نشریه دانش آب و خاک / جلد 26 شماره 1/1 صفحه‌های 259 تا 271/ سال 1395

اثر مایه‌زنی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم در تأمین پتاسیم گوجه‌فرنگی در بستر شن - موسکویت و شناسایی جدایه‌های کارآمد

امید مدنی[1]، محمدرضا ساریخانی[*2]، شاهین اوستان[3]

تاریخ دریافت: 94/01/17 تاریخ پذیرش: 94/09/08

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2] استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[3] دانشیار شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[*] مسئول مکاتبه، پست الکترونیکی: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

توجه به باکتری‌های آزادکننده پتاسیم به‌دلیل نیاز بالای گیاهان به عنصر پتاسیم و نقش آن هست. بر همین اساس در آزمایشی اقدام به بررسی تأثیر 15 جدایه باکتریایی شامل S5-5، S5-9، S6-6، S10-3، S11-2، S12-3، S14-1، S14-3، S15-1، S16-3، S17-4، S19-1، S19-2، S20-7، S21-1 به‌همراه سویه Pseudomonas putida P13 بر رشد گوجه‌فرنگی شد. آزمایش در بستر شن و کانی موسکویت در شرایط استریل انجام گرفت و در طول دوره رشد سایر عناصر غذایی به‌جز پتاسیم از طریق محلول غذایی هوگلند تأمین شد. نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد این 16 سویه با آن‌که روی وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر کل و همچنین غلظت و مقدار پتاسیم ریشه و غلظت و مقدار فسفر اندام هوایی اثر معنی‌داری نداشت اما بر ارتفاع گیاه در پایان دوره، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک کل، غلظت و مقدار پتاسیم اندام هوایی و غلظت و مقدار فسفر ریشه گوجه‌فرنگی اثر معنی‌دار داشت. به‌طوری‌که بیشترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار S21-1 (48/08 cm) بود و نسبت به شاهد بدون باکتری 16/56 درصد افزایش نشان داد. همچنین بیشترین وزن خشک کل مربوط به تیمار S19-1 (6/35 g) بود و غلظت پتاسیم اندام هوایی در تیمار S10-3 با میانگین $14/31\ mg\ g^{-1}$ بالاترین مقدار به‌دست آمد. علاوه بر آن مقدار پتاسیم اندام هوایی برای S10-3 با میانگین $78/68\ mg\ pot^{-1}$ بیشترین بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 70 درصد افزایش داشت. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی جدایه‌های کارآمد و برتر نشان داد که همگی آن‌ها متعلق به جنس Pseudomonas هستند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های آزادکننده پتاسیم، پتاسیم، شاخص‌های رشد گوجه‌فرنگی، میکا

Inoculation Effects of Potassium Releasing Bacteria on K Nutrition of Tomato in Sand-Muscovite Medium and Identification of Efficient Isolates

O Madani[1], MR Sarikhani[*2], S Oustan[3]

Received: 06 April 2015 Accepted: 29 November 2015
[1]M.Sc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran
[2,3]Assist. Prof. of Soil Biology and Biotechnology and Associate. Prof. of Soil Chemistry and Fertility, Dept. of Soil Science, Univ. of Tabriz, Iran
*Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Attention to the potassium releasing bacteria is due to high demand of plants to this element. Therefore, in this study the effects of 15 bacterial isolates (S5-5, S5-9, S6-6, S10-3, S11-2, S12 -3, S14-1, S14-3, S15-1, S16-3, S17-4, S19-1, S19-2, S20-7 and S21-1) and Pseudomonas putida strain P13 on the growth and potassium nutrition of tomato were assessed. The experiment was performed under sterile condition in a bed of sand and Muscovite and other nutrients, except potassium, during the growing season were supplied through Hoagland solution. The results showed that the application of the 16 isolates didn't affect the wet and dry weight of shoot and the concentration and content of root potassium but the plant height, wet and dry weight of root, total dry weight of plant, concentration and content of shoot potassium and the concentration and content of root phosphorus significantly increased in some isolates in comparison to the un-inoculated treatment. The highest height of the plant with an increase of 16.56% compared to the uninoculated control was observed in the isolate S21-1 (48.08 cm). The highest total dry weight of plant was measured with the strain S19-1 (6.35 g pot^{-1}) and maximum concentration of potassium in shoot (14.3 mg g^{-1}) was observed in the isolate S10-3. The most content of the shoot potassium (78.67 mg pot^{-1}) gained in isolate S10-3 which in comparison with the non-bacterial control showed an increase of 70 %. Molecular and biochemical identification results (16S rDNA) showed that efficient isolates belonged to the genus Pseudomonas.

Keywords: Potassium releasing bacteria, Potassium, Growth index, Tomato, Mica

مقدمه

پتاسیم به‌همراه نیتروژن و فسفر یکی از سه عنصر ضروری برای رشد گیاه تلقی می‌شود و یکی از منابع تجدیدناپذیر هست. این عنصر نقش‌های حیاتی در متابولیسم گیاه از قبیل فتوسنتز، انتقال موادی نظیر قندها و نشاسته در گیاه، تنظیم منافذ روزنه گیاهان، فعال‌سازی بیش از 60 آنزیم، افزایش کیفیت محصول، افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها دارد (طباطبایی 1388). این عنصر به‌طور عمده در سه شکل مختلف در خاک وجود دارد که شامل پتاسیم قابل‌استفاده، تثبیت‌شده و پتاسیم موجود در مواد معدنی خاک هست. در بین سه شکل مختلف پتاسیم در خاک، غلظت پتاسیم موجود در محلول خاک معمولاً بسیار کم است (1 % تا 2 %) و بخش عمده پتاسیم (98%) به‌صورت نامحلول در خاک، سنگ و مواد معدنی است (گلدشتاین 1994). اگر چه کمبود پتاسیم مثل کمبود

