



نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار

جلد یازدهم، شماره دوم، ۱۴۰۰

۶۹-۴۹

<http://ejms.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/ejms.2021.18614.1997

(مقاله کامل علمی - پژوهشی)



جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از ریزوسفر گیاهان مختلف منطقه نیشابور و تعیین پتانسیل آن‌ها برای افزایش رشد و نمو ذرت

اعظم محمدزاده^۱، امیر لکزیان*^۲، علیرضا کریمی^۲ و سید سجاد حسینی^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد، استاد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد،

^۲ دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: پتاسیم به همراه نیتروژن و فسفر از عناصر پر نیاز گیاهان است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش به‌سزایی دارد. بخش زیادی از پتاسیم خاک در ساختمان کانی‌های سیلیکاته از جمله میکاها قرار دارد و غیرقابل دسترس برای گیاه است. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم به عنوان کودهای زیستی از روش‌های بیولوژیکی تأمین پتاسیم برای گیاه است. در نتیجه پژوهش حاضر با هدف جداسازی، انتخاب و شناسایی گونه برتر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم و هم‌چنین اثر تلقیح آن بر رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت و بر عملکرد گیاه ذرت انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر تعداد ۱۵ جدایه از باکتری‌های ریزوسفری پنج گیاه مختلف (گندم، گوجه‌فرنگی، یونجه، ذرت و ریحان) جداسازی و خالص‌سازی شدند. تعیین توانایی حل‌کنندگی پتاسیم جدایه‌ها در دو بخش به‌صورت جداگانه انجام شد. در بخش اول توانایی حل‌کنندگی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت الکساندروف مایع در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل ۱۵ جدایه باکتری و ۳ زمان انکوباسیون (۷، ۱۴ و ۲۱ روز) بودند. بخش دوم پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت ارزیابی تأثیر جدایه‌های انتخابی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر رشد گیاه ذرت رقم سینگل کراس ۶۴۰ در یک خاک با کلاس بافتی لوم شنی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل شاهد مثبت (کود سولفات پتاسیم (SK))، شاهد منفی (خاک بدون کود (S))، ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM1)، ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM2)، جدایه SM1 + B5 (SM1B5)، جدایه SM1 + B11 (SM1B11)، جدایه SM1 + B13 (SM1B13)، جدایه SM2 + B5 (SM2B5)، جدایه SM2 + B11 (SM2B11) و جدایه SM2 + B13 (SM2B13) بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP 8 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم افزار اکسل رسم شد.

یافته‌ها: نتایج بخش اول نشان داد که بیش‌ترین آزادسازی پتاسیم (۱۶/۴ میلی‌گرم در لیتر) و کم‌ترین pH (۳/۰۴) مربوط به جدایه B11 پس از ۲۱ روز انکوباسیون مشاهده شد. نتایج بخش دوم نشان داد که بیش‌ترین غلظت پتاسیم

* مسئول مکاتبه: lakzian@um.ac.ir

توسط اندام هوایی (۲/۸۱ درصد) و ریشه (۰/۹۵۶ درصد) به ترتیب در تیمار کود سولفات پتاسیم (شاهد مثبت) و SM2B11 ملاحظه شد. ارتفاع، شاخص سبزی‌نگی و وزن خشک ریشه گیاه در تیمارهای دارای جدایه‌های انتخابی نسبت به شاهد بیش‌تر بود. بر اساس نتایج حاصله جدایه B11 به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. در نهایت جدایه برتر با استفاده از تعیین ردیف بازهای آلی ژن 16SrRNA شناسایی و ۹۹/۳۷ درصد با باکتری *Paenibacillus stellifer* شباهت داشت.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت را در دو بخش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای دارند. در هر دو مطالعه انجام شده جدایه B11 (*Paenibacillus stellifer*) بیش‌ترین تأثیر را در آزادسازی پتاسیم معدنی از کانی بیوتیت داشته است. بنابراین کاربرد آن به عنوان کود زیستی می‌تواند مدنظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، کانی‌های سیلیکاتی، کودهای زیستی

