نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۲ شماره ۱ صفحه‌های ۵۳ تا ۷۰/ سال ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط تغذیه‌ای و محیطی برای آزادسازی پتاسیم از ایلایت توسط Aspergillus niger و Pseudomonas fluorescens

ساناز اشرفی سعیدلو[۱]، میرحسن رسولی صدقیانی[۲]، عباس صمدی[۲*]، ابراهیم سپهر[۲]، محسن برین[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۲

۱-دانشجوی دکتری گروه علـــوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- استاد گروه علـــوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- استادیار گروه علـــوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه، پست الکترونیکی: a.samadi@urmia.ac.ir

چکیده

توسعه سریع کشاورزی و کاربرد نامتعادل کودهای شیمیایی منجر به کاهش سطح پتاسیم قابل‌جذب در خاک شده است. لذا شناسایی سویه‌های میکروبی با توان آزادسازی پتاسیم، بهینه‌سازی شرایط رشد آن‌ها و بهره‌گیری از توانایی‌شان در آزادسازی اشکال غیرتبادلی K در خاک، می‌تواند منابع موجود ما را حفظ نموده و از خطرات آلودگی محیط‌زیست که بر اثر مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی ایجاد می‌شوند، جلوگیری نماید. به این منظور این پژوهش با هدف ارزیابی اثر منابع مختلف کربن بر آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Aspergillus niger* و مدل‌سازی اثر سطوح مختلف متغیرهای زمان انکوباسیون، pH و منبع کربن بر آزادسازی پتاسیم با استفاده از طرح مرکب مرکزی انجام شد. در مرحله‌ی اول، بر مبنای طرح پلاکت – برمن، تعداد ۱۲ آزمایش با ترکیب سطوح مختلف تعریف شده و تأثیر منابع مختلف کربن شامل گلوکز، ساکارز و فروکتوز در دو سطح ۱+ (۱۰ گرم در لیتر) و ۱- (۵ گرم در لیتر) بر آزادسازی پتاسیم موجود در ایلایت بررسی شد. در مرحله دوم، پس از گزینش منبع کربن مهم و تأثیرگذار، دامنه‌های متفاوتی از متغیرهای مستقل شامل زمان انکوباسیون، pH و منبع کربن در نظر گرفته شده و بر اساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل، تعداد ۲۰ آزمایش با ۵ تکرار در سطح مرکزی طراحی شد. نتایج نشان داد تأثیر منابع کربن بر آزادسازی K توسط باکتری و قارچ معنادار نبود و لذا هر یک از آن‌ها می‌تواند به‌عنوان جایگزین یکدیگر در محیط‌کشت استفاده شود. بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی، pH اثر مثبت و افزاینده‌ای بر افزایش آزادسازی پتاسیم محلول داشت (P<۰/۰۰۰۱)؛ به‌طوری‌که بیشترین آزادسازی پتاسیم توسط باکتری و قارچ به‌ترتیب برابر با ۱۰۹/۸ و ۱۷۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، در سطوح مرکزی زمان و منبع کربن، و pH = ۱۰/٤ مشاهده شد. بر اساس مقدار ضریب تبیین مدل طرح مرکب مرکزی، به‌ترتیب ۹۱ و ۸۷/۸ درصد از تغییرات پتاسیم محلول در حضور باکتری و قارچ توسط این مدل قابل تبیین بود. باکتری در زمان‌های اولیه انکوباسیون و مقادیر متوسط منبع کربن، پتاسیم بیشتری را آزاد نمود، درحالی‌که با افزایش زمان و مقدار منبع کربن، توانایی قارچ در آزادسازی K افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، ایلایت، میکروارگانیسم‌های آزادکننده پتاسیم، منبع کربن

Optimizing Nutritional and Culture Medium Conditions for Potassium Release from Illite by Aspergillus niger and Pseudomonas fluorescens

S Ashrafi-Saeidlou 1, MH Rasouli-sadaghiani 2, A Samadi* 2, E Sepehr 2, M Barin 3

Received: 2019-05-26 Accepted: 2020-12-02

1Ph.D. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2Prof. Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3Assist. Prof. Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
* Corresponding Author E-mail: a.samadi@urmia.ac.ir

Abstract

The rapid development of agriculture and imbalanced application of chemical fertilizers have reduced the available potassium (K) level in soil. Therefore, identification of microbial strains with capability of potassium solubilization, optimizing their growth conditions and utilizing their ability in releasing of non-exchangeable forms in soil, can conserve our existing resources and prevent environmental contamination hazards caused by heavy application of chemical fertilizers. For this reason, the present research was carried out to evaluate the effect of different carbon sources on K release by *Pseudomonas fluorescens* and *Aspergillus niger* and modeling the effects of incubation time, pH and different amounts of carbon source on K release using central composite design. At the first step, 12 experiments were defined with a combination of different levels, and the effects of different carbon sources including glucose, sucrose and fructose at two levels of +1 (10 g L^{-1}) and -1 (5 g L^{-1}) on potassium release from illite was studied. After selection of effective carbon source, different ranges of independent variables including incubation time, pH and carbon source were considered and 20 experiments with 5 replications at central level has been made based on the coded values of them. Results showed that there is no difference between carbon sources, which were used at the first step of experiment, so each of them can be used as alternatives to each other in culture medium. According to the statistical analysis results of central composite design, pH has a positive impact on increasing the potassium release (p<0.0001). Therefore, the maximum potassium release by bacteria and fungus, 109.8 and 170.3 mg L^{-1}respectively, observed at central levels of incubation time and carbon source and pH = 10.4. Based on determination coefficient of central composite design, 91 and 87.8 percent of soluble potassium changes in the presence of bacteria and fungus can be explained by this model, respectively. The bacteria released the highest amount of potassium in the initial incubation time and the mean values of the carbon source, while the fungus ability in K releasing improved by increasing incubation time and amount of carbon source.

Keywords: Carbon source, Illite, Optimization, Potassium releasing microorganisms

مقدمه

خاک، بستری برای تولید محصول است و حمایت مکانیکی، آب و عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاه را فراهم می‌کند. تغذیه جمعیت رو به رشد جهان، که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ به ۹ میلیارد نفر برسد، انتخاب روش‌های کارآمد و پایدار تولید، پاسخ به نگرانی‌های افزاینده در زمینه مدیریت منابع طبیعی و سازگاری با تغییرات اقلیمی و شرایط خشکسالی در چند منطقه در حال توسعه (به‌ویژه در اروپا، آسیا و آفریقا)، برخی از چالش‌های مهمی هستند

که کشاورزی در قرن ۲۱ با آن روبرو است (هوآب و همکاران ۲۰۱۲).

برای تغذیه جمعیت در حال افزایش جهان، کشاورزی باید متراکم و پایدار بوده و تولیدات کشاورزی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یابد. با توسعه کشاورزی متراکم و معرفی ارقام با عملکرد بالا و هیبریدها در طول انقلاب سبز، عناصر غذایی پرمصرف خاک از جمله پتاسیم با سرعت بالایی تخلیه می‌شود؛ به‌طوری‌که بسیاری از خاک‌های کشاورزی فاقد مقادیر کافی از یک یا چند عنصر غذایی ضروری برای گیاه هستند و کمبود نیتروژن، فسفر و پتاسیم قابل‌دسترس گیاه، فاکتورهای اصلی محدودکننده برای تولید مواد غذایی در بسیاری از خاک‌های کشاورزی محسوب می‌گردند (زی و همکاران ۱۹۹۸، زورد و همکاران ۲۰۱٤). علاوه‌بر این، سطوح K قابل‌دسترس خاک به‌دلیل آبشویی، رواناب و فرسایش نیز کاهش یافته است (شنگ و هوآنگ ۲۰۰۲). در نتیجه، کمبود پتاسیم به یکی از محدودیت‌های عمده در تولید محصول تبدیل شده است (سیندهو و همکاران ۲۰۱٦). برای جلوگیری از این مشکل و به دست آوردن عملکردهای بالاتر، کشاورزان به‌طور افزاینده‌ای به منابع کودهای شیمیایی وابسته شده‌اند (گلیک ۲۰۱۲). علی‌رغم اینکه کودهای شیمیایی به رشد گیاه کمک می‌نمایند، تأثیری در بهبود خواص خاک ندارند و استفاده مداوم از آن‌ها اثرات مخربی بر محیط‌زیست دارد (ادسموی و کلاپر ۲۰۰۹).

پتاسیم سومین عنصر پرمصرف برای رشد و توسعه گیاه است که کمبود آن در گیاهان منجر به توسعه ضعیف ریشه‌ها، رشد آهسته، مقاومت کم در برابر بیماری‌ها، تأخیر در رسیدگی و کاهش تولید دانه و عملکرد می‌شود (راوات و همکاران ۲۰۱٦، برین و همکاران ۲۰۱۸). خاک‌ها دارای مقادیر متفاوتی از کانی‌های پتاسیم‌دار هستند که بخش اصلی ذخیره K را تشکیل می‌دهند. آلومینوسیلیکات‌های اولیه نظیر فلدسپار پتاسیمی، میکا، بیوتیت و موسکویت، فراوان‌ترین کانی‌های پتاسیم‌دار، ذخایر اصلی K در پوسته‌ی زمین محسوب می‌شوند. با این حال، آلومینوسیلیکات‌های ثانویه از قبیل میکای آبدار (ایلایت) که بر اثر هوادیدگی میکا ایجاد می‌گردند نیز، به‌عنوان منبع K عمل می‌کنند (برسچ و توماس ۱۹۸۵).