نیتروژن و فسفر گسترده نیست اما بسیاری از خاک‌ها که در ابتدا از نظر این عنصر غنی بودند به‌علت کاربرد و استفاده از رقم‌های هیبرید و با عملکرد بالا، همچنین کشت گیاهان پرنیاز (نظیر سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، موز و غیره)، کشاورزی متمرکز و نیز آبشویی، فرسایش و رواناب و جایگزین نشدن پتاسیم برداشت‌شده توسط گیاهان، دچار کمبود پتاسیم شده‌اند (شنگ و هوانگ 2002). لذا به‌منظور تأمین پتاسیم موردنیاز گیاه، پتاسیم محلول و تبادلی باید از طریق اضافه کردن کودهای شیمیایی و یا از طریق آزاد شدن پتاسیم تثبیت‌شده و هوازدگی کانی‌های حاوی پتاسیم (مثل میکا و فلدسپار) تأمین گردد (اسپارکس و هوانگ 1985). مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی در سال‌های اخیر در بخش کشاورزی، آلودگی منابع آب، خاک و محیط‌زیست را به‌دنبال داشته است به‌همین دلیل پرداختن به راهکار زیستی با توجه به مسائل و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی ضروری به‌نظر می‌رسد. بهره‌گیری از باکتری‌های آزادکننده یا حل‌کننده پتاسیم [1] (KSB)به‌عنوان کودهای زیستی روشی برای تأمین پتاسیم موردنیاز گیاه است.

کودهای زیستی متشکل از باکتری‌ها و قارچ‌های مفیدی هستند که از طریق روش‌هایی همانند، تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، رهاسازی یون پتاسیم، تأمین آهن، دیگر عناصر و تولید هورمون به بهبود تغذیه گیاه کمک نموده و علاوه بر آن با کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک و سایر اثرات مفید باعث تحریک بیشتر رشد گیاه شده و افزایش کمیت و کیفیت محصول را به‌دنبال دارند (بی‌نام 2006). الکساندروف و همکاران (1967) نشان دادند که Bacillus mucilaginosus قادر به آزادسازی پتاسیم، سیلیسیم و آلومینیوم از مواد معدنی نامحلول هست. کشاورز زرجانی و همکاران (1392) در مطالعه خود اقدام به جداسازی و شناسایی شش جدایه باکتری آزادکننده پتاسیم از خاک‌های آذربایجان نمودند. توانایی این جدایه‌ها در رهاسازی پتاسیم از سه تیمار بیوتیت، موسکویت و خاک اسیدشویی شده بعد از 5 روز انکوباسیون در دمای 28 درجه سلسیوس بررسی شد. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی نشان داد که 5 جدایه متعلق به گونه Bacillus megaterium بودند و تنها یک جدایه از جنس Arthrobacter بود. گرچه میزان رهاسازی پتاسیم در جنس Arthrobacter در مقایسه با 5 جدایه دیگر کمتر بود، اما همه آن‌ها در مقایسه با شاهد میزان بیشتری پتاسیم آزادکرده بودند. مطالعات آن‌ها نشان داد که در مجموع باکتری‌ها قادر به رهاسازی پتاسیم بیشتری از بیوتیت در مقایسه با موسکویت و خاک اسیدشویی شده بودند. هو و همکاران (2006) اقدام به جداسازی دوسویه باکتری حل‌کننده فسفات و پتاسیم به نام‌های KNP413 و KNP414 از خاک‌های کشور چین نمودند و گزارش نمودند که باکتری سویه KNP414 دارای قدرت انحلال پتاسیم بیشتری نسبت به سویه باکتری B. mucilaginosus AS1.153 است، درحالی‌که سویه دوم به‌عنوان کود زیستی به شکل گسترده‌ای در کشور چین استفاده می‌شود. با این توضیح در این تحقیق به بررسی برخی از جدایه‌های میکروبی به‌دست‌آمده از غربال‌گری در محیط آزمایشگاهی الکساندروف پرداخته شد تا توانایی آن‌ها در آزادسازی و تأمین پتاسیم برای گیاه گوجه‌فرنگی در بستر شن و کانی میکای موسکویت مشخص شود و در نهایت گونه‌های کارآمد شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

تعداد 15 جدایه باکتریایی از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز برای این پژوهش مورداستفاده قرار گرفت. این جدایه‌ها شامل S5-5، S5-9، S6-6، S10-3، S11-2، S12-3، S14-1، S14-3، S15-1، S16-3، S17-4، S19-1، S19-2، S20-7 و S21-1 بودند. لازم به ذکر است که جداسازی و غربال‌گری اولیه این جدایه‌ها در محیط الکساندروف انجام شد و بعد از آزمایش‌ها

[1] Potassium Solubilizing Bacteria

اولیه جدایه‌های فوق از میان بیش از 138 جدایه انتخاب شدند. با توجه به مشاهده نتایج مثبت از باکتری سویه Pseudomonas putida P13 در آزادسازی پتاسیم (ساریخانی و همکاران 2013) این باکتری نیز در آزمایش گنجانده شد.

کشت گلدانی گوجه‌فرنگی و اعمال تیمارهای باکتری

بستر مورداستفاده در کشت گلدانی، شن و کانی مسکویت بود و انتخاب این بستر به‌دلیل بررسی اثر تلقیح میکروبی در آزادسازی پتاسیم از کانی میکا بود. کانی موسکویت با اندازه ابعاد کمتر از 2 میلی‌متر از ایستگاه زمان‌آباد همدان تهیه و این کانی به‌عنوان منبع تأمین‌کننده پتاسیم برای گیاه در آزمایش استفاده شد. آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل 16 جدایه باکتری و شاهد (بدون تلقیح با باکتری) بودند.

ابتدا در گلدان‌های 2 کیلوگرمی مقدار 115 گرم کانی میکای سفید (مسکویت) توزین و با 650 گرم شن شسته شده و عاری از مواد غذایی مخلوط گردید و مجدداً مقدار 900 گرم شن به آن افزوده و مخلوط شد، به این صورت سعی شد تقریباً نسبت 1 به 10 کانی به شن ایجاد شود. گلدان‌ها در این شرایط در درون اتوکلاو در دمای 121 درجه سلسیوس، فشار 1 اتمسفر و به‌مدت90 دقیقه استریل شدند تا برای کشت گیاه و سپس تلقیح میکروبی آماده شوند.

