آزادسازی سیلیسیم از کانی ورمی‌کولایت توسط باکتری‌های *Pseudomonas Putida* و *Enterbacter cloacae* درشرایط آزمایشگاهی

لیلا پورجاسم*، احمد لندی ، نعیمه عنایتی ضمیر و سعید حجتی
به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیاران گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
Email: pourjassem@gmail.com

چکیده

پژوهش حاضر به منظور تاثیر باکتری بر آزادسازی سیلیسیم از ورمی‌کولایت انجام شد .آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد .فاکتورهای آزمایش شامل باکتری (*pseudomonas Putida R9* ، *Enterbacter cloacae R33*و بدون باکتری) و زمان (۷ ، ۱۰ ، ۳۰ روز) بود. PH محیط کشت بر روی ۷ تنظیم گردید.مقدار سیلیسیم و pH نهایی محیط کشت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل باکتری و زمان بر میزان سیلیسیم محیط در سطح یک درصد معنادار شد. بیشترین میزان سیلیسیم محیط در ارلن حاوی *Enterbacter cloacae R33* ، روز پانزدهم اندازه-گیری شد.

واژه های کلیدی: *pseudomonas Putida R9*،*Enterbacter cloacae R33* ، آزادسازی سیلیسیم

مقدمه

خاک از جنبه‌های مختلف فیزیکی، شیمیائی، بیولوژی و حاصلخیزی اهمیت دارد. بسیاری از رفتارهای خاک از جمله تثبیت و آزادسازی عناصر غذائی خصوصا پتاسیم، تحت تاثیر مقدار و نوع کانی‌های رسی قرار دارد. رفتارهای خاک از جمله انبساط و انقباض، تبادل کاتیونی، تهویه، نفوذپذیری و ویژگیهای تغذیه‌های خاک، تثبیت و آزادسازی عناصر غذائی نظیر پتاسیم، تحت کنترل مقدارو نوع کانیهای رسی قرار دارد (گولدینگ ، ۱۹۸۳). سیلیسیم (Si) دومین عنصر فراوان (۲۸ درصد) پوسته زمین است. بخشی از اسید سیلیسیک محلول در خاک توسط فاز جامد خاک (ذرات رس ، هیدروکسیدهای آهن و آلومینیوم) جذب می‌شود. کاهش در غلظت سیلیس در محلول خاک به جذب توسط مینرالهای رس ثانویه نسبت داده میشود. به هر حال هیدروکسید آهن و آلومینیوم ظرفیت جذب بالایی دارند که باعث کاهش انحلال سیلیس در محلول خاک میشوند. سیلیسیم عمدتا به صورت اسید مونوسیلیسیک $Si(OH)_4$ برای گیاهان قابل جذب است و در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۶ میلی‌مولار در محلول خاک وجود دارد. ساده ترین منبع سیلیسیم در خاک کوارتز (SiO_2) است (دانتوف ،۲۰۰۱). وظایف سیلیسیم در گیاه می‌توان به وظایف ساختمانی، فیزیولوژیکی و حفاظتی اشاره کرد (هنسن و همکاران ، ۱۹۸۷). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) گروهی از باکتری‌ها هستند که در ریزوسفر تعدادی از گیاهان حضور داشته و قابلیت ساکن شدن و ایجاد یک رابطه مداوم با گیاهان برای افزایش زیتوده ، رشد ریشه و بازده اقتصادی را دارند (یائو و همکاران ، ۲۰۱۰) و می توانند از طریق مکانیسم‌هایی مانند افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی ، تولید مواد زیستی محرک رشد گیاه ، حفاظت کننده‌های زیستی به طور مستقیم یا غیر مستقیم موجب افزایش رشد گیاه شوند (سرچشمه پور و همکاران ، ۱۳۸۸). باکتری‌های سیلیکاتی قادر به آزادسازی عناصری مثل پتاسیم ، آهن ، آلومینیوم و سیلیسیم از کانی‌های سیلیکاتی حاوی این عناصر مثل میکا ، ایلایت و فلدسپار از طریق تولید و ترشح اسیدهای آلی هستند (فریدریچ و همکاران ،۱۹۹۱ ؛ آلمن و همکاران ،۱۹۹۶). شمار فراوانی از باکتریهای هوازی میتوانند با ساخت سیدروفور مایه رهاشدن عناصر غذایی ضروری از کانی‌ها بشوند. برای نمونه ساخت سیدروفور در باکتری *Pseudomonas mendocina* مایه رهاشدن آهن از گئوتیت، هماتیت، فری‌هیدرایت وکائولینیت می‌شود (دونگ ، ۲۰۱۰).

