکتری‌های ریزوسفری بررسی کردند. آن‌ها از کانی‌های فسفر و پتاسیم به عنوان تنها منبع فسفر و پتاسیم برای آزمایش توانایی انحلال جدایه‌ها در محیط کشت الکساندروف استفاده کردند. دیپ و هیو (Diep & Hieu, 2013) توانایی انحلال فسفر و پتاسیم توسط ۲۵ گونه باکتریایی را بررسی کردند. آنها آپاتیت را

1 -Bioavailability

به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع الکساندروف افزودند و به مدت ۱۰ روز انکوبه کردند و انحلال فسفر و رهاسازی پتاسیم پس از این مدت بررسی شد. در نهایت گونه *Bacillus cereus*TC1A را به عنوان یک گونه مؤثر در انحلال فسفر و پتاسیم و دارای پتانسیل به کارگیری به عنوان کود زیستی معرفی کردند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات متقابل منابع مورد استفاده از جمله تأثیر منابع مختلف فسفر (فسفات سدیم محلول و تری‌کلسیم‌فسفات نامحلول) بر آزادسازی پتاسیم و همچنین تأثیر منابع مختلف پتاسیم (کانی‌های میکایی بیوتیت و موسکویت) بر انحلال فسفات انجام گرفت. در این پژوهش توانایی انحلال فسفات و همچنین رهاسازی پتاسیم چهار جدایه باکتریایی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش چهار جدایه باکتریایی S10-3، S14-3، S19-1 و S21-1 متعلق به جنس *Pseudomonas* تهیه شده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، مورد استفاده قرار گرفت. کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB[۲] صورت گرفت و از آن برای تلقیح در محیط الکساندروف (Hu *et al*., 2006) استفاده شد (جدول۱). این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل باکتری (چهار جدایه و یک تیمار شاهد بدون تلقیح)، منبع فسفات (تری‌کلسیم‌فسفات و فسفات سدیم) و کانی میکا (بیوتیت و موسکویت) در سه تکرار انجام شد. میکای مورد استفاده برای این آزمایش ابتدا با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار اسیدشویی شده و پس از دوبار شستشو با آب مقطر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس درون آون خشک شد. بعد از همگن نمودن کانی، به مقدار مساوی (۲g $l^{-1}$) در ارلن‌های حاوی محیط کشت الکساندروف توزیع شد. از کشت شبانه باکتری به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ( با دانسیته نوری برابر ۰/۸)، در هر ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت الکساندروف تلقیح شد و به مدت یک هفته در شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از طی انکوباسیون، محتویات ارلن‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. محلول زلال رویی جدا شده و به لوله‌های تمیز انتقال داده شدند. برای اندازه‌گیری میزان فسفر حل شده در بخش روشناور محیط کشت نیز از روش زرد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد (Olsen & Sommers, 1982). بدین صورت که دو میلی‌لیتر از معرف زرد (معرف نیتروونادو مولیبدات) و شش میلی‌لیتر آب مقطر به هر لوله حاوی دو میلی‌لیتر محلول روشناور افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ 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 $KH_2PO_4$ محاسبه گردید. میزان پتاسیم آزاد شده در محیط الکساندروف توسط جدایه‌های باکتریایی با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر تعیین شد (Jones, 2001). در پایان میزان آزادکنندگی پتاسیم جدایه‌ها از طریق مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده توسط KCl محاسبه شد.

**جدول ۱- ترکیبات محیط کشت الکساندروف**

Table 1- Components of Aleksandrov medium

| اجزای محیط کشت<br>Components of medium | الکساندروف Aleksandrov<br>مقدار مورد نیاز (گرم بر لیتر)<br>Needed amount (g $l^{-1}$) |
|---|---|
| گلوکز Glucose | 5 |
| تری‌کلسیم‌فسفات<br>tri - calcium phosphate | 2 |
| میکا (بیوتیت یا موسکویت) mica | 2 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.5 |
| $FeCl_3$ | 0.005 |
| $CaCl_2$ | 0.1 |