مقدمه

پتاسیم پس از نیتروژن و فسفر، سومین عنصر ضروری برای رشد گیاه و با مقداری حدوداً برابر با ۲/۶ درصد هفتمین عنصر تشکیل‌دهنده پوسته زمین است (۹). کانی‌های سیلیکاتی مانند فلدسپار پتاسیم، میکا و سنگ‌های حاوی نفلین منابع طبیعی پتاسیم در خاک هستند که در اثر هوازدگی و یا تبادل کاتیونی پتاسیم محلول را به خاک عرضه می‌کنند (۳۸). پتاسیم در خاک به شکل‌های محلول، تبادل‌ی، غیرتبادل‌ی و ساختمانی وجود دارد که در این میان کم‌ترین غلظت مربوط به پتاسیم محلول (۱ تا ۲ درصد از کل) است (۸، ۳۹)؛ به طوری که حتی در خاک‌های غنی از ذخایر پتاسیم قسمت عمده پتاسیم (۹۸ درصد) به صورت نامحلول در خاک، سنگ و مواد معدنی وجود دارد (۱۵). از جمله نقش‌های متابولیسمی پتاسیم در رشد و توسعه گیاهان می‌توان به فعال کردن آنزیم‌ها، افزایش فتوسنتز و کاهش تنفس، کمک به انتقال قندها و نشاسته، جذب نیتروژن و سنتز پروتئین اشاره کرد (۲). هم‌چنین مقاومت در برابر بیماری‌ها و تنش‌ها از دیگر اثرات پتاسیم است که باعث بهبود کیفیت محصول می‌شود (۶۴).

کمبود پتاسیم از محدودیت‌های عمده در تولید محصولات کشاورزی به ویژه در خاک‌های با بافت درشت است (۱۴). عواملی مانند آبشویی، فرسایش خاک و هم‌چنین برداشت متوالی محصول حتی در خاک‌های بسیار غنی از پتاسیم منجر به کاهش این عنصر می‌شوند. رشد تصاعدی جمعیت و به موازات آن افزایش نیاز غذا منجر به افزایش مصرف کودهای شیمیایی شده است. مصرف دائمی کودهای شیمیایی به دلیل هزینه زیاد، اثرات زیان‌بار و هم‌چنین کاهش منابع اولیه غیرممکن است. جهت کاهش مصرف این نهاده‌ها پژوهشگران راهکارهای مناسبی مانند استفاده از کودهای زیستی را ارائه داده‌اند (۴۳). از جمله این کودهای زیستی می‌توان ریزجانداران تجزیه‌کننده سیلیکات‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گل‌سنگ‌ها را نام برد (۷). این ریزجانداران با ترشح اسیدهای آلی و پلی‌ساکاریدها سبب انحلال مستقیم کانی‌های پتاسیم‌دار از جمله میکاها، ایلایت و ارتوکلاز می‌شوند و یا با کلات نمودن یون‌های سیلیکون، سبب آزاد شدن پتاسیم خاک و هم‌چنین آهن، روی و سیلیسیم می‌شوند (۳۴).

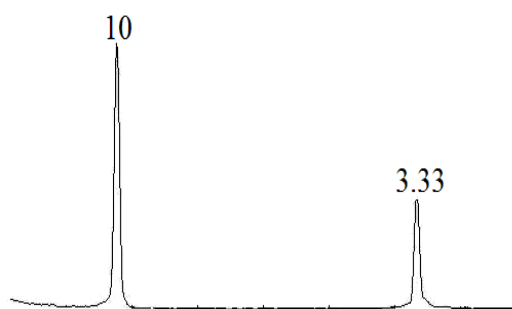
همچنین بررسی اثر تلقیح آن‌ها به همراه کانی بیوتیت بر پارامترهای رشدی و مقدار پتاسیم گیاه ذرت به‌عنوان گیاه مدل و مقایسه آن با کود سولفات پتاسیم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک: به‌منظور جداسازی ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم، تعداد ۵ نمونه خاک ریزوسفری (ذرت، گوجه‌فرنگی، ریحان، گندم و یونجه) از مزارع مختلف شهرستان نیشابور در مردادماه ۱۳۹۷ جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