مواد و روش‌ها

کار تحقیقاتی برای بررسی کارایی باکتری *Enterbacter cloacae* و *Pseudomonas putida* در رهاسازی سیلیسیم از ورمی‌کولایت در شرایط آزمایشگاهی در دانشگاه شهید چمران اهواز به مدت ۳۰ روز انجام گردید.این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد.تیمارهای آزمایش شامل باکتری (*pseudomonas Putida R9* ، *Enterbacter cloacae R33* و بدون باکتری) و زمان (۷ ، ۱۰ ، ۳۰ روز) بود. در این پژوهش از کانی ورمی‌کولایت که از معادن یزد بیش‌تر آماده و آزمایش گردیده بود، استفاده شد. کانی از الک ۲۷۰ مش عبور داده شد. کانی‌ها با ۰/۰۱HCl مولار تاخروج کامل بازهای قابل تبادل شسته شد. سپس نمونه‌ها درآون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک گردیدند (باربارا و همکاران،۲۰۰۹). باکتری‌های *pseudomonas Putida R9* و*Enterbacter cloacae R33* از کلکسیون باکتریایی دانشگاه شهید چمران تهیه شد. در شرایط سترون، محیط کشت مایع شامل ترکیبات ۳/۹ گرم بر لیتر سدیم دی هیدروژن فسفات ، ۴/۴ گرم بر لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ، ۱/۱۴ گرم بر لیترس آمونیوم سولفات ، ۰/۱ گرم بر لیتر سدیم کلرید ، ۴ گرم بر لیتر گلوکز ، ۳/۶ گرم بر لیتر مانیتول و ۲ گرم کانی شسته شده با اسید در یک لیتر آب مقطر تهیه و pH آن در حدود ۷ تنظیم شد (گیتس، ۱۹۹۶). سویه‌ها ابتدا در محیط کشت مایع مغذی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور تکان دهنده به مدت یک شبانه روز نگه داری شد تا شمار یاخته باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع به اندازه بسنده افزایش یافت. آزمایش در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کانی انجام شد. ۱۲۵ میکرولیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد به طوری که جمعیت نهایی باکتری در هر ارلن 10^8 cfu/ml باشد و برای نمونه شاهد از محیط کشت بدون باکتری استفاده شد؛ ارلن‌ها در دستگاه شیکر انکوباتور به مدت (۷ ، ۱۰ ، ۳۰ روز) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور ۱۲۰ نگهداری شدند. در زمان‌های مشخص شده میزان pHنمونه‌ها نیز با pH متر اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها با بهره‌گیری از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عصاره‌گیری شد؛ برای اندازه‌گیری سیلیس رها شده درمحلول از روش رنگ‌سنجی استفاده شد (جوزف و همکاران،۲۰۱۰). برای تهیه استانداردهای سیلیسیم ابتدا محلول ppm ۱۰۰ محلول مادری تهیه شد و سپس ازمحلول مادری غلظت‌های ppm (۴ و ۳ ، ۲ ، ۱) آماده گردید.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس تیمارها نشان داد که اثر متقابل باکتری و زمان بر میزان سیلیسیم محیط در سطح یک درصد معنی‌دار شد. (جدول۱).

جدول۱- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر غلظت سیلیسیم

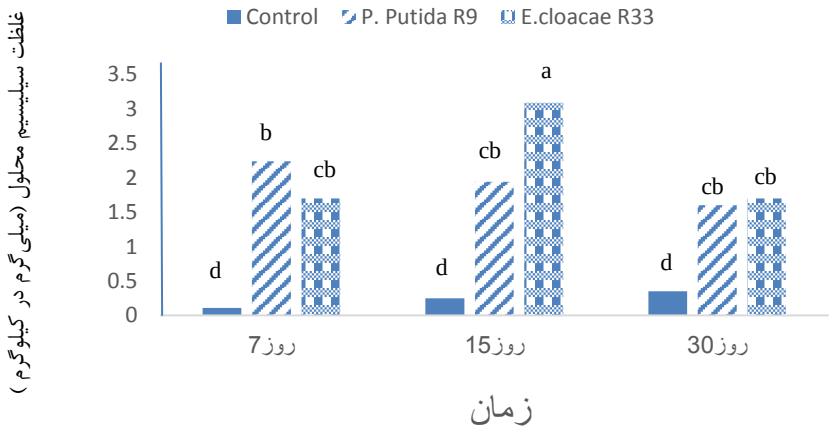
منابع تغییرات	درجه آزادی(df)	غلظت سیلیسیم محلول	pH محیط کشت
سویه باکتری	۲	۱۲/۶۹**	۰/۶۴
زمان	۴	۰/۴۱**	۰/۲۳
زمان ×باکتری	۸	۰/۰۵**	۰/۰۷۴
خطا		۰ /۱۳	۰/۶
ضریب تغییرات (٪)		۲۶/۰۳	۳/۹۷

** بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد می‌باشد

* بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال۵ درصد می‌باشد.