1-Nutrient broth

**نتایج و بحث**

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر باکتری در آزادسازی پتاسیم و فسفر به ترتیب در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار شد. اثر منبع فسفر نیز در آزادسازی پتاسیم و در انحلال فسفر در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار نشان داد. منبع پتاسیم تنها در آزادسازی پتاسیم در سطح احتمال ۱٪ اثر معنی‌داری داشت و انحلال فسفر متأثر از منبع پتاسیم نبود. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود چهار جدایه مورد آزمایش از نظر آزادسازی پتاسیم با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند و میزان آزادسازی پتاسیم جدایه‌های S19-1 و S21-1 بیشتر از دو جدایه دیگر بود. میزان آزادسازی پتاسیم توسط جدایه S19-1، ۵/۴ میلی‌گرم بر لیتر و برای جدایه S21-1، ۵/۳ میلی‌گرم بر لیتر بود که این میزان ۸۶-۸۲ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. با توجه به شکل ۲ جدایه‌های S19-1 و S21-1 میزان پتاسیم بیشتری را در حضور تری‌کلسیم‌فسفات آزاد کردند. برای چهار جدایه مورد آزمایش، آزاد سازی پتاسیم در حضور تری‌کلسیم‌فسفات بیشتر از فسفات سدیم بود که همه جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. جدایه‌های S14-3، S19-1 و S21-1 از نظر آزادسازی پتاسیم در حضور تری‌کلسیم فسفات نسبت به حضور فسفات سدیم، به ترتیب ۴۸، ۴۵ و ۴۴ درصد افزایش نشان دادند که این افزایش برای جدایه S10-3، ۱۵درصد بود (جدول۳).

در تمام جدایه‌ها آزاد سازی پتاسیم از کانی بیوتیت بسیار بیشتر از موسکویت بود (شکل۳). جدایه‌های S19-1 و S21-1 در یک گروه آماری قرار گرفتند و میزان آزادسازی پتاسیم آن‌ها از دو جدایه دیگر، حدود ۲۲-۱۳ درصد بیشتر بود. بالاترین میزان رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت متعلق به جدایه S19-1 به میزان ۹/۲۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. جدایه‌های S10-3 و S14-3 از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند اما همه جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. جدایه‌های S14-3 و S10-3 در حضور بیوتیت، حدود ۵۱-۴۴ درصد نسبت به موسکویت، پتاسیم بیشتری آزاد کردند و جدایه‌های S21-1 و S19-1 در حضور بیوتیت نسبت به موسکویت، به ترتیب ۶ و ۵/۶ برابر پتاسیم بیشتری آزاد کردند (شکل۳).

منبع فسفات سدیم یک منبع محلول بوده و به دلیل سهولت دسترسی به فسفر در این منبع، بدیهی است که جدایه‌های مورد آزمایش می‌توانند فسفر موجود در آن را به راحتی مورد استفاده قرار دهند. نتایج نشان داد که بیشترین انحلال فسفر در جدایه S19-1 به مقدار ۴۸۸ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که ۲/۸۳ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد و کمترین میزان متعلق به جدایه S21-1 بود که با ۳۵۴ میلی‌گرم بر لیتر، ۲ برابر بیشتر از شاهد بود (شکل ۴). همان‌طور که در شکل ۴ قابل مشاهده است در تمام تیمارها مقادیر بالایی از فسفر که ناشی از افزودن فسفات سدیم محلول به محیط بوده اندازه‌گیری شده است. اختلاف فسفر موجود در محیط کشت جدایه S19-1 با فسفر موجود در محیط کشت سایر جدایه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. همه جدایه ها از نظر انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. انحلال فسفر جدایه‌ها متأثر از نوع کانی میکا نبود بطوریکه در حضور کانی‌های بیوتیت و موسکویت، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