بذر گوجه‌فرنگی از ارقام محلی و از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان تهیه گردید و سپس به‌مدت 5 دقیقه با هیپوکلریت سدیم 1 درصد ضدعفونی و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل به تعداد 10 بذر در هر گلدان کشت گردید. سپس هر گلدان با 10 میلی‌لیتر زادمایه باکتریایی (OD_{600}= 0/7) بر اساس طرح آزمایشی در زمان کشت تلقیح شد. برای تکثیر باکتری‌ها از محیط NB استفاده شد و در نمونه شاهد به همان میزان محیط NB استریل افزوده شد. پس از رشد بوته‌های گوجه‌فرنگی تنها 4 بوته در هر گلدان در طول آزمایش نگهداری شد. به‌منظور اطمینان از تلقیح موفق بعد از گذشت یک ماه از کشت، مجدداً تلقیح میکروبی با شرایط فوق‌الذکر انجام شد. به‌منظور تأمین سایر عناصر غذایی موردنیاز گیاه از محلول غذایی هوگلند استفاده شد، البته با توجه به هدف مطالعه که بررسی نقش باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم از کانی موسکویت بود لازم بود که منابع تأمین‌کننده پتاسیم از این محلول حذف شود (هوگلند و همکاران 1950). گلدان‌ها در شرایط کنترل‌شده اتاقک رشد (طول دوره روشنایی 12 ساعت، دمای اتاقک رشد در شب و روز به‌ترتیب 2± 15 و 2± 28 درجه سلسیوس و با نور فلورسنت 10000–8000) لوکس قرار گرفتند و تا آخر مرحله رویشی و قبل از گلدهی نگهداری شدند. در پایان دوره رشد که نزدیک سه ماه طول کشید ارتفاع بوته‌ها و شاخص کلروفیل (در میانه دوره رشد و زمان برداشت) اندازه‌گیری شد. سپس، بخش هوائی و ریشه به‌طور جداگانه برداشت شدند. و بعد از خشک شدن نمونه‌های گیاهی، اندازه‌گیری پتاسیم و فسفر اندام هوایی و ریشه با استفاده از آماده‌سازی نمونه‌ها به‌روش هضم با اسید انجام شد.

برای اندازه‌گیری شاخص کلروفیل برگ، برگ‌های بالغ و شاداب از هر گیاه انتخاب و میزان کلروفیل آن با دستگاه کلروفیل‌متر مدل Hansatech CL-01 ساخت کشور انگلستان در دو طول‌موج 620 و 640 نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با میانگین گرفتن از داده‌های دستگاه کلروفیل‌متر شاخص کلروفیل برای هر گلدان مشخص شد. برای اندازه‌گیری درصد فسفر، پتاسیم بافت‌های گیاهی با توزین یک گرم از ماده خشک از روش هضم با اسید نیتریک غلیظ 65% استفاده شد (والینگ و همکاران 1989). برای تعیین غلظت فسفر پس از رقیق ساختن عصاره اصلی از روش اولسن و سامرز (1982) استفاده شد و در نهایت درصد فسفر بافت‌های گیاهی به‌روش زرد در طول‌موج 430 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدلPD-303 ساخت شرکت

Apel ژاپن تعیین شد. برای تعیین پتاسیم بافت‌های گیاهی پس از انجام عمل رقیق‌سازی برای نمونه‌های هضم شده، غلظت این عنصر با استفاده از دستگاه فلیم-فتومتر مدل 410 ساخت شرکت Corning انگلستان قرائت شد (جونز 2001).

شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی باکتری‌های کارآمد

با در نظر گرفتن نتایج کشت گلدانی و همچنین اثر عوامل محیطی از قبیل دما، شوری و pH (در این مقاله به نتایج آن اشاره نشده است) در نهایت 5 جدایه (S6-6، S10-3، S14-3، S19-1 و S21-1) به‌عنوان باکتری‌های کارآمد جهت شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی انتخاب شدند. برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها به‌روش 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R استفاده شد (جدول 1). برنامه PCR به‌کاررفته دارای 30 چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene این چرخه‌ها شامل، یک چرخه نخستین با دمای 95 درجه سلسیوس برای 4 دقیقه، در پی آن دمای 94 درجه سلسیوس برای 1 دقیقه، دمای 53 درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای 1 دقیقه و دمای طویل شدن 72 درجه سلسیوس برای 1 دقیقه بود که در پایان یک چرخه اضافی دمای 72 درجه سلسیوس برای 10 دقیقه نیز انجام شد. یادآور می‌شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم‌پوشی شد. ابتدا 30 میکرولیتر آب دیونیزه استریل را داخل تیوب 0/2 میلی‌لیتری ریخته سپس لوپ مستقیم استریل شده در شعله را به کلنی تماس داده و به داخل آب انتقال داده، سپس به‌مدت 5 تا 10 دقیقه در آب جوش جوشانده شد تا DNA باکتری در محلول آزاد شود. با فراهم نمودن سایر اجزاء PCR تنها 10 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی DNA به آن انتقال داده شد. نوارهای پدیدارشده (نزدیک 1500 جفت باز) پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز و اطمینان از تکثیر باند موردنظر بقیه DNA تکثیرشده از قطعه رمز کننده 16S rRNA جهت توالی‌یابی مورداستفاده قرار گرفت. پس از توالی‌یابی نمونه‌ها، توالی‌های موردنظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI[2]، BLAST-n[3] شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها اقدام شد. همچنین برخی تست‌های بیوشیمیایی از قبیل هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، احیای نیترات، اکسیداز، اوره‌آز، تولید سولفید هیدروژن، ایندول، سیترات، آرژینین، فلورسنت، تحرک و همچنین برخی از قندها و آمینواسیدها انجام گرفت (شاد و همکاران 2001).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها از قبیل آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشدی گیاه

نتایج نشان داد که کاربرد 15 جدایه (S5-5، S5-9، S6-6، S10-3، S11-2، S12-3، S14-1، S14-3، S15-1، S16-3، S17-4، S19-1، S19-2، S20-7 و S21-1) جداسازی شده از محیط نیمه‌انتخابی الکساندروف (Liu et al., 2006) به‌همراه سویه P. putida P13 با آن‌که روی شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر کل، غلظت و مقدار پتاسیم ریشه، همچنین غلظت و مقدار فسفر اندام هوایی اثر معنی‌داری نداشتند اما بر ارتفاع پایان‌دوره گیاه، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک کل، غلظت و مقدار پتاسیم اندام هوایی و همچنین غلظت و مقدار فسفر ریشه گوجه‌فرنگی اثر معنی‌دار داشتند (جدول 2 و 4). اما باید ذکر کرد با آنکه اثر این سویه‌ها بر وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین غلظت و

[2] National Center for Biotechnological Information

[3] Basic local alignment search tool (for nucleotide)

مقدار پتاسیم ریشه معنی‌دار نبود ولی برخی از آن‌ها نسبت به شاهد باعث افزایش پارامترهای فوق شدند.