پتاسیم در خاک به چهار شکل وجود دارد. یون‌های K^+ موجود در محلول خاک، کاتیون‌های قابل تبادلی که توسط سطوح کانی‌های رسی و مواد آلی نگه‌داری می‌شوند، پتاسیم تثبیت شده توسط کانی‌های میکایی هوادیده، و پتاسیم موجود در ساختار کانی‌های اولیه‌ی پتاسیمی (رحم و سورنسن ۱۹۸۵). تمام اشکال پتاسیم در خاک با هم تعامل دارند. پتاسیم محلول، قابل‌جذب‌ترین شکل K است، اما بخش کوچکی از K کل خاک را تشکیل می‌دهد. این شکل از K، کلات، کمپلکس و یا زوج‌های یونی در خاک ایجاد نمی‌کند (راوات و همکاران ۲۰۱٦). گیاهان بیشترین مقدار پتاسیم مورد نیاز خود را بطور مستقیم از K محلول دریافت می‌کنند و از این طریق منجر به تخلیه سریع آن در خاک می‌شوند. پتاسیم تبادلی به‌عنوان بخشی که سطوح تبادلی را اشغال می‌نماید، تعریف می‌شود. K تبادلی شکل اصلی K قابل‌جذب در خاک است که معمولاً ۰/۱ تا ۲ درصد از K کل را تشکیل می‌دهد (اسچرودر ۱۹۷٤). مقدار K^+ نگه‌داری شده در سطوح تبادلی توسط کانی‌های رسی به فاکتورهای سینتیکی و ترمودینامیکی بستگی دارد (پارفیت ۱۹۹۲). K غیرتبادلی اغلب در بین لایه‌های کانی‌های رسی قرار دارد و برای تبادل با کاتیون‌های محلول خاک قابل‌جذب نیست. آزادسازی K غیرتبادلی به شکل تبادلی، زمانی اتفاق می‌افتد که سطوح K تبادلی

و محلول به‌دلیل جذب توسط گیاه و یا آبشویی و یا شاید از طریق افزایش فعالیت میکروبی کاهش یابد (چرچمن و همکاران ۲۰۰۰).

با توجه به اینکه بخش قابل توجهی از K موجود در خاک‌ها به‌شکل نامحلول است، لذا میکروارگانیسم‌های آزادکننده K، در آزادسازی K و تأمین شکل قابل‌دسترس برای گیاهان، نقش مهمی ایفا می‌کنند. باکتری‌ها و قارچ‌های مختلفی با قابلیت بالای آزادسازی K شناسایی شده‌اند. گونه‌های مختلف *Pisolithus*، *Cenococcum*، *Bacillus*، *Acidithiobacillus*، *Pseudomonas*، *Aspergillus* و *Clostridium* مقادیر بالایی از K موجود در کانی‌های مختلف را آزاد نموده و منجر به افزایش بهره‌وری بسیاری از گیاهان می‌شوند (لیو و همکاران ۲۰۱۲، مینا و همکاران ۲۰۱۵، اشرفی و همکاران ۲۰۱۶، ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸). این میکروارگانیسم‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین برای تضعیف پیوندهای شیمیایی کانی‌ها (هارلی و گیلکس ۲۰۰۰)، و نیز تولید مولکول‌های کلات‌کننده برای تخریب کانی، منجر به انحلال کانی‌ها می‌شوند (اوراز و همکاران ۲۰۰۷، لیان و همکاران ۲۰۰۸، اوراز و همکاران ۲۰۰۹). علاوه‌بر این، میکروارگانیسم‌ها (از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و پروتوزوئرها) از اسید کربونیک متشکل از دی اکسید کربن نیز برای حمله به سطوح کانی و افزایش هوادیدگی شیمیایی سنگ‌ها و کانی‌ها بهره می‌گیرند (پارک و همکاران ۲۰۰۹).

مطالعات نشان دادند که عوامل مختلفی از قبیل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، شرایط تهویه و دوره انکوباسیون در کارآیی آزادکننده‌های پتاسیم نقش دارند (وایل لاو ۲۰۰۰، پرادان و سوکلا ۲۰۰۵). پارمار و سیندهو (۲۰۱۳) آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های ریزوسفری را در شرایط تغذیه‌ای (استفاده از منابع متفاوت کربن و پتاسیم شامل گلوکز، گالاکتوز، زایلوز، کلرید پتاسیم و سولفات پتاسیم) و محیطی (دما و pHهای مختلف) مختلف بررسی نمودند. تلقیح ۲۰ جدایه باکتری در ۱۳۷ محیط کشت منجر به آزادسازی مقدار چشمگیری پتاسیم از میکا شد. بیشترین غلظت پتاسیم آزاد شده با جدایه‌های باکتریایی نیز مربوط به زمانی بود که pH نمونه‌ها بر روی ۷ تنظیم شده بود. اشرفی و همکاران (۲۰۱۷) اثر ریزجانداران آزادکننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار را بررسی کرده و گزارش نمودند که تلقیح میکروبی منجر به افزایش رهاسازی پتاسیم شد و پتاسیم محلول در نمونه‌های تلقیح‌یافته با *Bacillus* sp. و *Aspergillus niger* به‌ترتیب ۹۲/۳ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. بر این اساس، بهینه‌سازی بستر یکی از معیارهای مهم برای آزادسازی پتاسیم می‌باشد. ترکیب سطوح مختلف عوامل موثر بر رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها از روش‌های معمول برای تشخیص شرایط مناسب انح آزادسازی لال پتاسیم توسط آن‌ها است. در روش‌های معمول برای بررسی اثر عوامل مختلف بر شرایط رشد و قابلیت آزادسازی پتاسیم توسط میکروارگانیسم‌ها یک عامل تغییر داده شده و عوامل دیگر ثابت نگه‌داشته می‌شوند که این امر علاوه بر زمان‌بر بودن، پرهزینه نیز بوده و از سوی دیگر تضمینی برای تشخیص شرایط کاملاً بهینه برای فعالیت متابولیکی باکتری و قارچ ارائه نمی‌دهد (پاداماواتی ۲۰۱۵). در این ارتباط روش‌های آماری نظیر طرح پلاکت – برمن و روش پاسخ سطح، می‌توانند ابزارهای مفیدی جهت غربالگری و تشخیص شرایط بهینه‌ی کشت میکروارگانیسم‌ها برای نیل به حداکثر کارایی آن‌ها در انجام فعالیت‌های زیستی نظیر

آزادسازی پتاسیم محسوب شوند (سووتا و همکاران ۲۰۱٤).

در دهه‌ی اخیر، به‌دلیل توسعه سریع کشاورزی و کاربرد نامتعادل کودهای شیمیایی، سطح K قابل‌جذب در خاک کاهش یافته است. افزودن کودهای شیمیایی باعث آلودگی محیط‌زیست شده و تأثیرات مخرب فراوانی نظیر گرمایش جهانی، تغییر تنوع میکروبی خاک و غیره داشته است. به‌علاوه، این کودها دینامیک خاک-گیاه و توزیع میکروبی را تحت تأثیر قرار داده‌اند (مینا و همکاران ۲۰۱۳، موریا و همکاران ۲۰۱٤). لذا شناسایی سویه‌های میکروبی با قابلیت آزادسازی K و بهره‌گیری از توانایی آن‌ها در آزادسازی اشکال غیرتبادلی K در خاک، می‌تواند به‌سرعت منابع موجود ما را حفظ نموده و با عرضه مقادیر کافی عناصر غذایی، جلوگیری از آبشویی عناصر، بهبود کیفیت فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک، از خطرات آلودگی محیط‌زیست که توسط مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی ایجاد می‌شوند، جلوگیری نماید. به این منظور هدف از این پژوهش در وهله‌ی اول، ارزیابی اثر منابع مختلف کربن بر قابلیت آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Aspergillus niger* با استفاده از طرح پلاکت – برمن و شناسایی منبع تأثیرگذار کربن، و در وهله‌ی دوم، مدل‌سازی اثر سطوح مختلف متغیرهای منبع کربن، زمان انکوباسیون و pH بر آزادسازی پتاسیم با استفاده از طرح مرکب مرکزی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانیسم‌های آزادکننده پتاسیم

تعداد ٤۰ نمونه خاک از ریزوسفر گیاهان سیب-زمینی، چغندرقند و غلات از مزارع استان آذربایجان-غربی تهیه و جدایه‌های باکتریایی و قارچی خالص-سازی شدند. برای غربالگری و جداسازی جدایه‌های برتر قارچ‌ها و باکتری‌های آزادکننده پتاسیم، محیط کشت الکساندروف جامد (بررسی کیفی) و مایع (بررسی کمی) استفاده گردید (هو و همکاران ۲۰۰٦). سویه‌هایی که از هاله شفاف بزرگتر و شاخص انحلال بالاتر و نیز میزان پتاسیم آزاد شده بیشتری برخوردار بودند به‌عنوان سویه برتر انتخاب شدند (اومکار ۲۰۱۲، ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸).