در کل میزان رهاسازی پتاسیم از منبع بیوتیت بسیار بیشتر از موسکویت بود که جدایه‌ها توانستند ۴/۵ برابر پتاسیم بیشتری را از منبع بیوتیت نسبت به موسکویت آزاد کنند. انحلال فسفات در حضور بیوتیت و موسکویت اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد اما رهاسازی پتاسیم توسط جدایه‌ها در حضور تری‌کلسیم فسفات، ۳۵٪ بیشتر بود. در این مطالعه به بررسی اثرات متقابل منابع فسفر و پتاسیم بر رهاسازی این دو عنصر پرداخته شد و مشاهده گردید که جدایه‌ها در حضور هر دو منبع پتاسیم (بیوتیت و موسکویت) قادر به انحلال فسفات بوده و کانی‌های میکایی موجب افزایش یا کاهش حلالیت فسفر نشدند و منجر به این نتیجه‌گیری شد که انحلال فسفر جدایه‌ها متأثر از نوع کانی میکا نبود. از سوی دیگر توانایی جدایه‌های باکتریایی در رهاسازی پتاسیم متفاوت بود. با این حال در همه جدایه‌ها، رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت نسبت به موسکویت بالاتر بود. بیوتیت نسبت به موسکویت به آسانی مورد هوادیدگی بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. کانی بیوتیت به دلیل ساختار تری‌اکتاهدرال خود در مقایسه با ساختار دی‌اکتاهدرال موسکویت، پتاسیم بین لایه‌ای خود را با سهولت بیشتری آزاد می‌کند (Shu-Xin *et al*., 2007). یاخونتوا و همکاران (Yakhontova *et al.*, 1987) نشان دادند که شدت تخریب کانی‌های سیلیکاتی توسط

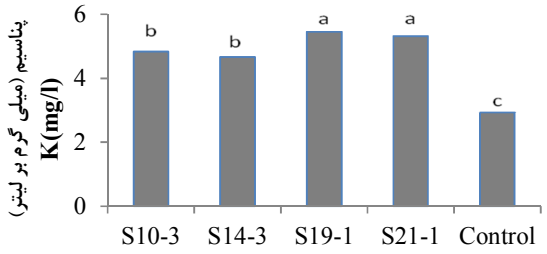
باکتری‌ها به ساختار شیمیایی ترکیبات معدنی وابسته است. سلیمان‌زاده و همکاران (Solaymanzade *et al*., 2015) در بررسی روند آزادشدن پتاسیم از کانی‌های میکایی (موسکویت و فلوگوپیت) پس از تلقیح باکتری *Bacillus cereus*، مشاهده کردند که آزادسازی پتاسیم در همه تیمارها در آغاز، افزایشی و با گذشت زمان، کاهشی، سپس افزایشی و در پایان تقریباً ثابت شد. آن‌ها میانگین غلظت پتاسیم آزادشده از کانی موسکویت را در همه تیمارها ۱/۸-۱/۵۴ برابر بیشتر از فلوگوپیت گزارش کردند و این افزایش را به نواقص ساختمانی و یا نوع موسکویت مورد استفاده محتمل دانستند. همچنین فعالیت بیشتر جدایه‌ها را در آزادسازی پتاسیم، به ساخت و ترشح اسیدهای آلی مربوط دانستند. ساخت اسیدهای آلی و کاهش pH از عوامل اصلی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا است. رهاسازی پتاسیم از کانی‌های مختلف توسط میکروارگانیسم‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی، عوامل کلات‌کننده، پلی ساکاریدها و غیره صورت می‌گیرد (Sheng *et al*., 2003 ؛ Dong, 2010).