جدول 1- آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها.

نام آغازگر	مشخصات آغازگر	دمای اتصال
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Tm : 53
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	

جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر ارتفاع، شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، وزن تر و خشک کل گیاه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع	شاخص کلروفیل	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن تر کل گیاه	وزن خشک کل گیاه
		میانگین مربعات							
جدایه باکتریایی	16	14/29*	3/62 ns	8/89 ns	0/48 ns	10/80*	0/09*	9/50 ns	0/71**
خطا	34	6/75	2/80	13/72	0/34	6/42	0/05	21/38	0/44
ضریب تغییرات (%)		7/1	16	11	13	15/6	32	3/6	8/6

مقایسه میانگین ارتفاع گیاه نشان می‌دهد که بیشترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار S21-1 (48/08cm) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 16/56 درصد افزایش نشان داد، همچنین کمترین ارتفاع پایان‌دوره مربوط به تیمار S16-3 (39/17cm) بود (جدول 3).

مقایسه میانگین کلروفیل گیاه نشان می‌دهد که بیشترین کلروفیل مربوط به تیمار S14-3 (13/05) است که نسبت به شاهد بدون باکتری 14/46 درصد افزایش نشان داد، و با تیمار S15-1 (9/68)، S19-1 (9/42) و S5-9 (9/21) تفاوت معنی‌داری نشان داد. کمترین کلروفیل مربوط به تیمار S5-9 (9/21) بود، که با تیمار S14-3 (13/05) تفاوت معنی‌داری دارد (جدول 3). هرچند هدف اصلی این مقاله بررسی تلقیح باکتری‌های فوق بر تغذیه پتاسیمی گیاه بود به‌همین خاطر نیتروژن در بافت گیاهی اندازه‌گیری نشد اما در مطالعات دیگر به تأثیر تلقیح میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه و بهبود شاخص کلروفیال اشاره داشته‌اند. به‌عنوان نمونه احتشامی (1386) عنوان کرد که تلقیح بذر ذرت با *سودوموناس* و قارچ میکوریز باعث افزایش میزان سبزینه گیاه می‌گردد. اگامبردیوا (2007) در بررسی خود بر ذرت تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد از جمله *سودوموناس* و *آزوسپیریلوم* بیان داشت که این ریزسازواره‌ها باعث افزایش جذب نیتروژن در ذرت شده‌اند و ازآنجایی‌که نیتروژن باعث افزایش سبزینگی برگ می‌شود، به‌نظر می‌رسد تلقیح گیاه با این باکتری‌ها باعث افزایش سبزینگی گیاه خواهد شد. دورسان و همکاران (2010) طی محلول‌پاشی سویه‌های مختلف باکتری *باسیلوس* روی گیاهانی مثل خیار و گوجه، شاهد افزایش میزان جذب نیتروژن، منیزیم و منگنز در گیاه بودند که در راستای آن میزان سبزینگی برگ هم افزایش یافت.

جدول 3- مقایسه میانگین اثر باکتری‌ها بر ارتفاع، شاخص کلروفیل، وزن تر و خشک ریشه و وزن خشک کل گیاه.*

پارامترها	ارتفاع گیاه (cm plant^{-1})	شاخص کلروفیل	وزن تر ریشه (g pot^{-1})	وزن خشک ریشه (g pot^{-1})	وزن خشک کل (g pot^{-1})
S5-5	41/3 bcd	10/4 ab	17/5 abc	0/73 abc	5/3 abc
S5-9	44/3 abc	9/2 b	15/3 c	0/4 c	4/8 c
S6-6	41/8 bcd	10/8 ab	17/1 bc	1 ab	6/1 ab
S10-3	46/3 ab	10/6 ab	22/3 a	0/63 bc	6 ab
S11-2	43/5 abcd	12/2 ab	17/5 abc	0/84 abc	5/3 abc
S12-3	41/7 bcd	10/4 ab	17/8 abc	1/1 ab	6/2 a
S14-1	41/3 bcd	11/1 ab	16/2 c	0/6 bc	5/6 abc
S14-3	40/6 cd	13/05 a	17/4 abc	0/89 ab	6/1 ab
S15-1	42 bcd	9/7 b	17/3 bc	0/77 abc	5bc
S16-3	39/2 d	12/1 ab	19/7 abc	0/67 abc	5/6 abc
S17-4	41/7 bcd	10/ 9 ab	18/2 abc	0/8 abc	5/ 4 abc
S19-1	44/ 7 abc	9/4 b	19/4 abc	0/98 ab	6/4 a
S19-2	41/6 bcd	9/9 ab	18/2 abc	0/84 abc	5 bc
S20-7	42/7 bcd	12/ 5 ab	16/3 c	0/68 abc	5/5 abc
S21-2	48 a	10/6 ab	16/3 c	1/1 a	6/2 a
P13	42/ 4 bcd	10/2 ab	21/6 ab	0/79 abc	6/2 a
Control	41/3 bcd	11/4 abc	16/5 c	0/72 abc	5/6 abc

* در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان از نظر آماری در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

مقایسه میانگین وزن تر و خشک ریشه نشان می‌دهد که بیشترین مقدار وزن تر ریشه مربوط به تیمار S10-3 (22/31 g) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 34/84 درصد افزایش نشان داد. همچنین بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به تیمار S21-1 (1/11 g) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 53/94 درصد افزایش نشان دادند. تیمار S5-9 کمترین وزن تر و خشک ریشه را به‌خود اختصاص داد (جدول 3). شنگ (2005) نشان داد که تلقیح باکتری Bacillus edaphicus که یک باکتری آزادکننده پتاسیم است منجر به افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی به‌طور معنی‌داری شده است. همچنین این محقق عنوان کرد که تلقیح گیاهان کتان و شلغم با سویه NBT باکتری B. edaphicus و افزودن کانی ایلایت به خاک، میزان پتاسیم در این دو گیاه را به‌ترتیب 30 و 26 درصد افزایش داد. طی این تلقیح رشد ریشه و ساقه و غلظت N و P نیز افزایش یافت.