تهیه و آماده‌سازی کانی بیوتیت جهت مرحله آزمایشگاهی و کشت گلدانی: کانی بیوتیت حاوی ۷/۸ درصد پتاسیم از معدنی در همدان تهیه شد (جدول ۱) (۲۵). بیوتیت به‌وسیله آسیاب برقی پودر شده و از الک ۲۷۰ مش (قطر کم‌تر از ۵۳ میکرون) عبور داده شد. سپس به منظور حذف پتاسیم قابل‌استفاده (پتاسیم محلول و تبادل) پودر حاصل با اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار ۳ تا ۴ مرتبه شستشو داده شد. در نهایت مقدار ۲ گرم پتاسیم خشک شده به محیط کشت جامد الکساندروف اضافه شد (۲۹).

تاکنون پژوهش‌های زیادی در مورد تأثیر باکتری‌ها بر حلالیت پتاسیم از کانی‌های مختلف انجام شده است. لیان (۱۹۹۸) نشان داد که تلقیح باکتری میزان پتاسیم آزادشده از فلدسپار و ایلایت در محیط کشت را به ترتیب ۸ و ۱۶ درصد افزایش داد (۳۲). سن و همکاران (۲۰۱۶) باکتری‌های آزادکننده پتاسیم را از خاک‌های ریزوسفری گیاهان مختلف جداسازی کردند و دریافتند که حلالیت پتاسیم در شرایط آزمایشگاهی از پودر میکا توسط باکتری‌ها از ۳/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۴۱/۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۰ روز پس از تلقیح متغیر بود (۵۷). در خاکی با مقدار پتاسیم کم تلقیح باکتری حل‌کننده پتاسیم *B. edaphicus* به گیاه پنبه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه را ۳۰ درصد و جذب پتاسیم را ۲۶ درصد افزایش داد. علاوه بر این جذب نیتروژن و فسفر نیز افزایش یافت. این افزایش جذب عناصر غذایی و جذب بهتر آب به‌وسیله پنبه تلقیح شده با باکتری به تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه مثل اکسین توسط باکتری در نزدیک ریشه گیاه نسبت داده شد (۵۹). پژوهش درباره تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر عملکرد کمی و کیفی گیاهان زراعی مختلف هم‌چنان ادامه دارد. بنابراین پژوهش حاضر با اهداف جداسازی، انتخاب و شناسایی گونه برتر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از ریزوسفر گیاهان بومی منطقه نیشابور و



شکل ۱- پراش پرتویکس کانی خالص بیوتیت (برحسب آنگستروم).

Figure 1. X-ray diffraction of pure biotite mineral (According to Angstrom).

جدول ۱- درصد اکسید عنصر حاصل از تجزیه XRF کانی مورد استفاده.

Table 1. Percentage of element oxide obtained by XRF decomposition of the mineral used.

LOI**	MnO	TiO ₂	Na ₂ O	CaO	K ₂ O	Fe ₂ O ₃	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	کانی
1.46	0.03	7.02	0.31	0.42	9.41 (7.84)*	11.42	12.96	14.91	41.73	بیوتیت

* عدد داخل پرانتز درصد پتاسیم را نشان می‌دهد.