در این آزمایش توانایی رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا (بیوتیت و موسکویت) در حضور منبع تری‌کلسیم‌فسفات نسبت به منبع محلول فسفر یعنی فسفات سدیم به طور متوسط ۴۵٪ بالاتر بود. به نظر می‌رسد که افزودن منبع نامحلول فسفر (تری‌کلسیم‌فسفات) به محیط کشت باکتری‌ها موجب تولید اسیدهای آلی و اسیدی کردن محیط شده تا بتوانند با کلات کردن کاتیون‌ها، فسفر غیرقابل دسترس را حل کنند. قرار گرفتن باکتری در شرایط کمبود فسفر موجب می‌شود که باکتری با برخی سازوکارها از جمله تولید اسیدهای آلی فسفر مورد نیاز خود را فراهم کند که همین امر شرایط را برای افزایش رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا مستعد می‌کند (Sarikhani, 2016). روابط مشاهده شده بین کاهش pH و مقدار فسفر آزادشده از محیط کشت حاوی تری‌کلسیم‌فسفات نشان می‌دهد که اسیدهای آلی تولیدشده نقش مهمی در اسیدی کردن محیط ایفا می‌کنند. روابط مشابهی بین کاهش pH و انحلال فسفر از محیط کشت حاوی سویه‌های *آرتروباکتر* و *باسیلوس* گزارش شده است (Chen *et al*., 2006). ساریخانی (Sarikhani, 2016) نشان داد که استفاده از فسفات نامحلول می‌تواند رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا را افزایش دهد. این افزایش رهاسازی ممکن است به آزادسازی اسیدهای آلی از باکتری‌ها مربوط باشد. وی بالاترین میزان رهاسازی پتاسیم در حضور تری‌کلسیم‌فسفات را ۸/۲۵ میلی‌گرم بر گرم و در جدایه *Pseudomonas putida* P13 گزارش نمود. وانگ و همکاران (Wang *et al*., 2000) نیز افزایش رهاسازی پتاسیم در شرایط کمبود فسفر را گزارش کردند. در پژوهشی دیگر جیکیانگ و همکاران (Jiqiang *et al*, 2003) گزارش نمودند که بسیاری از جدایه‌های مورد آزمایش توانایی رهاسازی پتاسیم و فسفر را داشته و بیان کردند که توانایی انحلال فسفر و پتاسیم، همبستگی مثبتی با کاهش pH در محیط کشت داشت. کشاورز زرجانی و همکاران (Keshavarz-zarjani *et al*, 2014) آزادسازی پتاسیم و فسفر را از هفت سویه باکتری سیلیکاتی در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی نموده و گزارش کردند که انحلال‌پذیری تری‌کلسیم‌فسفات در محیط کشت مایع (پیکوفسکایا) توسط سویه‌های مختلف به طور معنی‌داری با کاهش pH افزایش پیدا کرد. دامنه تغییرات غلظت فسفر در محیط مایع ۶۱/۳-۴۵ میلی‌گرم بر گرم بود. آن‌ها نشان دادند که در رهاسازی پتاسیم تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش pH در محیط کشت مایع (الکساندروف) نسبت به شاهد مشاهده نشد. دامنه رهاسازی پتاسیم ۳/۱-۱/۸۸ میلی‌گرم بر گرم بود. هان و لی (Han & Lee, 2005) اثر دو باکتری حل‌کننده فسفات (*B. megaterium*) و حل‌کننده پتاسیم (*B. mucilaginosus*) بر جذب عناصر فسفر و پتاسیم و رشد گیاه بادمجان را مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفتند که استفاده همزمان از منابع معدنی فسفات و پتاسیم با تلقیح باکتری‌های فوق باعث افزایش فراهمی این دو عنصر شده و میزان جذب آنها در گیاه افزایش یافته و رشد گیاه را افزایش می‌دهد.

**جدول ۲- تجزیه واریانس آزادسازی پتاسیم و انحلال فسفات از منابع مختلف پتاسیم و فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی**

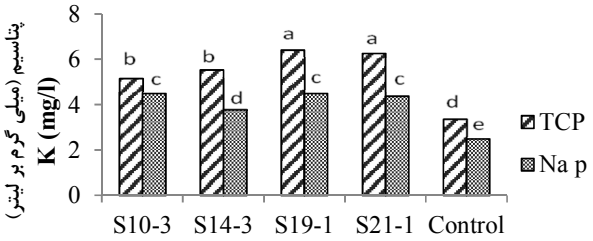
Table 1- Analysis of variance of potassium release and phosphate solubility by bacterial isolates from sources of potassium and phosphorus

| میانگین مربعات Mean of Square | | | منابع تغییر Source of variation |
|---|---|---|---|
| فسفر Phosphorus | پتاسیم Potassium | درجه آزادی df | |
| 37331* | 8.16** | 4 | باکتری Bacteria |
| 14596264** | 20.0** | 1 | منبع فسفر Source of phosphorus |
| 32378* | 0.70** | 4 | باکتری × منبع فسفر Bacteria× Source of phosphorus |
| 325ns | 406** | 1 | منبع پتاسیم Source of potassium |
| 7055ns | 3.15** | 4 | باکتری × منبع پتاسیم Bacteria× Source of potassium |
| 2941ns | 11.7** | 1 | منبع فسفر × منبع پتاسیم Source of potassium× Source of phosphorus |
| 6731ns | 0.47** | 4 | باکتری × منبع فسفر × منبع پتاسیم Bacteria× Source of phosphorus× Source of potassium |
| 9276 | 0.08 | 20 | خطای آزمایشی Error |
| 10.0% | 6.18% | | ضریب تغییرات Coefficient of variation |