مقایسه میانگین‌های وزن خشک کل گیاه نشان می‌دهد که بیشترین وزن خشک کل مربوط به سویه S19-1 (6/35 g) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 13/39 درصد افزایش نشان داد و کمترین وزن نیز مربوط به تیمار S5-9 بود (جدول 3). ساگمارن و جانارتام (2007) باکتری‌های آزادکننده پتاسیم را از خاک جدا کرده و تأثیر آن‌ها بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار موجود در خاک و همچنین رشد گیاه بادام‌زمینی موردمطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که باکتری B. mucilaginosus MCRCP1 توانایی بالایی در آزادسازی پتاسیم از میکای مسکویت

داشت. همچنین وزن خشک ریشه، اندام هوائی و درصد روغن بر اثر این تلقیح به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

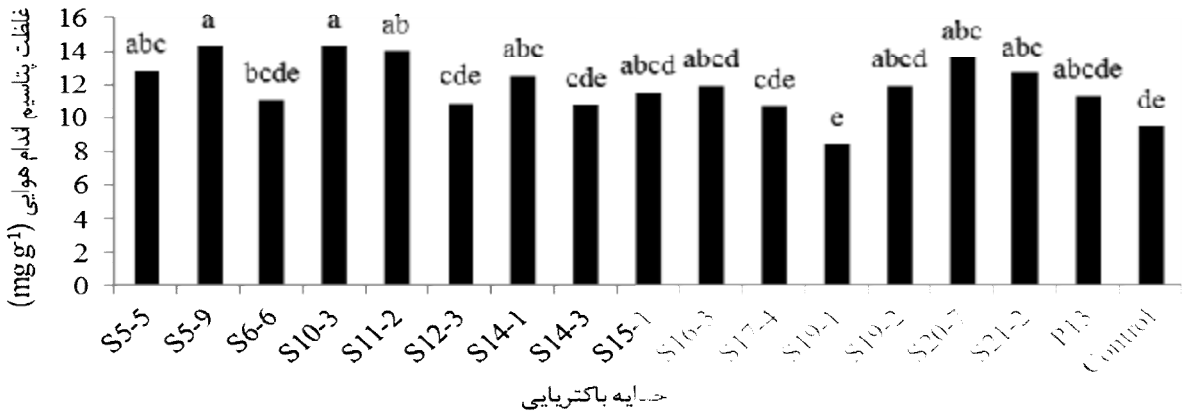
غلظت و مقدار عناصر پتاسیم و فسفر در بافت گیاهی

تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مورد آزمایش بر غلظت پتاسیم اندام هوایی در سطح احتمال 1% درصد معنی‌دار شد (جدول 4). مقایسه میانگین‌های غلظت پتاسیم اندام هوایی شکل 1 نشان می‌دهد که غلظت پتاسیم اندام هوایی برای دو تیمار S5-9 و S10-3 با میانگین 14/31 mg g^{-1} بالاترین مقدار هست که این دو تیمار باعث افزایش غلظت پتاسیم اندام هوایی به‌میزان 50/69% نسبت به شاهد شده‌اند. و تیمار S19-1 با میانگین 8/4 mg g^{-1} کمترین مقدار را داشت.

جدول 4- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر غلظت و مقدار پتاسیم و فسفر بافت گیاهی.

		میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	غلظت پتاسیم بخش هوایی	غلظت پتاسیم ریشه	مقدار پتاسیم بخش هوایی	مقدار پتاسیم ریشه	غلظت فسفر بخش هوایی	غلظت فسفر ریشه	مقدار فسفر بخش هوایی	مقدار فسفر ریشه
جدایه باکتریایی	16	0/08**	0/008 ns	220/1*	2/79ns	0/001 ns	0/03*	2/85 ns	3/42**
خطا	34	0/024	0/006	90/54	1/712	0/001	0/014	1/588	0/83
ضریب تغییرات (%)		17	18	20	38	14/5	31	15	37

*و ** به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطوح احتمال 5 و 1 درصد می‌باشند و ns یعنی تفاوت معنی‌دار نیست.

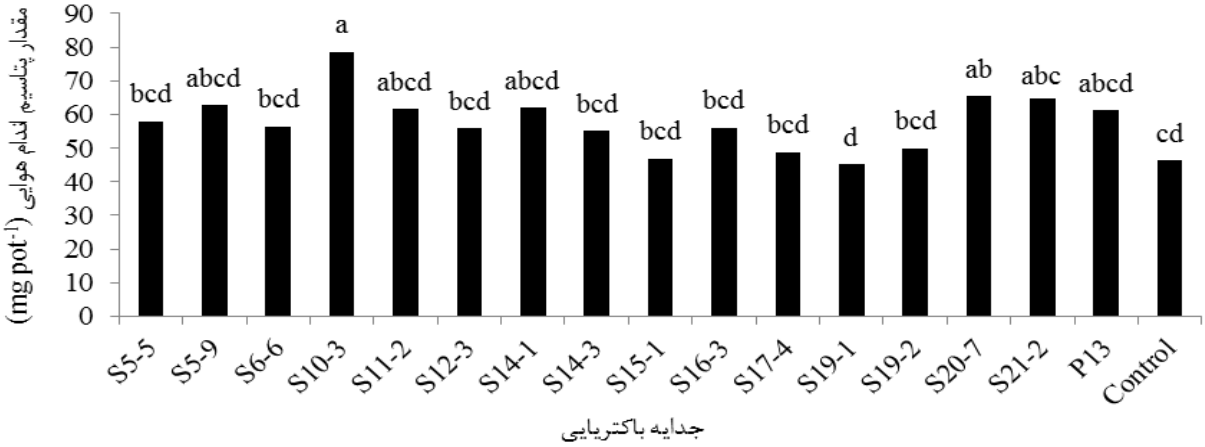


شکل 1- تأثیر باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بر غلظت پتاسیم بخش هوایی گوجه‌فرنگی.