** کاهش وزن در دمای بالا (Loss on Ignition)

حدود 10^8 CFU ml^{-1} (۱/۵) به محیط کشت افزوده شد. نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و گردش ۷۰ دور در دقیقه انکوباسیون شدند. سپس در ۳ زمان انکوباسیون (T1 (۷ روز)، T2 (۱۴ روز) و T3 (۲۱ روز)) pH نمونه‌ها توسط دستگاه pH متر مدل METROHM 632 قرائت شد و هم‌زمان با این عملیات پس از سانتریفوژ سوسپانسیون باکتری (دور ۳۰۰۰ برای مدت ۲ دقیقه)، ۱ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی برداشته و میزان پتاسیم آزاد شده توسط دستگاه فلیم فوتومتر مدل Jenway- PFP7 قرائت گردید (۲۸).

شناسایی مولکولی جدایه برتر: برای شناسایی مولکولی جدایه برتر، ابتدا DNA کل باکتری با روش CTAB استخراج شد (۱۱). به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دو آغازگر rD1 با توالی (5'-CCCGGGATCCA) و 3'-AGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC) و fd1 با توالی (5'-CCGAATTCGTCGACAAC) و 3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (۷۱) انجام شد.

پس از آماده کردن همه نمونه‌ها، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (مدل Biometra, Germany) با برنامه حرارتی ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۷ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه

جداسازی و شناسایی کیفی و کمی ریزوباکتری‌های

حل‌کننده پتاسیم: برای جداسازی و شناسایی کیفی ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از محیط کشت جامد الکساندروف (بیوتیت ۲ گرم، Na_2HPO_4 ۲ گرم، CaCO_3 ۰/۱ گرم، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۵ گرم، FeCl_3 ۰/۰۰۵ گرم، ساکارز ۵ گرم و آگار ۲۰ گرم در لیتر با $\text{pH}=7$ (۵۳)) استفاده شد. از رقت‌های 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} سوسپانسیون آب و خاک مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و به محیط کشت جامد الکساندروف اضافه و سپس پلیت‌ها به مدت ۷ روز و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. پس از این مدت تعداد ۱۵ جدایه بر مبنای مورفولوژی پرگنه حاصله (برآمده بودن، موکونیدی پرگنه و بیضی شکل) در این محیط کشت به عنوان حل‌کننده پتاسیم نامحلول انتخاب و خالص‌سازی شدند (۲۶).

به منظور بررسی کمی انحلال پتاسیم توسط ۱۵ جدایه منتخب و تأثیر آن‌ها بر pH، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع الکساندروف (شامل بیوتیت ۲ گرم، CaCO_3 ۰/۲ گرم، NaCl ۰/۲ گرم، FeCl_3 ۰/۰۹ گرم، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ۱ گرم، Na_2HPO_4 ۱ گرم، MgSO_4 ۰/۵ گرم، ساکارز ۵ گرم در یک لیتر با $\text{pH}=7$ (۵۶)) تهیه و استریل شد. هم‌زمان یک نمونه شاهد (حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ۰/۱ گرم پودر بیوتیت) نیز در سه تکرار به‌طور جداگانه آماده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر یک از جدایه‌های منتخب با $\text{OD}=0/1$ (جمعیت

جدایه B13 و مقدار ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM1B13)، جدایه B5 و مقدار ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM2B5)، جدایه B11 و مقدار ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM2B11) و جدایه B13 و مقدار ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM2B13) بود.

خاک مورد مطالعه از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مشهد (با مختصات جغرافیایی ۲۱° ۳۶' عرض شمالی و ۶۱° ۵۹' طول شرقی) از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی‌متری تهیه و پس از عبور از الک ۲ میلی‌متری در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ بار به مدت ۲ ساعت و در دو نوبت به فاصله زمانی ۴۸ ساعت استریل شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه قبل از استریل مانند بافت خاک به روش هیدرومتری (۱۹)، نیتروژن کل به روش برمنز و مولوانی (۱۲)، پتاسیم قابل‌دسترس خاک به روش استات آمونیوم (۱۳)، فسفر فراهم خاک به روش اولسن و همکاران (۴۵)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (۳۶)، کربن آلی به روش هضم تر (۷۰)، pH در گل اشباع، ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) به روش استات سدیم با $pH=8.2$ (۱۳)، EC در عصاره خاک و رطوبت ظرفیت زراعی به روش وزنی طبق روش‌های مرسوم آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند (جدول ۲).