تهیه زادمایه

باکتری و قارچ مورد استفاده، پس از جداسازی به‌ترتیب در محیط‌های کشت نوترینت آگار[1] و PDA[2] کشت شدند. ۲٤ ساعت پس از رشد و تکان داده شدن در دور RPM ۱۲۰، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر یک از زادمایه‌ها داخل ارلن‌های حاوی محیط‌های کشت الکساندروف (در مراحل اول و دوم آزمایش) افزوده شد. سپس ارلن‌ها در دما ۱±۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شده و هر روز به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور RPM ۱۲۰ شیک گردیدند. در زمان‌های مختلف تعیین شده، محتویات ارلن‌ها پس از سانتریفیوژ با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ٤۱) صاف شده و در عصاره‌های بدست آمده مقدار پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم-فتومتر قرائت شد (چاپمن و پرات ۱۹٦۲).

مدل‌سازی آزادسازی پتاسیم

برای مدل‌سازی و تعیین شرایط بهینه آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Aspergillus niger*، آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و اجرا شدند. در مرحله‌ی اول، بر مبنای طرح پلاکت – برمن، تعداد ۱۲ آزمایش با ترکیب سطوح مختلف تعریف شده و تأثیر منابع مختلف کربن شامل گلوکز،

[1] Nutrient agar
[2] Potato dextrose agar

ساکارز و فروکتوز در دو سطح ۱+ (۱۰ گرم در لیتر) و ۱- (۵ گرم در لیتر) بر آزادسازی پتاسیم موجود در ایلایت مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱) (پاداماوتی ۲۰۱۵).

جدول ۱- دامنه متغیرهای مدل پلاکت – برمن.

شماره آزمایش	منبع کربن		
	گلوکز	ساکاروز	فروکتوز
۱	-۱	-۱	-۱
۲	+۱	+۱	-۱
۳	+۱	-۱	+۱
٤	-۱	-۱	+۱
٥	-۱	+۱	-۱
٦	+۱	+۱	+۱
۷	-۱	+۱	+۱
۸	-۱	+۱	+۱
۹	-۱	-۱	-۱
۱۰	+۱	+۱	-۱
۱۱	+۱	-۱	-۱
۱۲	+۱	-۱	+۱

۱+ و ۱- به‌ترتیب نشان‌دهنده ۱۰ و ۵ گرم بر لیتر منابع کربن می‌باشند.

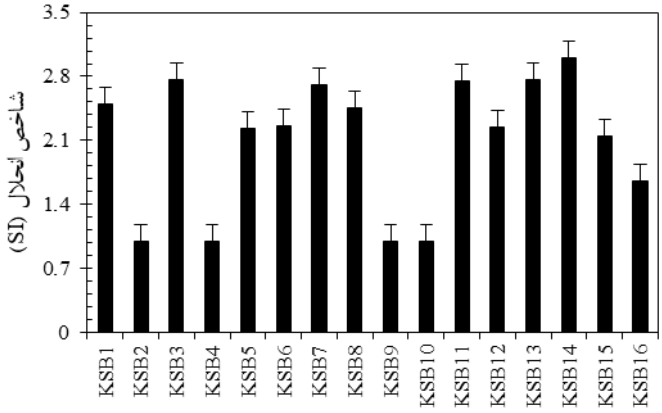
بر اساس تحلیل نتایج مربوط به مرحله اول، منبع کربن مهم و تأثیرگذار شناسایی گردید. در مرحله دوم، دامنه‌های متفاوتی از متغیرهای مستقل شامل pH، منبع کربن و زمان انکوباسیون در نظر گرفته شده و بر اساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل، تعداد ۲۰ آزمایش با ۵ تکرار در سطح مرکزی طراحی و اجرا شد.

تحلیل‌های مربوط به مدل‌سازی طرح پلاکت – برمن و طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 10 انجام شد.

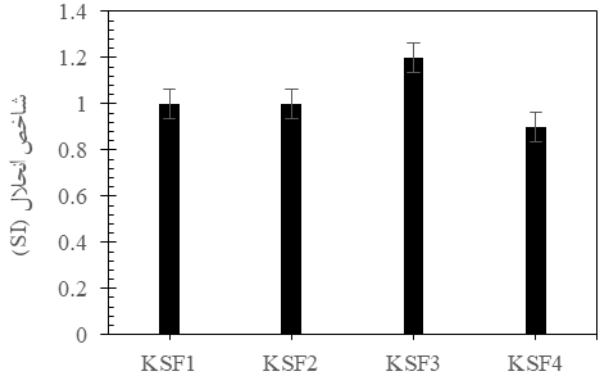
نتایج و بحث

نتایج مربوط به ارزیابی توانایی کیفی و کمی سویه‌های آزادکننده پتاسیم در شکل‌های ۱و ۲ و جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به اینکه باکتری (KSB1) *Pseudomonas fluorescens* و قارچ (KSF3) *Aspergillus niger* دارای بالاترین میزان پتاسیم آزاد شده نسبت به سویه‌های دیگر بودند، لذا به‌عنوان سویه‌های مورد مطالعه انتخاب گردیدند (شکل ۱ و ۲، جدول ۲).

بررسی تأثیر منابع مختلف کربن بر آزادسازی پتاسیم از ایلایت با استفاده از طرح پلاکت-برمن بر پایه‌ی مدل خطی درجه اول نشان داد که هیچ یک از منابع کربن اثر معناداری در آزادسازی K توسط باکتری و قارچ نداشتند (اشرفی و همکاران ۲۰۱٦) و لذا هر یک از آن‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزین یکدیگر در محیط‌کشت استفاده شوند (جدول ۳). اما با توجه به پایین بودن مقدار آماره *P*، گلوکز و ساکاروز به‌ترتیب در شرایط تلقیح باکتریایی و قارچی به‌عنوان منبع تأثیرگذار کربن گزینش شده و در مرحله دوم آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱- مقادیر شاخص آزادسازی جدایه‌های باکتریایی آزادکننده پتاسیم (روز دهم).



شکل ۲- مقادیر شاخص آزادسازی جدایه‌های قارچی آزادکننده پتاسیم (روز دهم).

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح میکروبی و زمان انکوباسیون بر میزان پتاسیم آزاد شده ($mg\ L^{-1}$).

نام سویه	زمان انکوباسیون (روز)						
	صفر	۱	۲	۳	۵	۷	۱۰
شاهد (بدون تلقیح)	۰/۳۶^{E}	۰/۳۷^{E}	۰/۳٤^{E}	۰/۳۹^{E}	۰/۳۹^{E}	۰/٤۳^{E}	۰/٤٤^{E}
KSB1	۰/۸٤$^{z,A-D}$	۱/۸۲$^{t-x}$	۲/۲٦$^{m-u}$	۲/۵۸$^{h-r}$	۲/۹۱$^{d-l}$	۳/۲۷$^{b-g}$	٤/۷۳^{a}
KSB3	۰/۷۲$^{A-D}$	۱/۲۸$^{x-z,A}$	۲/۱٦$^{o-v}$	۲/۱٦$^{o-v}$	۲/۸$^{e-n}$	۲/۹٤$^{d-k}$	۳/۳۵$^{b-e}$
KSB7	۰/٦٤$^{B-D}$	۰/۷۸$^{z,A-D}$	۱/۳٦$^{w-x}$	۱/۹۷$^{r-w}$	۲/۷۳$^{e-p}$	۳/۱۲$^{b-i}$	۳/۱٤$^{b-i}$
KSB11	۰/۸۵$^{z,A-D}$	۱/۹٦$^{r-w}$	۲/۳۱$^{k-t}$	۲/۲۹$^{l-t}$	۲/۹۷$^{c-j}$	۲/۷۲$^{e-p}$	۳/۱۲$^{b-i}$
KSB13	۰/۷۸$^{z,A-D}$	۱/۸۰$^{t-x}$	۲/۱۱$^{p-v}$	۲/۲۷$^{m-t}$	۲/٦٦$^{g-q}$	۲/۷۰$^{f-p}$	۲/۸۵$^{d-m}$
KSB14	۰/٦۲^{CD}	۱/٦۲$^{v-y}$	۲/۱۵$^{o-v}$	۲/۲٤$^{m-v}$	۳/۰٦$^{c-j}$	۲/۸٦$^{d-m}$	۳/۰٤$^{c-j}$
KSF1	۰/٦۱^{CD}	۱/۳۸$^{w-x}$	۱/۷۱$^{t-y}$	۲/۳۱$^{k-t}$	۲/۷۵$^{e-o}$	۳/۳۳$^{b-f}$	۳/٦۰^{bc}
KSF2	۰/٦۱^{CD}	۱/٤۰$^{w-z}$	۱/٦۳$^{u-y}$	۲/۲۹$^{l-t}$	۲/۵۲$^{i-r}$	۳/۲۰$^{b-h}$	۳/٤۵^{bcd}
KSF3	۰/٦۱^{CD}	۱/۸۱$^{t-x}$	۱/۹۸$^{r-w}$	۲/۳۱$^{n-v}$	۲/٤۸$^{j-s}$	۳/۲٤$^{b-g}$	۳/۷۲^{b}
KSF4	۰/٦۱^{CD}	۱/۱۱$^{yz,A-C}$	۱/۸۵$^{s-x}$	۲/۰٦$^{q-v}$	۲/۵۲$^{i-r}$	۲/۹۵$^{d-j}$	۳/۳۵$^{b-e}$

KSB و KSF به‌ترتیب نشان‌دهنده باکتری‌ها و قارچ‌های آزادکننده پتاسیم می‌باشند.