مقدار پتاسیم اندام هوایی در سطح 5% معنی‌دار شد (جدول 4). مقایسه میانگین‌های مقدار پتاسیم اندام هوایی نشان می‌دهد مقدار پتاسیم اندام هوایی برای تیمار S10-3 با میانگین 78/68 mg pot^{-1} بیشترین بوده که این تیمار نسبت به شاهد بدون باکتری 70 درصد افزایش داشت و تیمار S19-1 با میانگین 45/28 mg pot^{-1} کمترین مقدار را به‌خود اختصاص داد (شکل 2). نتایج به‌دست‌آمده نشان

می‌دهد که تلقیح این جدایه‌ها به بستر شنی حاوی کانی میکا به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت و مقدار پتاسیم اندام هوایی در گیاه گوجه‌فرنگی شد. در آزمایش‌ها درون شیشه‌ای که در محیط الکساندروف و در حضور کانی موسکویت انجام گرفت باکتری‌های مورداستفاده در این آزمایش در بهترین حالت 1/6 برابر نسبت به شاهد بدون تلقیح میکروبی آزادسازی پتاسیم داشتند (اطلاعات آورده نشده است) و استفاده آن‌ها در کشت با گیاه نیز باعث بهبود تغذیه پتاسیمی گیاه شد. این افزایش پتاسیم، در اثر تلقیح میکروارگانیسم‌های مختلف توسط محققان مختلفی گزارش‌شده است (بدر 2006؛ دردی‌پور و همکاران 1389). برخی از محققان تولید همزمان اسید آلی و پلی‌ساکارید از باکتری‌های آزادکننده پتاسیم را از عوامل انحلال کانی میکا دانستند. پلی‌ساکارید تولیدشده توسط باکتری‌ها قادر است تا مقدار زیادی از اسیدهای آلی را به‌خود جذب نماید و متصل شدن پلی‌ساکارید در این وضعیت به کانی‌ها باعث ایجاد ناحیه‌ای با غلظت بالای اسیدهای آلی در نزدیکی کانی شده و به انحلال آن کمک می‌نماید. همچنین پلی‌ساکاریدها قادر به جذب سطحی SiO_2 می‌باشند که این موضوع تعادل بین فاز جامد و محلول را تحت تأثیر قرار داده و منجر به انحلال بیشتر SiO_2 و K^+ می‌شود (لیو و همکاران 2006). محققان گزارش کردند که پلی ساکاریدها (مثل اسیدهای اورنیک) مواد لعابی و لزجی هستند که دارای عوامل کربوکسیلی (COOH) و فنلی (C_6H_6O) می‌باشند که فنل و کربوکسیل موجود در پلی‌ساکاریدها با عناصر موجود در سیلیکات‌ها واکنش داده و تشکیل پیوندهای پیچیده‌ای می‌دهند که منجر به آزاد شدن عناصر از شبکه کریستالی شده و باعث انتقال آن‌ها به داخل محلول خاک می‌شوند (ولچ و همکاران، 1999). شاید این مواد لزج تولیدشده توسط سویه‌های نام‌برده، مواد پلی‌ساکاریدی باشند که توسط این سویه‌ها تولید و ترشح‌شده و در آزادسازی پتاسیم مؤثرواقع شده است.

شنگ (2005) نشان داد که تلقیح گیاهان کتان و شلغم با سویه NBT باکتری B. edaphicus و افزودن کانی ایلایت به خاک، میزان پتاسیم در این دو گیاه را به‌ترتیب 30 و 26 درصد افزایش داد.

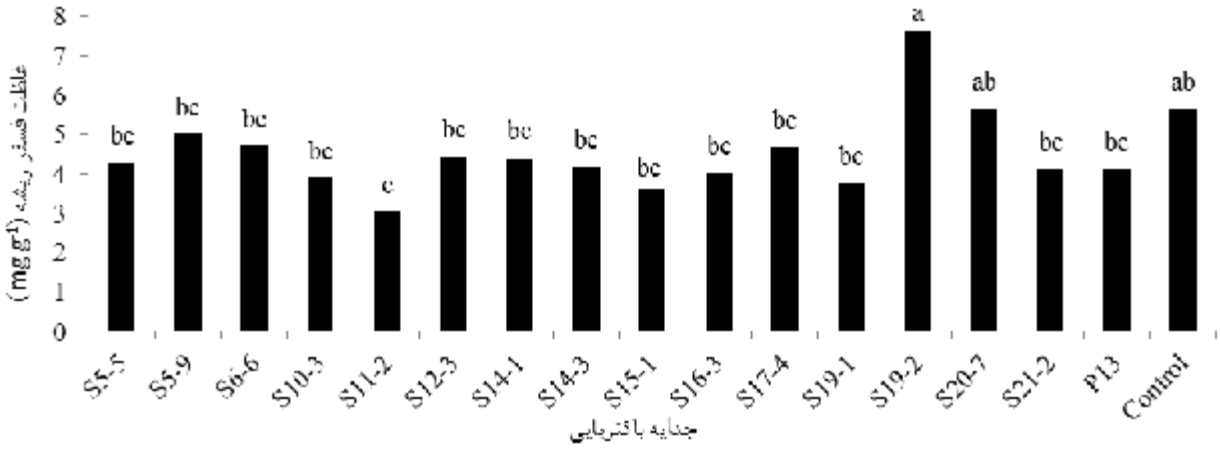


شکل 2- تأثیر باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بر مقدار پتاسیم بخش هوایی گوجه‌فرنگی.