آزادسازی سیلیسیم

روند آزادشدن سیلیسیم از کانی ورمی‌کولایت تابعی از زمان تحت تاثیر سویه‌های باکتری در نمودار (۱) نشان داده شده است بیشترین آزاد سازی پتاسیم مربوط به *P.Putida R9* در ۷روز اول با غلظت (۲/۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود و روند کاهشی تا پایان آزمایش به تدریج ادامه داشت، در حالی که *E.cloacae R33* با غلظت (۳/۰۹ میلی‌گرم در کیلوگرم)در روز ۱۵ام بیشترین رهاسازی سیلیسیم را نشان داد. تفاوت معناداری در نمونه شاهد با سویه‌های باکتریایی مشاهده شد. هپف و همکاران (۲۰۰۸) اثر ریزجانداران بر آزادسازی کاتیون‌ها از بیوتیت در مدت ۳۵ روز در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نشان دادند که در تیمارهای مایه زنی شده با باکتری کاتیون‌ها در برابر تیمارهای شاهد با تندی کمتری وارد محلول شده و باکتری *Bacillus subtilis* اندازه سیلیسیم، پتاسیم و منیزیم آزادشده رامحیط کشت حاوی کانی حدود ۵۰٪ افزایش میدهد. استیراکاوا و همکاران (۱۹۹۹) گزارش دادند باکتری *Bacillus cereus* با ساخت اسیدهای آلی مانند اسید استیک به اندازه کمتری اسیدهای لاکتیک، پیرویک، بوتیریک و فرمیک باعث آزادسازی عناصر از فلوگوپیت در محیط کشت می‌شود.



شکل ۱- اثر متقابل زمان و باکتری بر رها سازی سیلیسیم

تغییرات pH

دامنه تغییرات pH در نمونه‌های شاهد بین ۶ تا ۷ و در نمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های باکتری بین ۵ تا ۷ متغیر بود .کاهش pH در نمونه‌های مایه زنی شده وابسته به مواد ساخته شده با سویه های باکتری و گلوکز محلول بوده و در نمونه های شاهد وابسته به گلوکز موجود درمحلول بوده است. در کارتحقیقاتی استیراکوا (۲۰۱۲)نشان داده شد که گونه‌های هتروتروفیک با بهره‌گیری از گلوکز به عنوان منبع کربن و انرژی، اسیدهای آلی و اسید کربنیک می‌سازند که این اسیدها می‌توانند pH را کاهش داده و باعث انحلال سطوح کانی شود. هیرچ و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که ساخت اسیدها توسط ریزجانداران همانند محصولات سوخت و ساز بدن آنها، می‌توانند باعث انحلال سنگ‌ها شود. تولید و ترشح پروتون، اسیدهای آلی، سیدروفورها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی می‌تواند بر اثر تجزیه کانی توسط باکتری‌ها باشد (گرودیو ،۱۹۸۷ ؛ولچ و همکران، ۱۹۹۹؛ لیرمن و همکاران ،۲۰۰۰؛ روجرس بنت، ۲۰۰۴). اثر کارایی سویه‌های باسیلوس مگاتریوم و آرتروباکتر بر انحلال بیوتیت و تری کلسیم فسفات در آزادسازی پتاسیم ، آهن و فسفر از طریق تولید اسید آلی و سیدروفر گزارش کردند و همچنین نشان دادند که سویه‌های باکتری با استفاده از حداقل سه مکانیسم باعث انحلال کانی‌ها می‌شود: ۱- تجزیه کانی در اثر کاهش pH محیط کشت (با تولید و ترشح اسیدهای آلی) ۲- تشکیل کمپلکس با کاتیونهای سطحی کانی (از طریق سیدروفور و اسیدهای

آلی تولید شده توسط باکتری‌ها) ۳- پلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌ها که به طور غیرمستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارد : پلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی و سیدروفورها را به شدت جذب کرده و منجربه تشکیل غلظت بالایی 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، ۲۰۰۶ ؛ دریور و ستلینگز، ۱۹۹۷).

این مطالعه نشان داد که تمام سویه‌های مورد آزمایش به طور معنی‌داری قادر به آزادسازی سیلیسیم از کانی ورمی‌کولایت در شرایط درون شیشه‌ای هستند هر چند که پتانسیل آزادسازی این عناصر بین سویه‌های مورد آزمایش متفاوت بود. اثر متقابل باکتری و زمان بر میزان آزادسازی سیلیسیم از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنادار بود. محیط کشت مایع حاوی سویه *E. cloacae R33* نسبت به سویه *P.Putid R9* در آزادسازی سیلیسیم 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.