میانگین‌های با حروف مشابه در هر سطر و ستون بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) ندارند.

جدول ۳- ضرایب رگرسیونی مربوط به داده‌های آزمایشی مدل پلاکت-برمن.

کانی	پارامتر	ضریب	آماره T	آماره P
باکتری	ثابت معادله	۵/۰۲۳	۱۰۰/۱٤	۰/۰۰۰
	گلوکز	-۰/۱۰۲٤	-۲/۰٤	۰/۰۷٦
	ساکاروز	-۰/۰٦۱٤	-۱/۲۲	۰/۲۵٦
	فروکتوز	۰/۰۲۰۵	۰/٤۱	۰/٦۹٤
قارچ	ثابت معادله	۰/۸٤۵	۱۷/٦۷	۰/۰۰۰
	گلوکز	۰/۰۱۵۹	۰/۳۳	۰/۷۵٦
	ساکاروز	۰/۱۱۱	۲/۳۳	۰/۰۸۰
	فروکتوز	-۰/۰٤۷	-۱/۰۰	۰/۳۷٤

پس از انتخاب منبع کربن، به‌منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف فاکتورهای زمان، pH و منبع کربن بر مقدار آزادسازی پتاسیم توسط میکروارگانیسم‌ها، تعداد ۲۰ آزمایش با استفاده از طرح مرکب مرکزی طراحی و اجرا گردید (جدول ٤). بر اساس نتایج، بیشترین آزادسازی پتاسیم در سطوح مرکزی (۰) زمان و منبع کربن، و سطح (+۱/٦۸) +α pH مشاهده شد (آزمایش ۸، جدول ٤). مقدار آزادسازی K توسط قارچ در این سطوح ۱/۵۵ برابر بیشتر از باکتری بود. کمترین میزان آزادسازی پتاسیم توسط باکتری و قارچ به‌ترتیب ۳/۷۹ و ۱/۲۳ میلی‌گرم در لیتر است. pH اولیه پایین باعث کاهش فعالیت هر دو میکروارگانیسم شده است. هم‌چنین نتایج حاکی از کاهش قابل‌توجه pH در تمام نمونه‌ها در پایان آزمایش است (جدول ٤). برخی از اسیدهای آلی که در پری‌پلاسم تولید می‌شوند، قادرند به راحتی در محیط مجاور پخشیده شده و منجر به آزادسازی اشکال نامحلول کانی‌هایی نظیر فلدسپار و اورتوکلاز (سوگماران و جانارتهام ۲۰۰۷) و فلدسپار و ایلایت (شنگ و هی ۲۰۰٦) شوند. توانایی سویه‌ها برای کاهش pH محیط‌کشت به‌عنوان شاخصی از اسیدی نمودن محیط‌کشت در نظر گرفته می‌شود. به‌عبارت دیگر، فرض می‌شود میکروارگانیسم‌های آزادکننده پتاسیم یا KSMs[1] که پتاسیم نامحلول را حل می‌کنند، قادرند مقادیر قابل‌توجهی از اسیدهای آلی را تولید نمایند. اسیدهای آلی ناشی از فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها منجر به کاهش pH محیط کشت شده و از طریق افزایش اسیدیته کل، ظرفیت آزادسازی کاتیون‌هایی نظیر پتاسیم را افزایش می‌دهند (بدر و همکاران ۲۰۰٦، شنگ و هی ۲۰۰٦). این مطلب بر اساس یافته‌های محققانی استوار است که گزارش نمودند، KSMs، اسیدهای آلی مونو، دی و تری نظیر گلوکونیک، استیک، اگزالیک، فوماریک، تارتاریک و سیتریک تولید می‌کنند که منجر به کاهش pH محیط‌کشت می‌شوند (هان و همکاران ۲۰۰٦، گیرگیس و همکاران ۲۰۰۸، مینا و همکاران ۲۰۱٤). ممکن است باکتری و قارچ مورد مطالعه در این پژوهش نیز برای تأمین نیاز خود به Si^{4+} و K^{+}، ساختار کانی را شکسته و این یون‌ها را وارد فاز محلول نموده‌اند و از طریق تولید چندین نوع اسید آلی، باعث کاهش pH محیط‌کشت شده‌اند. تولید H^{+} در نتیجه‌ی هیدرولیز کانی موجود در محیط‌کشت نیز دلیل دیگر کاهش pH می‌باشد (مینا و همکاران ۲۰۱۵).

[1] K- solubilizing microorganisms (KSMs)

جدول ۴- ماتریس مقادیر متغیرهای واقعی و کد شده‌ی * در مدل‌سازی با روش طرح مرکب مرکزی.

آزمایش	مقادیر کد شده‌ی متغیرها			باکتری		قارچ	
	زمان	pH	منبع کربن	پتاسیم آزاد شده ($mg\ L^{-1}$)	pH نهایی	پتاسیم آزاد شده ($mg\ L^{-1}$)	pH نهایی
۱	۱ (۱۵)	۱ (۹)	-۱ (۳)	۴۰/۳	۶/۳۸	۳۵/۷	۵/۰۱
۲	۱ (۱۵)	-۱ (۵)	۱ (۱۰)	۳/۷۹	۴/۹۵	۶/۸۴	۳/۸۸
۳	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۱۵/۲۹	۴/۹۶	۱۸/۵۳	۴/۱۶
۴	-۱ (۵)	-۱ (۵)	۱ (۱۰)	۴/۰۸	۵/۱۸	۴/۷۶	۳/۶۷
۵	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۹/۰۶	۴/۹	۷/۰۴	۴/۱۴
۶	-۱ (۵)	۱ (۹)	-۱ (۳)	۳۵/۷۷	۵/۴۱	۵۰/۱۸	۴/۵۹
۷	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۶/۶۵	۴/۸۷	۷/۵۴	۳/۹۷
۸	۰ (۱۰)	۱/۶۸(۱۰/۳۶)	۰ (۶/۵)	۱۰۹/۸	۴/۸۹	۱۷۰/۳	۴
۹	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۱۸/۳۵	۴/۸۴	۷/۰۴	۳/۸۶
۱۰	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۱/۶۸(۱۲/۳۸)	۶/۳۹	۴/۸۸	۱۹/۷۷	۳/۸۴
۱۱	۰ (۱۰)	-۱/۶۸(۳/۶۳)	۰ (۶/۵)	۶	۴/۷۴	۶/۵۴	۳/۶۵
۱۲	۱/۶۸(۱۸/۴۰)	۰(۷)	۰ (۶/۵)	۱۱/۱۳	۵/۲۱	۱۵/۱۹	۳/۸۹
۱۳	-۱ (۵)	۱ (۹)	۱ (۱۰)	۳۲/۳۱	۳/۵۹	۶۰/۵۵	۳/۵۹
۱۴	-۱ (۵)	-۱ (۵)	-۱ (۳)	۳/۴۳	۴/۹۴	۱/۲۳	۴/۳۷
۱۵	۱ (۱۵)	-۱ (۵)	-۱ (۳)	۷/۴۴	۵/۷۱	۴/۵۶	۳/۵۹
۱۶	۰ (۱۰)	۰ (۷)	-۱/۶۸(۰/۶۱۳)	۹/۴۴	۶/۲۵	۵/۸۰	۴/۹۷
۱۷	-۱ (۵)	۱ (۹)	۱ (۱۰)	۳۹/۲۱	۴/۷۴	۴۰/۱۰	۳/۸
۱۸	-۱/۶۸(۱/۵۹)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۱۸/۳۶	۵/۲۹	۲/۹۷	۴/۶۵
۱۹	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۶/۹	۴/۹۷	۸/۵۴	۳/۷
۲۰	۰ (۱۰)	۰ (۷)	۰ (۶/۵)	۷/۴۱	۴/۹۴	۱۵/۰۳	۳/۹۶

مقادیر واقعی هر متغیر در داخل پارانتز (زمان و مقدار منبع کربن به ترتیب بر حسب روز و گرم بر لیتر) و مقادیر کدشده‌ی آن‌ها بیرون از پارانتز ارائه شده‌اند.