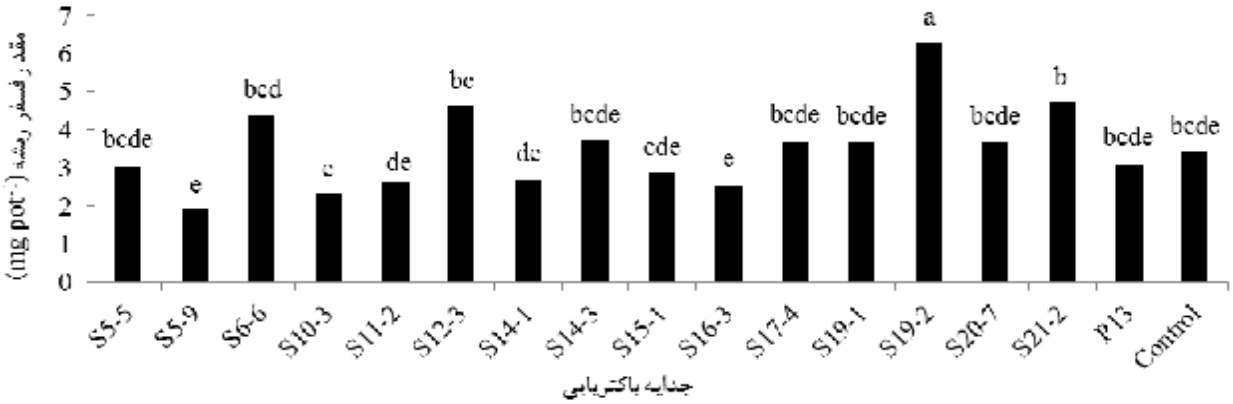
مقایسه میانگین‌های غلظت و مقدار فسفر ریشه (شکل 3 و 4) نشان می‌دهد که بیشترین غلظت فسفر ریشه مربوط به تیمار S19-2 (7/6 mg g^{-1}) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 34/45 درصد افزایش

نشان داد. از طرفی کمترین غلظت فسفر ریشه مربوط به تیمار S11-2 (3/05 mg g^{-1}) بود. همچنین بیشترین مقدار فسفر ریشه مربوط به تیمار S19-2 (6/29 mg pot^{-1}) بود که نسبت به شاهد بدون باکتری 82/92 درصد افزایش نشان داد و با سایر تیمارهای موجود در پژوهش اختلاف معنی‌دار دارد. از طرفی کمترین مقدار فسفر ریشه مربوط به تیمار S5-9 (1/97 mg pot^{-1}) بود.

جعفرزاده ذغالچالی و همکاران (1390) افزایش میزان غلظت فسفر در برگ و بذر برنج در تیمارهای تلقیح شده با باکتری *سودوموناس* سویه 169 را گزارش نمودند و بیش‌ترین افزایش جذب فسفر نسبت به شاهد را به‌میزان 4/7 و 9/4 درصد به‌ترتیب در برگ و بذر برنج مشاهده کردند.



شکل 3- تأثیر باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بر غلظت فسفر ریشه گیاه.



شکل 4- تأثیر باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بر مقدار فسفر ریشه گیاه.

شناسایی باکتری‌های کارآمد

نتایج شناسایی مولکولی (16S rRNA) نشان داد که 5 جدایه برتر (S6-6، S10-3، S14-3، S19-1 و S21-1) بیشترین همسانی را با جنس *سودوموناس* دارند. جهت تایید نهایی گونه آن‌ها اقدام به انجام برخی از تست‌های بیوشیمیایی شد که در جدول 5 به آن‌ها اشاره شده است.

نتایج مشاهدات فنوتیپی و آزمایش‌ها بیوشیمیایی نشان داد که سویه S10-3 و S19-1 تشابه بیشتری به هم دارند و تفاوت آن‌ها همان‌طور که در جدول 6 قابل‌مشاهده است تنها در تست نیترات هست. اما در

این میان جدایه‌های S14-3 و S21-1 تشابه بیشتری را با هم داشتند اما در تست‌های سیترات و ویژگی فلورسنتی متفاوت از هم نشان دادند. با توجه به نتایج شناسایی مولکولی، 5 جدایه باکتریایی متعلق به جنس Pseudomonas هستند.

گرچه هنوز 100% با قاطعیت نمی‌توان عنوان نمود ولیکن به‌نظر می‌رسد جدایه S14-3 و جدایه S19-1 به‌ترتیب تشابه بیشتری با گونه P. koreensis و P. vancouverensis دارد. به این صورت نام‌گذاری نهایی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم P. koreensis S14-3 و P. vancouverensis S19-1 خواهد بود. در مطالعات جداسازی و شناسایی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم تقریباً با طیف وسیعی از ریزجانداران مواجه هستیم به‌صورتی‌که شنگ (2005) بیان کرد که باکتری‌های Pseudomonas، Burkholderia، Acidothiobacillus ferrooxidans، Bacillus mucilaginosus، Bacillus edaphicus، Bacillus circulans و Paenibacillus sp. توانایی رهاسازی پتاسیم از کانی‌های حاوی پتاسیم را دارند.

کشاورز زرجانی و همکاران (1392) در مطالعه خود اقدام به جداسازی و شناسایی شش ایزوله باکتری آزادکننده پتاسیم از خاک‌های آذربایجان نمودند. آن‌ها توانایی این ایزوله‌ها را در رهاسازی پتاسیم از سه تیمار بیوتیت، موسکویت و خاک اسیدشویی شده بعد از 5 روز انکوباسیون در دمای 28 درجه سلسیوس بررسی کردند. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی نشان داد که 5 ایزوله متعلق به گونه Bacillus megaterium بودند و تنها یک ایزوله از جنس Arthrobacter بود. گرچه میزان رهاسازی پتاسیم در جنس Arthrobacter در مقایسه با 5 ایزوله دیگر کمتر بود، اما همه آن‌ها در مقایسه با شاهد میزان بیشتری پتاسیم آزاد کرده بودند. در مجموع باکتری‌ها قادر به رهاسازی پتاسیم بیشتری از بیوتیت در مقایسه با موسکویت و خاک اسیدشویی شده بودند.

جدول 5- برخی از خصوصیات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده مرتبط با پنج جدایه باکتریایی برتر.

نام جدایه	اکسیداز	نیترات	سیترات	اوره	نشاسته	ژلاتین	گلوکز	گلیسرول	لاکتوز	ساکاروز	سوربیتول	مانیتول	فلورسنت	تریپتوفان	ایندول	آرژنین	لیزین	پرولین	سولفید
S6-6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S10-3	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
S14-3	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S19-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
S21-1	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

* علامت مثبت و منفی به‌ترتیب نشانه وجود یا عدم وجود ویژگی مورد آزمایش، یا توانایی استفاده یا عدم استفاده از سوبستراهای مورد آزمایش است.