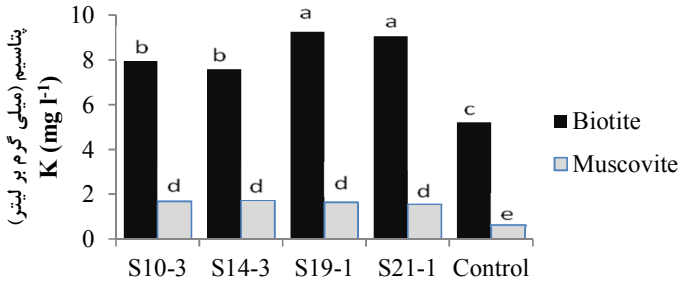

**شکل ۱- آزادسازی پتاسیم توسط چهار جدایه باکتریایی**

Figure 1- Potassium release by four bacterial isolates



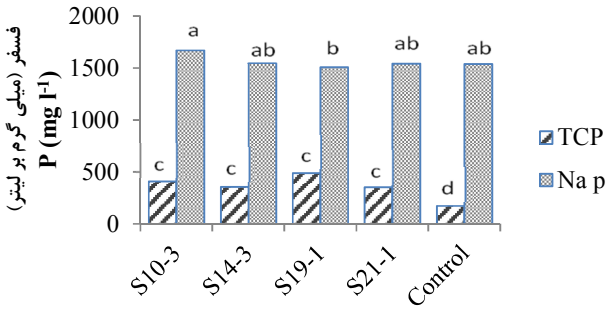

**شکل۲- آزادسازی پتاسیم توسط چهار جدایه باکتریایی در حضور دو منبع فسفر تری‌کلسیم فسفات و فسفات سدیم**

Figure 2- Potassium release by four bacterial isolates in the presence of two sources of phosphorus (tricalcium phosphate and sodium phosphate)




**شکل ۳- آزادسازی پتاسیم توسط چهار جدایه باکتریایی در حضور دو منبع پتاسیم بیوتیت و موسکویت**

Figure 3- Potassium release by four bacteria isolates in the presence of two sources of potassium (biotite and muscovite)




**شکل۴- انحلال فسفر توسط چهار جدایه باکتریایی در حضور دو منبع تری‌کلسیم فسفات و فسفات سدیم**

Figure 4- Phosphorus solubilization by four bacteria isolates in the presence of two sources of phosphorus (tricalcium phosphate and sodium phosphate)

**جدول ۳- اثر متقابل منابع فسفر و پتاسیم بر آزادسازی پتاسیم از دوکانی بیوتیت و موسکویت**

Table 2- Interaction effect of potassium and phosphorus sources on potassium release from biotite and muscovite

| | | منبع پتاسیم Source of potassium | |
|---|---|---|---|
| باکتری Bacteria | منبع فسفر Source of phosphorus | بیوتیت Biotite | موسکویت Muscovite |
| S10-3 | تری کلسیم فسفات TCP | $8.57^{b}$ | $1.79^{f}$ |
| S14-3 | | $8.96^{b}$ | $2.10^{f}$ |
| S19-1 | | $11^{a}$ | $1.80^{f}$ |
| S21-1 | | $10.8^{a}$ | $1.75^{f}$ |
| Control | | $6.05^{d}$ | $0.68^{gh}$ |
| S10-3 | سدیم فسفات NaP | $7.41^{c}$ | $1.60^{f}$ |
| S14-3 | | $6.25^{d}$ | $1.38^{fgh}$ |
| S19-1 | | $7.51^{c}$ | $1.50^{fg}$ |
| S21-1 | | $7.36^{c}$ | $1.38^{fgh}$ |
| Control | | $4.40^{e}$ | $0.58^{h}$ |

## نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه با هدف بررسی اثرات متقابل منابع فسفر و پتاسیم بر توان انحلال فسفر و پتاسیم توسط جدایه‌های باکتریایی انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که انحلال فسفات جدایه‌ها از منبع تری‌کلسیم‌فسفات در حضور کانی‌های بیوتیت و موسکویت تفاوت آماری معنی‌دار نداشت اما منابع مختلف فسفر بر توان رهاسازی پتاسیم جدایه‌ها مؤثر بودند. توان رهاسازی پتاسیم در این باکتری‌ها در حضور منبع نامحلول فسفر (تری‌کلسیم‌فسفات) بیشتر از منبع محلول (فسفات سدیم) بود و رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت بیشتر از موسکویت بود زیرا به دلیل ساختار تری‌اکتاهدرال بیوتیت، عنصر پتاسیم راحت‌تر از آن آزاد می‌گردد. می‌توان گفت در حضور منبع نامحلول فسفر، جدایه‌های باکتریایی برای تأمین فسفر مورد نیاز خود اقدام به تولید اسیدهای آلی نموده و با کاهش pH و کلات کردن کاتیون‌ها، فسفر نامحلول را قابل دسترس می‌کنند. جدایه‌های باکتریایی برای فراهم نمودن پتاسیم نیز به کمک همین سازوکار یعنی تولید اسیدهای آلی پتاسیم را محلول می‌کنند و بنابراین به دلیل تشابه این دو مکانیسم، در شرایط کمبود فسفر، رهاسازی پتاسیم نیز افزایش یافته است اما در حضور منبع فسفر محلول یعنی فسفات سدیم که به سهولت فسفر را در اختیار جدایه‌ها قرار می‌دهد مکانیسم تولید اسیدهای آلی در سلول تحریک نشده و در نتیجه پتاسیم کمتری از کانی‌ها آزاد می‌شود. در این تحقیق دو جدایه کارآمد که رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا را حتی در حضور منبع نامحلول فسفر (تری‌کلسیم‌فسفات) به طور معنی‌داری افزایش دادند، S19-1 و S21-1 بودند که پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آتی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین توصیه می‌شود که توانایی رهاسازی پتاسیم توسط این جدایه‌ها تحت تأثیر عوامل دیگر از جمله طول مدت انکوباسیون، pH محیط و شرایط بافری، منابع کربنه مختلف و سایر موارد ارزیابی شود تا روابط دقیق‌تری بین این عوامل و پتانسیل رهاسازی پتاسیم این جدایه‌ها بدست آورد. از یافته‌های این تحقیق چنین برداشت می‌شود که کارایی آزاد سازی پتاسیم از کانیهای میکایی توسط این جدایه‌ها، در خاکهایی با منابع فسفر در دسترس محدود، بیشتر باشد.

## Reference


Alam S., Khalil S., Ayub N., and Rashid M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology,* 4:454-458.

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. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(1): 5-11.

Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., and Shen F.T. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology,* 34(1): 33-41.

Diep C.N., and Hieu T.N. 2013. Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, KiênGiang province, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 1(3):88-92.

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

Goldstein A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous mineral phosphates by gram-negative bacteria. Phosphate in microorganisms: *cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC, pp. 197-203.

Han H.S., Lee K.D. 2005. Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(2): 176-180.

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): 983-90.

Jiqiang H.E., Dengyu L.I., Zhang X., Qiang C., and Ruyu L. 2003. Phenotypic aspects and phosphorus-releasing and potassium-releasing ability of silicate bacteria isolated from purple soils. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 9 (1): 71- 7.

Jones B.J.J. 2001. Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis. CRC Press, USA.

Keshavarz-zarjani J., Aliasgharzad N., Oustan S.H., and Emadi S.M. 2014. Release of Potassium and Iron from Biotite and Phosphorus from Tricalcium phosphate by seven strains of bacteria in-vitro condition. *Journal of Soil Research*, 27(4):554-564.

Olsen SR and Sommers LE. 1982. Phosphorus. In: Page *et al*. (Ed.) Methods of soil Analysis- Part 2. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, WI, USA, pp. 403-430.

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.