ضرایب تابع چندجمله‌ای با استفاده از طرح مرکب مرکزی در جدول ۵ ارائه شده‌اند. علی‌رغم اثر غیرمعنادار زمان و منبع کربن، تأثیر pH در بخش خطی و درجه دو بر آزادسازی K از ایلایت توسط باکتری و قارچ معنادار بود (جدول ۵). با وجود اینکه اثرات متقابل متغیرهای مستقل در آزادسازی K معنادار نیست، اما برهمکنش زمان با منبع کربن به‌دلیل پایین بودن آماره *P*، نسبت به اثر متقابل سایر پارامترها بیشتر است.

جدول ۵ - ضرایب تابع چندجمله‌ای طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی غلظت پتاسیم آزاد شده.

بخش مدل	پارامترهای مدل	باکتری			قارچ		
		ضریب	آماره T	آماره P	ضریب	آماره T	آماره P
ثابت مدل		۱۰/۹۲	۱۱/۲۶	<۰/۰۰۰۱	۱۱/۲۵	۸/۰۶	۰/۰۰۱۵
خطی	زمان	−۰/۷۹	۰/۰۸٤	۰/٤٤۰۸	۲/۳٤	۰/۲۲	۰/٦٤۷٦
	pH	۲۲/۲٤	٦٥/۹۳	<۰/۰۰۰۱	۳۲/٦۱	٤۳/۱۷	<۰/۰۰۰۱
	منبع کربن	−۱/۰۹	۰/۱٥	۰/۷۷۳۷	۳/۰۹	۰/۳۸	۰/٥٥۳۲
درجه دو	زمان × زمان	٤/۰۷ E−۰/۰۰۳	۲/۳۳ E−۰/۰۰۳	۰/۹۰۰۱	−۳/۲۷	۰/٤٦	۰/٥۱۳٤
	pH × pH	۱٥/۲٥	۳۲/۸۲	<۰/۰۰۰۱	۲٤/۷۷	۲٦/۳۹	۰/۰۰۰٤
	منبع کربن × منبع کربن	−۲/٦۹	۰/۹۲	۰/۳٦۷٥	−۲/۲٥	۰/۲۰	۰/٦٦۷۸
برهمکنش	زمان × pH	−۰/۷٦	۰/۰٤٥	۰/۹۸٤۲	۰/۰۷۷	۱/٤۲۷ E−۰/۰۰٤	۰/۹۹۰۷
	زمان × منبع کربن	−۱/۹۷	۰/۳۰	۰/۳٦٦٦	٤/۲۰	۰/٤۲	۰/٥۳۱۷
	pH × منبع کربن	−۰/۱۹	۲/۹۳ E−۰/۰۰۳	۰/۹۸٥۱	۱/۱۱	۰/۰۲۹	۰/۸٦۷۳

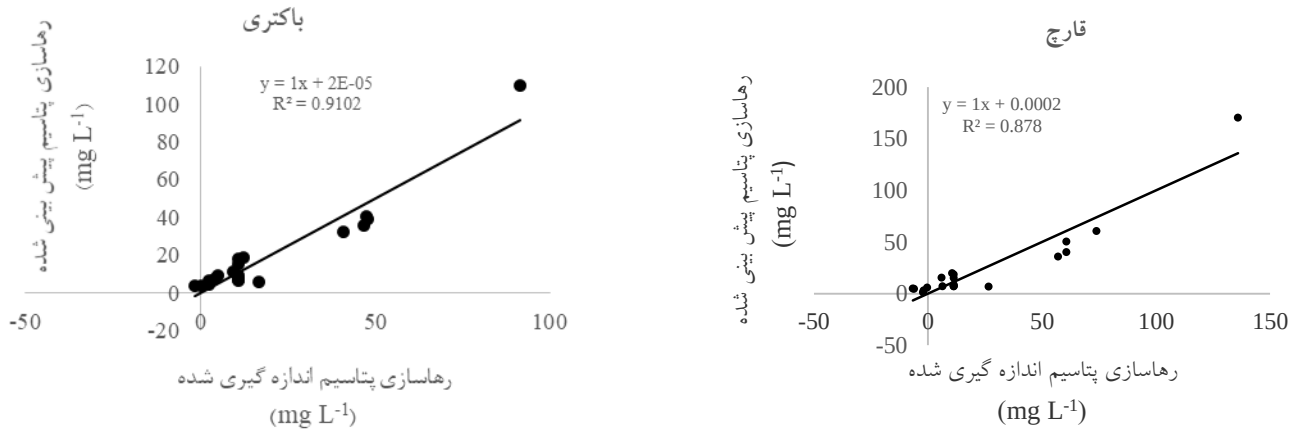
بر اساس نتایج جدول ۵ و با در نظر گرفتن متغیرهای دارای اثر معنادار بر آزادسازی K، تابع پیش‌بینی‌کننده مقدار پتاسیم آزاد شده توسط باکتری و قارچ به‌ترتیب به‌صورت معادلات (۱) و (۲) قابل ارائه است. در این معادلات X_1، X_2 و X_3 به‌ترتیب مربوط به مقادیر کد شده زمان، pH و منبع کربن می‌باشند. این معادلات که بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی خلاصه شده‌اند، نشان‌دهنده‌ی اثر مثبت و افزاینده pH (X_2) بر افزایش آزادسازی پتاسیم محلول هستند. در شکل ۳ نیز مقدار پتاسیم اندازه‌گیری شده در آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی در مقابل میزان پتاسیم پیش‌بینی شده با مدل طرح مرکب مرکزی معادلات (۱) و (۲) ترسیم شده‌اند. این شکل به‌روشنی نشان می‌دهد که مدل طرح مرکب مرکزی به‌طور مطلوبی مقدار پتاسیم را برآورد نموده است. بر اساس مقدار ضریب تبیین مدل طرح مرکب مرکزی، می‌توان گفت که به‌ترتیب ۹۱ و ۸۷/۸ درصد از تغییرات پتاسیم محلول در حضور باکتری و قارچ توسط این مدل قابل تبیین است.

پتاسیم آزاد شده از ایلایت توسط باکتری $(mg\ L^{-1}) = ۱۰/۹۲ + ۲۲/۲٤X_2 + ۱٥/۲٥X_2^2$ [1]

$R^2 = ۰/۹۱$ $R^2adj = ۰/۸۲۹$

پتاسیم آزاد شده از ایلایت توسط قارچ $(mg\ L^{-1}) = ۱۱/۲٥ + ۳۲/٦۱X_2 + ۲٤/۷۷X_2^2$ [2]

$R^2 = ۰/۸۸$ $R^2adj = ۰/۷٦۹$



شکل ۳- غلظت‌های اندازه‌گیری شده و پیش‌بینی شده پتاسیم آزادشده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی.

میکروارگانیسم‌ها با ۹ مکانیسم در فرآیند هوادیدگی و انحلال سنگ‌ها و کانی‌ها مشارکت می‌نمایند: ۱) حضور فیزیکی (تماس فیزیکی)، ۲) حمله با استفاده از اسیدهای معدنی نظیر اسیدهای سولفوریک، نیتریک و کربونیک (هیدرولیز مواد)، ۳) حمله با استفاده از اسیدهای آلی از جمله اسیدهای استیک، سیتریک، اگزالیک، گلوکونیک و غیره (هیدرولیز مواد)، ٤) حمله توسط حلال‌های آلی از قبیل اسید استیک و بوتیریک یا الکل‌هایی مانند اتانول یا پروپانول یا کتون (متورم‌سازی و هیدرولیز مواد)، ٥) تنش شوری ناشی از فرآورده‌های واکنش اسیدهای آلی و معدنی (نگهداشت آب در مواد متخلخل باعث افزایش احتمال انجماد و ذوب می‌شود)، ٦) تولید ترکیبات سمی نظیر سولفید هیدروژن، اکسیدهای نیتروژن (تولید اسیدهای معدنی یا رسوب سولفیدهای فلزی و اکسید/احیاکننده‌ها)، ۷) تولید بیوفیلینگ و بیوفیلم (اگزوپلیمرها منجر به خوردگی موضعی سطح می‌شوند، نگهداشت آب در مواد متخلخل، اثرات آبگریزی بر سطوح، کاهش کارآیی انتقال گرما، کاهش سرعت جریان یا افزایش فشار)، ۸) حمله با اگزوآنزیم‌ها (تقسیم ترکیبات آلی نامحلول به مولکول‌های کوچک محلول در آب)، ۹) تولید عوامل کلات‌کننده‌ی ترکیبات معلق (افزایش حلالیت مواد نامحلول و یا آبگریز) (سند ۱۹۹۷). علاوه بر موارد فوق‌الذکر، باکتری‌ها از طریق تولید پلی‌ساکاریدها به طور غیرمستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارند. پلی‌ساکاریدها اسیدهای آلی و سیدرفورها را به شدت جذب کرده و منجر به تشکیل غلظت بالایی از اسیدهای آلی یا سیدروفورها در نزدیکی سطح کانی شده و با اکسید سیلیسیم موجود در سطح کانی کمپلکس ایجاد می‌نمایند، به این ترتیب عناصر از سطح کانی آزاد شده و وارد محیط کشت محلول می‌شوند. از سوی دیگر پلی‌ساکاریدهای موجود در محیط کشت با جذب سیلسیم باعث بهم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع می‌شوند و از این طریق منجر به آزاد شدن عناصری مثل پتاسیم و آهن می‌گردد (لیو و همکاران ۲۰۰٦، لیان و همکاران ۲۰۰۸). بنابراین باکتری‌ها و قارچ‌ها از طریق مکانیسم‌های مذکور منجر به افزایش میزان آزادسازی پتاسیم از کانی‌ها می‌شوند.