لی (1994) ایزوله‌های مختلفی از باکتری‌ها را از خاک، سنگ و نمونه‌های معدنی جدا کرد. در بین باکتری‌های جدا شده ایزوله MCRCP1 به‌طور معنی‌داری قادر به آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار بود که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تشخیص داده شد که این ایزوله Bacillus mucilaginosus بود. ساگمارن و جانارتانم (2007) باکتری‌های آزادکننده پتاسیم را از خاک، سنگ‌ها و نمونه‌های معدنی جداسازی کردند و تأثیر این باکتری‌ها را در آزادسازی پتاسیم از ارتوکلاز، میکروکلین و میکای مسکوویت مطالعه کردند. در بین ایزوله‌ها Bacillus mucilaginosus بیشترین آزادسازی پتاسیم را داشت و در بین کانی‌های پتاسیم‌دار بیشترین مقدار پتاسیم آزادشده مربوط به میکای مسکویت بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد در اثر تلقیح جدایه های باکتریایی به بستر حاوی کانی مسکویت، ارتفاع گیاه در پایان‌دوره، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک کل، غلظت و مقدار پتاسیم اندام هوایی و غلظت و مقدار فسفر ریشه گیاه گوجه‌فرنگی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد بدون باکتری داشتند. به‌طوری‌که وزن خشک، غلظت و مقدار پتاسیم اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه در سویه S10-3 و همچنین ارتفاع گیاه، وزن خشک و مقدار فسفر ریشه در سویه S21-1 نسبت به بقیه سویه‌ها بیشتر بود. همچنین بیشترین میانگین به‌دست‌آمده برای مقدار پتاسیم جذب‌شده در میان ایزوله‌ها مربوط به S10-3 و S21-1 بود که به‌ترتیب نسبت به شاهد افزایش 70 و 40 درصدی را باعث شدند. نتایج این آزمایش آثار مثبت تلقیح برخی از جدایه‌های منتخب در تغذیه پتاسیمی گیاه را نشان می‌دهد با توجه به تحقیقات کمی که در این زمینه صورت گرفته است، آزمودن این جدایه‌ها با محصولات دیگر و در شرایط خاک‌های با پتاسیم قابل‌استفاده متفاوت می‌تواند موردتوجه قرار گیرد تا کارآیی این جدایه‌ها مشخص شود. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی حاکی از آن بود که جدایه‌های برتر در این آزمایش متعلق به جنس *سودوموناس* هستند هر چند در مطالعات اخیر کشور به جداسازی باکتری‌های جنس *باسیلوس* اشاره شده بود.

منابع مورداستفاده

احتشامی، س‌مر. 1386. تأثیر کودهای زیستی فسفاته بر شاخص‌های کمی و کیفی ذرت دانه‌ای تحت شرایط تنش کم آبی. رساله دکترای تخصصی، دانشکده کشاورزی، دانشکده تربیت مدرس.

جعفرزاده ذغالچی، ح، فلاح نصرت‌آباد ع، رجبی س، محمدزاده نوری ج. 1390. بررسی تاثیر باکتری محرک رشد (PGPR) با توانایی حلالیت فسفات بر کاهش مصرف کود شیمیایی فسفره در برنج (Oriza sativa L.). دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران. دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

دردی‌پور ا، فرشادی‌راد ا، حسین ارزانش م، 1389. تأثیر Azospirillum lipoferum و Azotobacter chroococum بر آزادسازی پتاسیم خاک در کشت گلدانی سویا. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، جلد 2، شماره 4، صفحه‌های 592 تا 599.

طباطبایی، ج. 1388. اطول تغذیه معدنی گیاهان. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تبریز.

کشاورز زرجانی ج، علی‌اصغرزاد ن، اوستان ش، 1392. تأثیر شش سویه از باکتریهای آزادکننده پتاسیم بر رشد و افزایش جذب پتاسیم در گیاه گوجه‌فرنگی. نشریه دانش آب و خاک، جلد 23، شماره 2 ، صفحه‌های 245 تا 255.

Aleksandrov VG, Blagodyr RN, Iiiev IP, 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev) 29: 111-114.

Anonymous, 2006. Biofertilizer Manual, FNCA Biofertilizer Project Group. Japan Atomic Industrial Forum. Japan.

Badr MA, 2006. Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. Journal of Applied Sciences Research 2: 1191-1198.

Dursun A, Kinci ME, Donmez MF, 2010. Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (Lycopersicon esculentum L.) and cucumber (Cucumis sativus L.). Pakistan Journal of Botany 42(5): 3349-3356.

Egamberdiyeva D, 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. Applied Soil Ecology 36: 184-189.

Goldstein AH, 1994. Involvement of the quino protein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogeneous mineral phosphates by gram negative bacteria. Pp. 197-203. In: Torriani-Gorini A, Yagil E and Silver S, (eds). Phosphate in Micro-Organisms: Cellular and Molecular Biology. Washington DC, ASM Press.

Hoagland, DR, Arnon DI, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347: 1-32.

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

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

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

Li YF, 1994. The characteristics and function of silicate dissolving bacteria fertilizer. Soil and Fertilizer 2: 48-49.

Olsen SR, Sommers LE, 1982. Phosphorus In: Page, AL, Miller R.H, Keeney, DR. (Eds), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy, vol. 9. Madison, Wisconsin, pp. 403–427.

Sarikhani1 MR, Ebrahimi M, Oustan SH, Aliagharzad N, 2013. Application of Potassium Solubilizing Bacteria a Promising Approach in Sustainable Agriculture Increasing of potassium releasing from k-containing minerals in presence of insoluble phosphate. International Conference on Environmental Crisis and its Solutions. Islamic Azad University, Khouzestan, Kish Islan, Iran. Pp: 695-700.

Schaad NW, Jones JB, chun W, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. The American phytopathological society, Minnesota USA, P: 363.

Sheng XF, Huang WY, 2002. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria scientia. Agricultura Sinica 35: 673-677.

Sheng XF, 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of Bacillus edaphicus. Soil Biology and Biochemistry 37: 1918–1922.

Sparks DL, Huang PM, 1985. Physical chemistry of soil potassium. Pp. 201–276. In: Munson RD, (Ed). Potassium in Agriculture. American Society of Agronomy, Madison, Wisc.

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

Waling I, Vark VJ, Houba G, Vanderlee JJ, 1989. Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7, Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University, The Netherlands.

Welch SA, Barker WW and Banfield JF, 1999. Microbial extra cellular polysaccharides and plagioclase dissolution. Geochimica et Cosmochimica Acta 63: 1405-1419.