منابع

سرچشمه پور ،پ .ثواقبی ،م. صالح راستین ، غ.ر. علیخانی ،ن. و پوربابایی ،ا .۱۳۸۸. جداسازی و شناسایی باکتریهای مقاوم به شوری و بررسی تاثیر آنها بر رشد گیاه جو در خاک های شور .پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده‌ی کشاورزی ، دانشگاه شهید چمران اهواز.

Datnoff L.E., Synder G.H.and Korndorfer G.H. 2001. Investigate The effect of silicon on corn grown under hydroponic conditions of salinity stresses. MSC thesis for Soil Science, Faculty of Agriculture, ، Shahid Chamran University of Ahvaz .

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

Drever J.I. and L.L. Stillings. 1997. The role of organic acids in mineral weathering.Colloids Surf. 120: 167-181.

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.

Gates W. P., Stucki J. W. and Kirkpatrick R. J. (1996a), Structural properties of reduced Upton montmorillonite, Phys. Chem. Miner.117, 535–541.

Golding .1983. Microscopic study of soil porosity and clay mineralogy and its relation to the availability of soils with different clays in Golestan Province. . MSC thesis for Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Groudev S.N. 1987. Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. Acta Biotechnologica. 7: 299–306.

Hansan D.J.,Dayanandam P.,Kaufman,P.B. and Brotherson J.D.1967. Investigate The effect of silicon on corn grown under hydroponic conditions of salinity stresses. MSC thesis for Soil Science, Faculty of Agriculture, ، Shahid Chamran University of Ahvaz .

Hirsch P., Eckhardt F. E. W., and Palmer R. J. 1995. Methods for the study of rock-inhabitating microorganisms-a mini review. Journal of Microbiological Methods, 23:143–167.

Hopf J., Langenhorst F., Pollok, K., Merten, D., and Kothe, E. 2008. Influence of microorganisms on biotite dissolution: an experimental approach. Chemie Der Geochemistry, 6: 45–56.

Joseph E ., Bretenbeck G . and Breitenbck k.2010.Simple , Robust Method for quantifying Silica in plane tisdve.Communications in Soil and plant Analysis . 41:2075-2085.

Liermann L.J., Kalinowski B.E., Brantley S.L., and Ferry J.G.2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. Geochimica et Cosmochimica Acta. 64: 587- 602.

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.

Rogers J.R., and Bennett P.C. 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chemical Geology. 203: 91-108.

Styriakova I,. Styriak I., and Kusnierova, M. 1999. The release of sulphidic minerals from aluminosilicates by *Bacillus* strains. Process Metallurgy, 9: 589–596.

Styriakova I., Styriak I. and Oberhansli, H. 2012. Rock weathering by indigenous heterotrophic bacteria of *Bacillus spp*. at different temperature: a laboratory experiment. Mineralogy and Petrology, 105:135–144.

Ullman W.J.,kirchman D,L.,Welchm S.A.1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. Chemical Geology. 132:11-17.

Welch S.A,.Ulman W.J. 1999. The effect of microbial glucose metabolism on feldspar dissolution rates between 5 and 35 °C. Geochimica et Cosmochimica Acta 63:3247-3259.

Yao L.,Wu Z.,Zheng Y.,Kaleem I.and Li C.2010. Isolation and identification of bacteria resistant to salinity and investigated their effects on the growth of barley plants in saline soils. . MSC thesis for Soil Science, Faculty of Agriculture, ، Shahid Chamran.

Si release from the mineral vermiculite by Enterbacter cloacae and Pseudomonas Putida bacteria in condition Laboratory

L. Pourjassem , A. landi, N. enayatzamir and S. hojati

M.Sc Student, Professor and Associate Professors respectively, Departement of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz , Iran

Abstract

The present research was conducted to investigate the effect of bacteria on Si release from Vermiculite. The experiment was done as factorial in completely randomized design at three replication. The factors included bacterium inoculation (without inoculation, *Enterbacter cloacae R33, pseudomonas Putida R9*) and time (7, 15, 30 days). The medium pH was adjusted to 7. PH and Si amount of medium was measured. The results showed PH significant effect of bacterium ana time interaction on Si amount ($P < 0.01$). Maximum amount of Si was obtained in the treatment of *Enterbacter cloacae R33* at 15 time.

Keywords: *Pseudomonas Putida R9, Enterbacter cloacae R33,* Silicon release