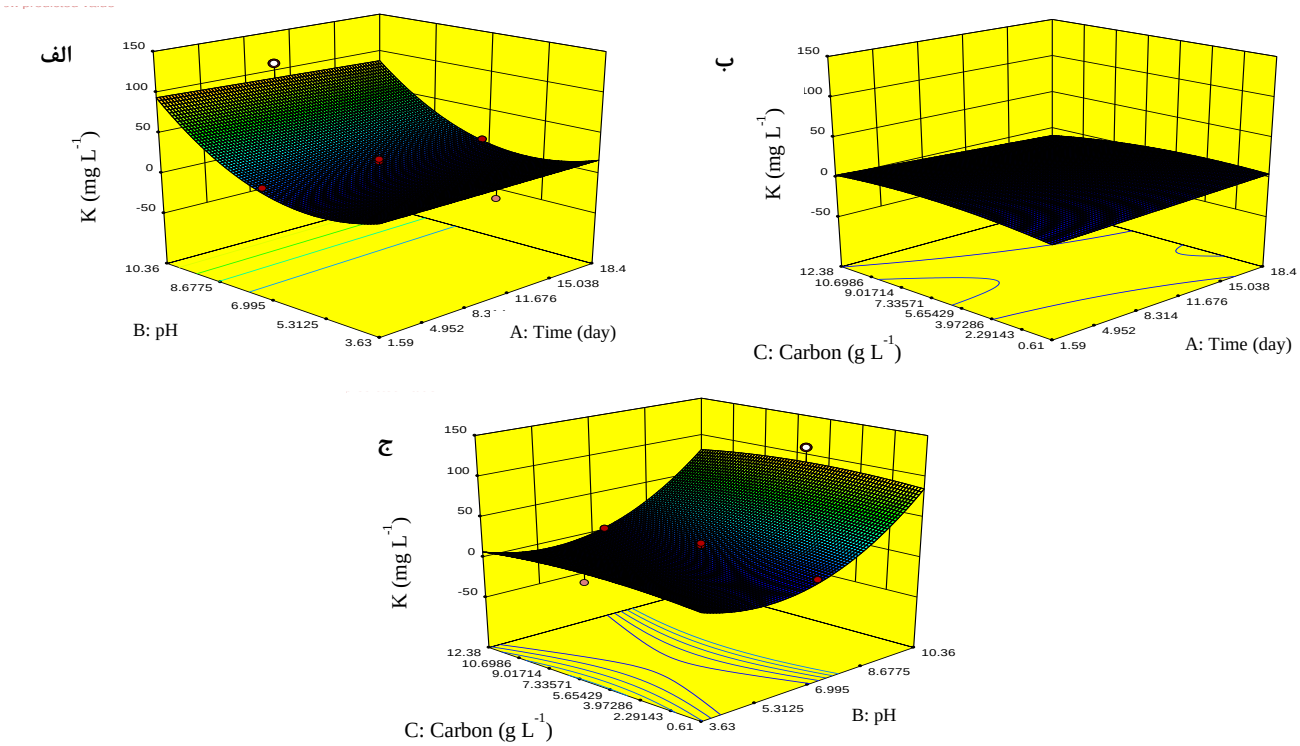
اثر ترکیبی متغیرهای مورد مطالعه بر آزادسازی K از ایلایت توسط باکتری و قارچ به‌ترتیب در شکل‌های ٤ و ٥ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که در سطح مرکزی منبع کربن (٦/٥ گرم در لیتر)، با افزایش pH، آزادسازی K توسط باکتری و قارچ افزایش می‌یابد (شکل‌های ٤ و ٥ الف). مطالعات نشان دادند که *A. niger* قادر است در pHهای پایین‌تر از ۲ تا pHهای بالاتر از ۸ به‌خوبی رشد و فعالیت نماید (هسه و

همکاران ۲۰۰۲). تولید اسیدهای آلی توسط *A. niger* نیز وابسته به pH محیط است؛ به‌طوری‌که تولید اسید اگزالیک و اسید گلوکونیک در pHهای ۵ تا ۸ کارآمد بوده و در pH پایین‌تر از ۳، اسید اگزالیک تولید نمی‌گردد (اندرسون و همکاران ۲۰۰۹). لذا می‌توان استنباط نمود که یکی از دلایل افزایش آزادسازی K توسط قارچ بر اثر افزایش pH محیط‌کشت، افزایش سنتز اسیدهای آلی به‌ویژه اسید اگزالیک می‌باشد. چن و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که تأثیر عمده‌ی اسیدهای آلی از جمله اسید اگزالیک در انحلال سنگ‌ها و کانی‌ها با حضور یون‌های هیدروژن و تشکیل کمپلکس‌های کاتیونی در ارتباط است. کاتیون‌های ساختاری در نتیجه‌ی حمله‌ی یون‌های هیدروژن، که امکان تشکیل کمپلکس‌های کاتیونی-آلی با اسید اگزالیک دارای گروه‌های عاملی OH^- و $COOH^-$، را ایجاد می‌کنند، آزاد می‌شوند. جذب شیمیایی کمپلکس‌های کاتیونی-آلی بر سطوح کانی‌ها باعث تغییر دانسیته‌ی الکترون به سمت ساختار کانی می‌شود. این انتقال بار دانسیته‌ی الکترون پیوندهای کاتیون-اکسیژن را افزایش داده و آن‌ها را بیشتر در معرض هیدرولیز قرار می‌دهد. هم‌چنین بوان و سوج (۱۹۸۹) بیان نمودند که افزایش غلظت H^+ (کاهش pH) و کمپلکس نمودن ترجیحی آلومینیوم در حضور اسیدهای آلی و در محدوده pH ٤ تا ۹ تنها دلیل افزایش آزادسازی پتاسیم نبوده و بالا بودن آزادسازی کلی پتاسیم در pHهای خنثی نیز در فرآیند آزادسازی پتاسیم نقش دارد.

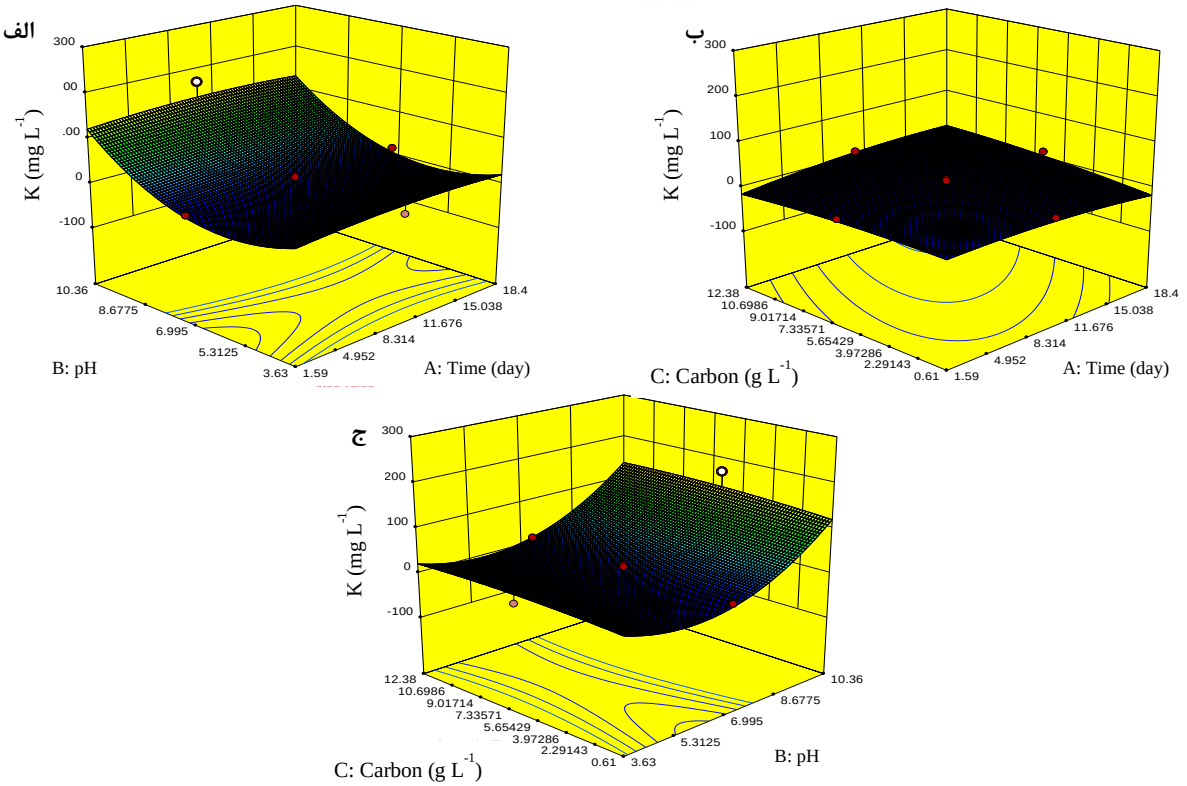
آزادسازی K در زمان‌های مختلف انکوباسیون متفاوت است؛ به‌طوری‌که با افزایش زمان انکوباسیون میزان آزادسازی K توسط باکتری کاهش می‌یابد. حال آن‌که میزان K آزادشده توسط قارچ با شیب ملایمی افزایش یافته و پس از مدت زمان مشخصی ثابت می‌شود (شکل‌های ٤ و ۵ ب). آزادسازی با سرعت اولیه بالا می‌تواند ناشی از آزاد شدن پتاسیم از مناطق لبه‌ای و گوه‌ای شکل کانی‌ها باشد (گلدینگ ۱۹۸٤). با پیشروی آزادسازی و افزایش انرژی جذب پتاسیم در بین لایه‌ها و از طرفی افزایش فاصله پتاسیم از لبه‌ی کانی‌ها و افزایش فاصله پخشیدگی، سرعت آزادسازی کاهش می‌یابد (موسوی و همکاران ۲۰۱۵). جذب و آسمیلاسیون بخشی از پتاسیم آزاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها نیز در کاهش غلظت پتاسیم آزادسازی شده نقش دارد (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۹). محدوده بهینه pH برای قارچ و باکتری به‌ترتیب <۲ تا >۸ و ۵ تا ۸ است (دیکس و وبستر ۱۹۹۵، هسه و همکاران ۲۰۰۲). با توجه به اینکه با افزایش زمان انکوباسیون میزان pH در تیمارهای تلقیح‌یافته به دلیل تولید اسیدهای آلی به تدریج کاهش یافته و به کمتر از آستانه تحمل باکتری رسید، لذا رشد میکروب‌ها متوقف شده و به این ترتیب از میزان آزادسازی پتاسیم توسط باکتری کاسته می‌شود (لیان و همکاران ۲۰۰۸). در مورد قارچ نیز پس از مدت زمان مشخص، به دلیل تخلیه منبع کربن و انرژی، و هم‌چنین تجمع مواد متابولیتی سمی در محیط کشت فعالیت میکروبی کاهش یافته و آزادسازی K ثابت می‌ماند.