بر اساس آزمون خاک کودهای اوره و سوپر فسفات تریپل به ترتیب به مقدار ۸۹ و ۳۸ میلی‌گرم در کیلوگرم و همچنین تیمارهای پتاسیم (شامل بیوتیت و کود سولفات پتاسیم برای شاهد مثبت) به خاک‌ها اضافه شده و به گلدان‌هایی با ظرفیت تقریبی ۴ کیلوگرم ریخته شدند. در هر گلدان ۶ عدد بذر ذرت رقم سینگل کراس ۶۴۰ کاشته شد. یک هفته پس از سبز شدن بذرها تعداد دو بوته سالم و شاداب در هر گلدان نگهداری شد. در هنگام کاشت ۱

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۶۹). جهت اطمینان از صحت استخراج DNA، محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA در ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE1X بارگذاری شد (۳۰). بعد از انجام PCR قطعه حاصل از توالی 16SrRNA به طول ۱۵۰۰bp به منظور خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت macrogen کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه، توالی به دست آمده توسط نرم‌افزار Bioedit بررسی گردید تا در صورت نیاز ویرایش گردد و سپس توالی به دست آمده به کمک الگوریتم N Blast در پایگاه NCBI با توالی‌های دیگر موجود در GenBank هم‌ردیف‌سازی و مقایسه شد و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 درخت فیلوژنی رسم و نوع باکتری مشخص شد (۱۴).

کشت گلدانی ذرت و تلقیح تیمارهای باکتری:
جدایه‌هایی که در محیط کشت مایع الکساندروف در شرایط آزمایشگاهی دارای کم‌ترین میزان pH و بیش‌ترین آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت بودند برای تلقیح به خاک گلدان و بررسی تأثیر آن‌ها بر رشد و نمو و تأمین پتاسیم مورد نیاز گیاه انتخاب شدند. آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل شاهد مثبت (۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کود سولفات پتاسیم (SK))، شاهد منفی (خاک بدون کود (S))، مقدار ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM1)، مقدار ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM2)، جدایه B5 و مقدار ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM1B5)، جدایه B11 و مقدار ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتیت (SM1B11)،

آب مقطر برای آبیاری گیاهان استفاده شد. آبیاری هر ۲ روز یک بار و به میزان ظرفیت زراعی انجام شد. قبل از برداشت، ارتفاع گیاه و شاخص سبزیگی گیاه با استفاده از دستگاه کلروفیل متر مدل (SPAD-502 Minolta-Japan) اندازه‌گیری شد (۷۲). سپس اندام هوایی از سطح خاک بریده و ریشه‌ها نیز از خاک جدا شدند. سپس ریشه و اندام هوایی گیاه با آب مقطر شسته شده و به مدت ۳ روز در آون و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده برای تعیین عملکرد وزن و پس از آن آسیاب شدند. غلظت پتاسیم در اندام هوایی نمونه‌های گیاهی به روش هضم خشک عصاره‌گیری و با دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد (۲۷). همچنین پتاسیم قابل‌استفاده خاک به روش استات آمونیوم (۱۳) استخراج و با دستگاه فلیم‌فتومتر قرائت گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP 8 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار اکسل رسم شد.

میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت تازه باکتری زیر هر بذر اضافه شد. جهت اطمینان از کلونیزاسیون باکتری در ریزوسفر گیاه به مدت ۲ ماه، هر ۱۰ روز مجدداً تلقیح میکروبی انجام شد. برای تهیه مایه تلقیح باکتریایی ابتدا جدایه‌های برتر باکتری جهت تکثیر بر روی محیط کشت نوترینت آگار بازکشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس یک لوپ از کشت تازه هر جدایه به درون یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و گردش ۷۰ دور در دقیقه انکوباسیون شدند. جهت یکسان‌سازی جمعیت، سلول‌ها از سوسپانسیون باکتریایی با سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۳۰۰۰rpm جدا شده و سپس با آب مقطر استریل OD سوسپانسیون باکتریایی در طول موج ۶۲۰ نانومتر بر روی OD=۰/۱ (جمعیت حدود $10^8 \times 1/5$ CFU ml⁻¹) تنظیم شد (۴۶). در طول دوره رشد (۶۰ روز) گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و از

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلدانی قبل از استریل شدن.

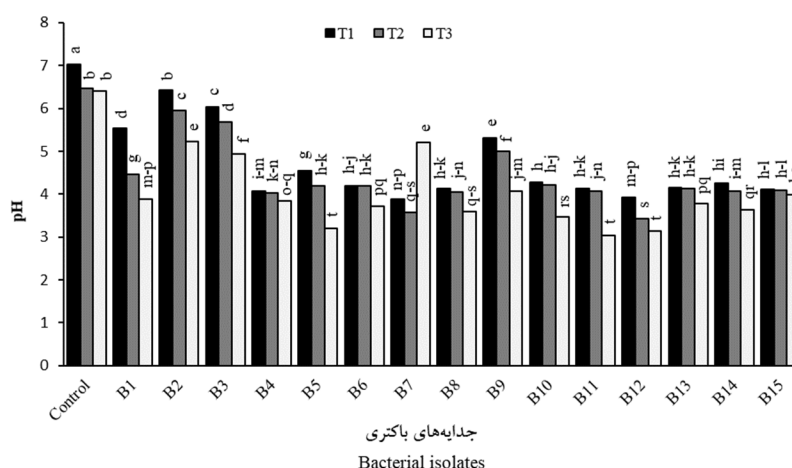
Table 2. Physical and chemical properties of soil used in pot cultivation.

نیترژن Nitrogen	پتاسیم potassium	فسفر Phosphorus	کربن آلی Organic carbon	کربنات کلسیم معادل Equivalent to calcium carbonate	FC	CEC	EC	pH	بافت خاک Soil texture
0.028	0.01	0.001	0.30	15.62	15	6.85	1.29	7.9	Sandy loam

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی کیفی ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم: از بین ۵ نمونه خاک ریزوسفری برداشته شده از مزارع مختلف تعداد ۱۵ جدایه باکتریایی حل‌کننده پتاسیم جداسازی شدند. خصوصیات و مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌های منتخب مؤثر در حل‌کنندگی پتاسیم در پلیت‌های حاوی محیط کشت الکساندروف جامد از نظر شکل کلونی، بافت کلونی و هم‌چنین از نظر رنگ کلونی مورد بررسی قرار گرفتند. بر این اساس کلنی‌هایی که بیضی شکل، موکوئیدی، برآمده، شفاف و بی‌رنگ بودند به عنوان ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در مرحله اول جداسازی و سپس خالص سازی شدند.

توانایی کمی انحلال پتاسیم و تغییرات pH محیط کشت توسط جدایه‌های باکتریایی: در تمام زمان‌های مورد مطالعه، تلقیح جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم موجب کاهش معنی‌دار pH محیط کشت نسبت به شاهد (بدون تلقیح باکتری) شد ($P < 0.01$) (شکل ۲). در بین جدایه‌های باکتریایی انتخابی کم‌ترین مقدار pH محیط کشت به ترتیب مربوط به جدایه‌های B11، B12 و B5 در روز بیست و یکم بود؛ که به ترتیب ۵۲/۵، ۵۱/۱ و ۵۰ درصد کم‌تر از شاهد بود. نتایج نشان داد به‌طور کلی در تیمار شاهد و تمام جدایه‌های مورد مطالعه (به‌جز جدایه B7)، مقدار pH محیط کشت با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.01$) (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر pH محیط کشت الکساندروف مایع حاوی بیوتیت در طی روزهای مختلف انکوباسیون (۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از تلقیح).

