محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

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

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

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

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

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

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

چکیده

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

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

مقدمه

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

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

* ایمیل نویسنده مسئول: ranjbarrahim14@gmail.com

[1] *Pseudomonas* sp.

[2] *Aspergillus* spp.

[3] Potassium solubilizing bacteria (KSB

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

---

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

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

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

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

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

ارزیابی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

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

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

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

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

[1] Solubility index

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

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

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

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

نتایج و بحث

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

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

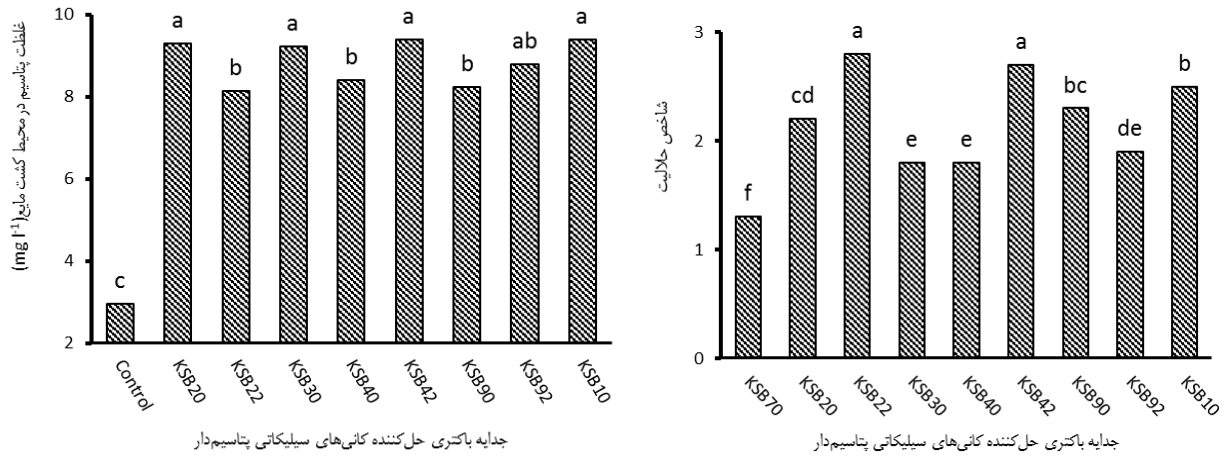
طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی کیفی ۹ جدایه باکتری مورد تحقیق، جدایه‌های باکتری از لحاظ توان حل کردن کانی‌های پتاسیمی و ایجاد هاله شفاف روی محیط‌کشت جامد الکساندروف (شاخص حلالیت) تفاوت معنی‌داری ($P\leq 0.01$) با هم داشتند (جدول ۱).

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

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

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

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



(الف) (ب)

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

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

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

تاثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده پتاسیم بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک

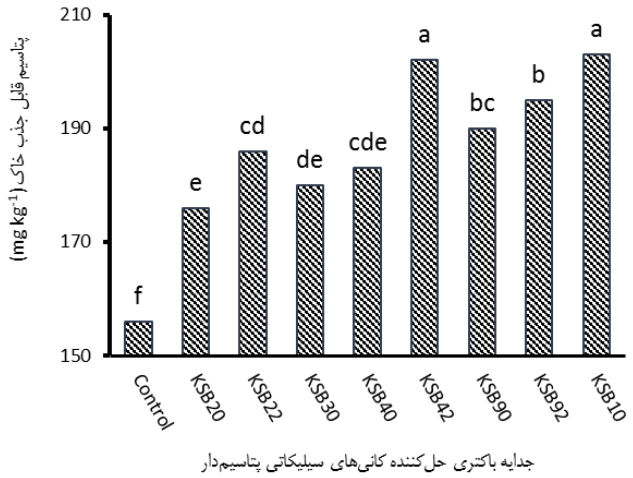
خاک مورد آزمایش غیرآهکی (کربنات کلسیم معادل برابر با ۰/۲۵ درصد) و دارای ۳۹ درصد رس و ۱۵۸ میلی‌گرم در کیلوگرم پتاسیم قابل استخراج با استات آمونیوم یک مولار بود.

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه

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

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

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



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

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

نتیجه‌گیری

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

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

منابع

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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