افزایش مقدار منبع کربن منجر به افزایش میزان آزادسازی K توسط قارچ می‌شود. حال آنکه روند آزادسازی K توسط باکتری تا غلظت ۷/۳ گرم در لیتر افزایشی و در غلظت‌های بالاتر کاهشی است (شکل‌های ٤ و ۵ ج). با توجه به اینکه کربن یکی از منابع غذایی اولیه برای رشد و فعالیت متابولیکی ریزجانداران می‌باشد و وجود آن برای تولید اسیدهای آلی ضروری است لذا تعیین منبع کربنی مناسب برای میکروارگانیسم‌های آزادکننده حائز اهمیت می‌باشد (شارمیلا و همکاران ۱۹۸۹، پراساد ۲۰۱٤، گانگولیوا و همکاران ۲۰۱۵). اگرچه افزایش غلظت قند (منبع کربن) می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیک و

کربوکسیلیک باعث افزایش تولید اسید شود اما این امر در مورد تمام ریزجانداران صادق نمی‌باشد (سانینگهام و کوآیک ۱۹۹۲). در توضیح علت این امر باید بیان نمود که تولید متابولیت‌های ثانویه توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها تنها در شرایط وجود مقادیر کمتر از حد مطلوب منابع کربنه صورت می‌گیرد (ایلمر و همکاران ۱۹۹۵). بر این اساس ممکن است کاهش میزان پتاسیم محلول در غلظت‌های بالای منبع کربن ناشی از کاهش تولید اسیدهای آلی توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* باشد.

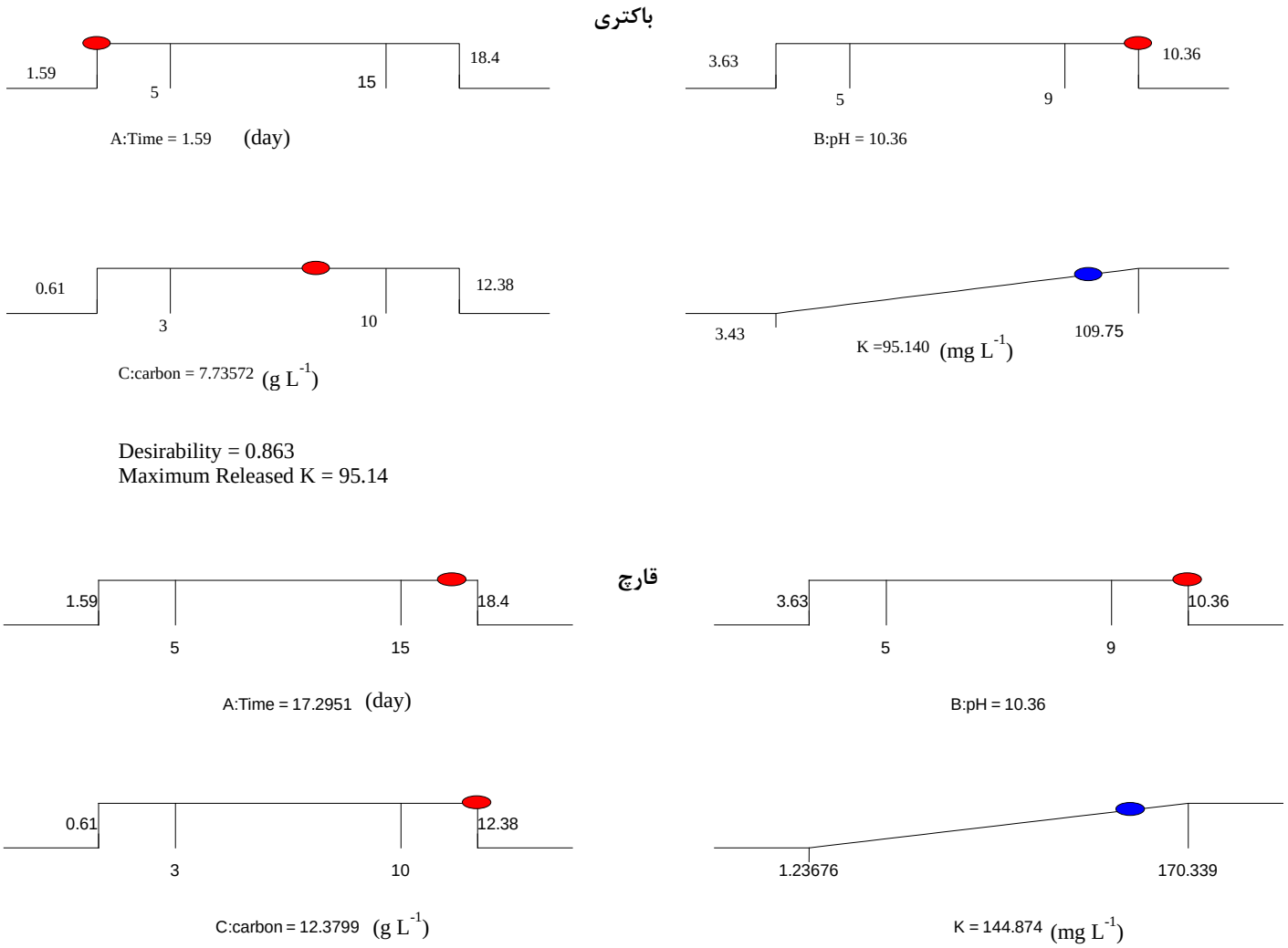


شکل ۴- نمایش سه‌بعدی تغییرات مقدار پتاسیم آزاد شده از ایلایت توسط باکتری در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی.



شکل ۵- نمایش سه‌بعدی تغییرات مقدار پتاسیم آزاد شده از ایلایت توسط قارچ در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی.

شرایط بهینه برای دست‌یابی به بیشینه آزادسازی پتاسیم توسط باکتری و قارچ از ایلایت در محیط کشت بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی پیش-بینی گردید (شکل ٦).



شکل ۶- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل برای کسب بیشینه غلظت پتاسیم محلول.