Raghothama K.G., and Karthikeyan A.S., 2005. Release of Potassium and Iron from Biotite and Phosphorus from Tricalcium phosphate by seven strains of bacteria in vitro. *Journal of Soil Research*, 274:37–49.

Rodriguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4): 319-339.

Sarikhani M.R., Ebrahimi M., and Malboobi M.A. 2015. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1: 76-110.

Sarikhani M.R. 2016. Increasing potassium (K) release from K-containing minerals in the presence of insoluble phosphate by bacteria. *Biological Journal of Microorganism*, 87-96.

Sheng X.F., He L.Y., and Huang W.Y. 2003. Conditions of releasing potassium by a silicate dissolving bacteria strain NBT. *Agricultural Sciences in China*, 1(6): 662-666.

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 surfaces of weathered feldspar. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(12): 1064-1068.

Shu - Xin T.U., Zhi-Fen G.U.O., and Jin-He S.U.N. 2007. Effect of oxalic acid on potassium release from typical Chinese soils and minerals. *Pedosphere*, 17(4): 457-466.

Solaymanzade M., Khademi H., and Sepehri M. 2015. The impact of *Bacillus cereus* strains on the release of potassium and iron of micaceous minerals. *Scientific Journal of Agriculture*, 37(2): 59-72.

Sparks D.L., and Huang P.M. 1985. Physical chemistry of soil potassium. In: R. D. Munson. (Ed). Potassium in agriculture. American Society of Agronomy – Crop Science Society of America – *Soil Science Society of America,* Madison, WI, pp. 201-276.

Wang J.G., Zhang F.S., Zhang X.L., Cao Y.P. 2000. Release of potassium from K-bearing minerals: Effect of plant roots under P deficiency. *Nutrient Cycling in Agro-ecosystems*, 56(1): 45-52.

Weed S.B., Davey C.B., and Cook M.G. 1969. Weathering of mica by fungi. *Soil Science Society of America Proceedings*, 33(5): 702-706.

Xiufang H., Jishuang C., and Jiangfeng G. 2006. Two phosphate and potassium- solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 983 - 990.

Yakhontova L.K., Andreev P.I., Ivanova M.Y., and Nesterovich L.G.1987. Bacterial decomposition of smectite minerals. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 296(1): 203-206.

# Interaction Effects of Different Sources of Phosphorous and Potassium on Phosphate and Potassium Solubilizing Behavior of Some Bacterial Isolates

**Shokufeh Moradi[1], Mohammad Reza Sarikhani[2*]**

(Received: July 2016 Accepted: January 2016)

**Abstract**

Potassium and phosphorus are essential elements for plant growth, and application of biological methods is one approach to supply them. This study was done, in order to evaluate the effect of soluble source of phosphorus (phosphate sodium) and insoluble (tricalcium phosphate or TCP) on K release from mica minerals (biotite and muscovite) and also the effect of mica minerals in dissolution of phosphorus from tricalcium phosphate. This test was carried out in the presence of some bacterial isolates belonging to the genus *Pseudomonas* (S10-3, S14-3, S19-1 and S21-1). It was conducted as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications containing two factors including two source of phosphorus and two potassium sources. From overnight cultures of the bacteria (0.5 ml) were added to 30 ml of Aleksandrov medium. After incubation for one week at 26 °C and shaking at 120 rpm, released K in supernatant was measured by using flame photometer and the dissolution of phosphate recorded at 430 nm by spectrophotometer (yellow method). The results showed that K releasing from the biotite was more than muscovite and bacterial isolates released more potassium (in average 15-48%) in the presence of TCP than sodium phosphate. The isolate S19-1 revealed the highest potassium releasing (5.45 mg $l^{-1}$). The results displayed that the released potassium from biotite was higher than muscovite (4.5 times). Biotite and muscovite minerals did not significantly affect the phosphate solubilization and the highest phosphate solubilization (488 mg $l^{-1}$) was obtained by S19-1. Mica minerals did not affect P solubility behavior of isolates but K releasing from mica minerals was increased in the presence of insoluble phosphate (TCP).

**Keywords**: Biotite, Muscovite, *Pseudomonas*, Tricalcium phosphate

1. PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2. Associate Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com