نتیجه‌گیری کلی

اگرچه استفاده از مقادیر کم کودهای شیمیایی پتاسیمی، بهره‌وری گیاه را به‌طور چشمگیری بهبود می‌دهد، به‌کارگیری این مواد شیمیایی پرهزینه بوده و منجر به آلودگی محیط‌زیست می‌شود. این امر استفاده از میکروارگانیسم‌های آزادکننده پتاسیم را به‌عنوان بهترین گزینه‌ی ممکن برای مقابله با مشکل کمبود K قابل‌دسترس در خاک اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. KSMها از طریق مشارکت در آزادسازی عناصر غذایی کلیدی از ساختار کانی‌ها، می‌توانند در افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی نقش به‌سزایی ایفا کنند. در این پژوهش KSMهایی با قابلیت آزادسازی بالای پتاسیم شناسایی شده و تأثیر سطوح مختلف pH، منبع کربن و مدت زمان انکوباسیون بر میزان آزادسازی پتاسیم از ایلایت

توسط آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مدل طرح مرکب مرکزی می‌توان مقدار پتاسیم را به‌طور مطلوبی برآورد نمود. بر اساس مقدار ضرایب تبیین، ۹۱ و ۸۷/۸ درصد از تغییرات پتاسیم محلول به‌ترتیب در حضور باکتری و قارچ توسط این مدل قابل تبیین است. هم‌چنین نتایج بیان‌گر اثر مثبت و معنادار pH بر آزادسازی K بود؛ به‌طوری‌که حداکثر مقدار آزادسازی پتاسیم توسط باکتری و قارچ به‌ترتیب برابر با ۱۰۹/۸ و ۱۷۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، در مدت زمان ۱۰ روز، مقدار منبع کربن ٦/٥ گرم در لیتر، و pH = ١٠/٤ مشاهده شد. نتایج این تحقیق می‌تواند پس از انجام مطالعات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در تهیه زادمایه KSMها مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

Adesemoye AO and Kloepper JW, 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85:1-12.

Andersen MR, Lehmann L and Nielsen J, 2009. Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. Genome Biology 10(5): 1-14.

Ashrafi-Saeidlou S and Rasouli-Sadaghiani MH, 2017. Potassium release kinetics from K-bearing minerals in presence of silicate-solubilizing microorganisms. Iranian Journal of Soil and Water Research 3: 639-649. (In Persian with English abstract)

Ashrafi-Saeidlou S, Rasouli-Sadaghiani MH, Asadzadeh F and Barin M, 2016. Modeling phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* using response surface methodology. Water and Soil Science-University of Tabriz 4.2: 299-324. (In Persian with English abstract)

Badr MA, Shafei AM and Sharaf El-Deen SH, 2006. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2(1): 5-11.

Barin M, Sadeghi S, Rasouli-Sadaghiani MH, Sepehr E, Dovlti B and Vahedi R, 2018. Influence of k-solubilizing fungi on potassium release from silicate minerals and some growth indexes on Corn (*Zea mays* L.). Applied Soil Research 6(2): 96-108. (In Persian with English abstract)

Bertsch PM and Thomas GW, 1985. Potassium status of temperate region soils. Pp. 129-162. In: Munson RD (ed.). Potassium in Agriculture. Soil Science Society of America Inc.

Bevan J and Savage D, 1989. The effect of organic acids on the dissolution of K-feldspar under conditions relevant to burial diagenesis. Mineralogical Magazine 53(372): 415-425.

Chapman HD and Pratt PF 1962. Methods of analysis for soils, plants and waters. Soil Science 93(1), 68.

Chen J, Blume HP and Beyer L, 2000. Weathering of rocks induced by lichen colonization-a review. Catena 39(2): 121-146.

Churchman GJ and Sumner ME, 2000. The alteration and formation of soil minerals by weathering. Pp. 3-76. In: Huang PM, Li Y and Sumner ME. (ed.). Handbook of Soil Science. CRC Press (Taylor and Franics), Boca Raton.

Cunningham JE and Kuiack C, 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Applied and Environmental Microbiology 58(5): 1451-1458.

Ebrahimi M, Safari Sinegani AA, Sarikhani MR and Aliasgharzad N. 2019. Assessment of soluble and biomass K in culture medium is a reliable tool for estimation of K releasing efficiency of bacteria. Geomicrobiology 36(10): 873-880.

Dix NJ and Webster J, 1995. Fungal Ecology. Cahpman and Hall, Cambridge, UK.

Gangoliya SS, Gupta RK and Singh NK, 2015. Phytase production through response surface methodology and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* NF191. Indian Journal of Experimental Biology 53:350-355.

Girgis MGZ, Khalil HM and Sharaf MS, 2008. *In vitro* evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some *Bacillus* strains. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2(1): 68-81.

Glick BR, 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica 2012: 1-15.
Goulding KWT, 1984. The availability of potassium in soils to crops as measured by its release to a calcium-saturated cation exchange resin. The Journal of Agricultural Science 103(2): 265-275.
Han HS and Lee KD, 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant, Soil and Environment 52(3): 130.
Harley AD and Gilkes RJ, 2000. Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. Nutrient Cycling in Agroecosystems 56(1): 11-36.
Haub C, Gribble J and Jacobsen L, 2012. World Population Data Sheet 2012. Population Reference Bureau, Washington.
Hesse SJ, Ruijter GJG, Dijkema C and Visser J, 2002. Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. European Journal of Biochemistry 269(14): 3485-3494.
Hu X, Chen J and Guo J, 2006. Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22(9): 983-990.
Illmer P, Barbato A and Schinner F, 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 27(3): 265-270.
Lian B, Wang B, Pan M, Liu C and Teng HH, 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. Geochimica et Cosmochimica Acta 72(1): 87-98.
Liu W, Xu X, Wu X, Yang Q, Luo Y and Christie P, 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health 28(1-2): 133-140.
Liu D, Lian B and Dong H, 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. Geomicrobiology Journal 29(5): 413-421.
Meena OP, Maurya BR and Meena VS, 2013. Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica. Agronomy for Sustainable Development 1: 53-56.
Maurya BR, Meena VS and Meena OP, 2014. Influence of Inceptisol and Alfisol's potassium solubilizing bacteria (KSB) isolates on release of K from waste mica. Vegetos 27(1): 181-187.
Meena VS, Maurya BR and Verma JP, 2014. Does a rhizospheric microorganism enhance K^+ availability in agricultural soils? Microbiological Research 169(5-6): 337-347.
Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Aeron A, Kumar A, Kim K and Bajpai VK, 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. Ecological Engineering 81: 340-347.
Mousavi A, Khiamim F and Shariatmadari H, 2015. The kinetics of potassium release from K-feldspar, compared with muscovite under the influence of different extractants. Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources 67: 229-240. (In Persian with English abstract)
Omkar S, 2012. Isolation and characterization of phosphate solubilising bacteria from rhizospheric soil samples. Online International Interdisciplinary Research Journal 2(4): 28-29.
Padmavathi T, 2015. Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15(3): 781-793.
Parfitt RL, 1992. Potassium-calcium exchange in some New Zealand soils. Soil Research 30(2): 145-158.
Park J, Sanford RA and Bethke CM, 2009. Microbial activity and chemical weathering in the Middendorf aquifer, South Carolina. Chemical Geology 258(3-4): 232-241.
Parmar P and Sindhu SS, 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. Journal of Microbiological Research 3(1): 25-31.
Pradhan N and Sukla LB, 2006. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology 5(10):850-854.
Prasad MP, 2014. Optimization of fermentation conditions of phosphate solubilizing bacteria- a potential bio fertilizer. Merit Research Journal of Microbiology and Biological Science 2(2): 031-035.
Rajawat MVS, Singh S, Singh G and Saxena AK, 2012. Isolation and characterization of K-solubilizing bacteria isolated from different rhizospheric soil. In Proceeding of 53rd Annual Conference of Association of Microbiologists of India. 124p.
Rawat J, Sanwal P and Saxena J, 2016. Potassium and its role in sustainable agriculture. Pp. 235-253. In: Meena VS, Maurya BR, Verma JP, and Meena RS (ed.). Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer- New Delhi.
Rehm GW and Sorensen RC, 1985. Effects of potassium and magnesium applied for corn grown on an irrigated sandy soil 1. Soil Science Society of America Journal 49(6): 1446-1450.

Sand W, 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates—a general mechanistic overview. International Biodeterioration and Biodegradation 40(2-4): 183-190.

Sarikhani MR, Oustan S, Ebrahimi M and Aliasgharzad N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European Journal of Soil Science 69: 1078–1086.

Schroeder D, 1974. Relationships between soil potassium and the potassium nutrition of the plant. Pp. 56-63. In: Bruchholz H (ed.). Potassium Research and Agricultural Production. International Potash Institute, Berne.

Sharmila M, Ramanand K and Sethunathan N, 1989. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. Canadian Journal of Microbiology 35(12): 1105-1110.

Sheng XF and Huang WY, 2002. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria. Scientia Agricola 35:673–677.

Sheng XF and He LY, 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian Journal of Microbiology 52(1): 66-72.

Sindhu SS, Parmar P, Phour M and Sehrawat A, 2016. Potassium-solubilizing microorganisms (KSMs) and its effect on plant growth improvement. Pp. 171-185. In: Meena VS, Maurya BR, Verma JP and Meena RS (ed.). Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, New Delhi.

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(3): 350-355.

Swetha S, Varma A and Padmavathi T, 2014. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, α-amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. Biotechnology 4(4): 439-445.

Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP and Frey-Klett P, 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology 17(8): 378-387.

Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, Mustin C and Frey-Klett P, 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. Applied and Environmental Microbiology 73(9): 3019-3027.

Whitelaw MA, 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Advances in Agronomy 69:99-151.

Xie JC, 1998. Present situation and prospects for the world's fertilizer use. Plant Nutrition and Fertilizer Science 4:321–330.

Zord C, Senbayram M and Peiter E, 2014. Potassium in agriculture – status and perspective. Journal of Plant Physiology 171:656–659.