هر ستون نشان‌دهنده میانگین سه تکرار است. وجود حداقل یک حرف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری است

Figure 2. Comparison of the mean effect of potassium-soluble rhizobacteria on the pH of liquid Alexandroff culture medium containing biotite during different heating days (7, 14 and 21 days after inoculation). Each column represents the average of three repetitions. The presence of at least one similar letter indicates insignificance

موریا و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کردند که کاهش pH محیط کشت الکساندروف ممکن است به دلیل تولید انواع مختلفی از اسیدهای آلی و معدنی توسط

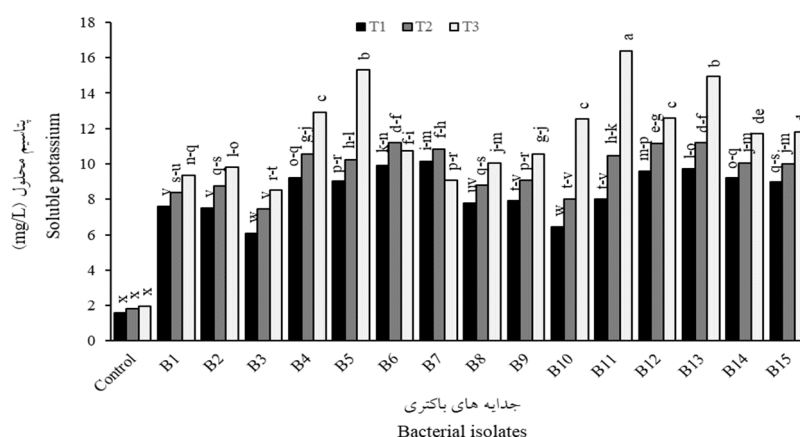
کاهش pH محیط کشت الکساندروف مایع تلقیح شده با جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم توسط پژوهشگران متعددی گزارش شده است (۳۳، ۶۲).

باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم باشد (۳۹). باکتری‌های حل‌کننده‌های پتاسیم اسیدهای آلی مانند مونو-دی-و-تری گلوکونیک، استیک، اگزالیک، فوماریک، تارتاریک و سیتریک تولید می‌کنند که منجر به کاهش pH محیط کشت می‌شود (۲۱، ۲۴، ۴۱).

کاهش pH در شاهد با افزایش زمان انکوباسیون ممکن است به دلیل تولید H^+ در حین هیدرولیز میکای اضافه شده باشد (۴۲). کاهش pH محیط کشت توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم با گذشت زمان توسط پژوهش‌های شنگ و هی (۲۰۰۶) سوگمارن و جانارتانم (۲۰۰۷) نیز نشان داده شده است (۶۲، ۶۸). لیان و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی مشاهده کردند که با تلقیح قارچ *Aspergillus fumigatus* به محیط کشت، مقدار pH محیط کشت با گذشت زمان تا ۳۰ روز از ۶/۴۲ به ۳/۱۶ کاهش یافت (۳۳). ساحا و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که مقدار pH محیط کشت با تلقیح گونه‌های *Pseudomonas azotoformans* (BHU21) و *Bacillus licheniformis* (BHU18) با افزایش زمان انکوباسیون به مدت ۲۱ روز به ترتیب ۱۱ و ۷ درصد کاهش یافت (۵۴). احتمالاً دلیل کاهش بیش‌تر pH با گذشت زمان تجمع اسیدهای آلی ترشح شده توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم باشد. با این حال در حضور جدایه B7 مقدار pH محیط کشت با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. این افزایش احتمالاً می‌تواند به دلیل کاهش یا توقف رشد باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در نتیجه تخلیه منبع کربن و انرژی، کاهش pH به کم‌تر از آستانه تحمل ریزجانداران و همچنین تجمع مواد متابولیتی سمی در محیط کشت باشد (۳۳).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل جدایه‌های باکتری و زمان بر مقدار آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت در محیط کشت مایع الکساندروف نشان داد که در تمام زمان‌های مورد مطالعه، تلقیح جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم موجب افزایش معنی‌دار مقدار پتاسیم محلول نسبت به شاهد (بدون تلقیح باکتری) شد ($P < 0/01$) (شکل ۳). در بین جدایه‌های باکتریایی بیش‌ترین مقدار پتاسیم محلول به ترتیب با مقدار ۱۶/۴، ۱۵/۳ و ۱۴/۹ میلی‌گرم در لیتر مربوط به جدایه‌های B11، B5 و B13 در روز بیست و یکم بود؛ که به ترتیب ۷/۳۲، ۶/۷۶ و ۶/۵۶ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. به طور کلی در تمام جدایه‌های مورد مطالعه (به جز جدایه‌های B6 و B7)، مقدار پتاسیم محلول در محیط کشت با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0/01$) (شکل ۳).

پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که تلقیح محیط کشت حاوی کانی‌های سیلیکاتی با ریزجانداران خاک مانند باکتری‌ها (*Bacillus mucilaginosus*، *Azotobacter sp*، *Pseudomonas putida*، *Micrococcus Rhizobium*) و قارچ‌ها (*Mycorrhiza*، *Penicillium* و *Aspergillus fumigatus*) به طور قابل‌توجهی فراهمی پتاسیم را افزایش می‌دهد (۶، ۵۵). مقدار پتاسیم رهاشده از کانی‌ها به pH، مقدار اکسیژن، نوع جدایه باکتری حل‌کننده پتاسیم از کانی و طبیعت کانی بستگی دارد (۵۱، ۶۰). افزایش آزادسازی پتاسیم ممکن است به دلیل تولید اسیدهای آلی، سیدروفورها و پلی‌ساکاریدهای برون سلولی توسط باکتری‌ها باشد که با کاهش pH و یا از طریق تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی و یا کمپلکس شدن فلزات و اسیدولیز محیط اطراف ریزجانداران در محلول موجب افزایش آزادسازی پتاسیم از کانی می‌شود (۶۲، ۶۷).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ریزو باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بر پتاسیم محلول (میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت الکساندروف مایع حاوی بیوتیت در طی روزهای مختلف انکوباسیون (۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از تلقیح).

هر ستون نشان‌دهنده میانگین سه تکرار است. وجود حداقل یک حرف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری است

Figure 3. Comparison of the mean effect of potassium soluble rhizobacteria on soluble potassium (mg/l) in liquid Alexandroff culture medium containing biotite during different heating days (7, 14 and 21 days after inoculation). Each column represents the average of three repetitions. The presence of at least one similar letter indicates insignificance

افزایش زمان انکوباسیون به مدت ۱۰ روز توسط جدایه *pseudomonas sp* (KSB-PD-1-A) به میزان ۱۵/۱۸ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت (۴۴). احتمالاً دلیل افزایش بیشتر آزادسازی پتاسیم مناطق لبه‌ای و گوه‌ای کانی‌های حاوی پتاسیم باشد چون در این مناطق پتاسیم غیرتبادلی با انرژی کم‌تری جذب شده و بنابراین، سریع آزاد می‌شود (۶۶). با این حال در حضور جدایه B7 و B6 مقدار آزادسازی پتاسیم با گذشت زمان کاهش پیدا کرد. این کاهش احتمالاً می‌تواند به دلیل کمبود یا تمام‌شدن منابع پتاسیمی، کاهش تعداد باکتری‌های سیلیکاتی، تشکیل یکسری از ترکیبات نامحلول با عناصر آزاد شده (آهن، روی، مس، آلومینیوم و سیلیسیم) در محیط کشت و حتی استفاده از پتاسیم آزاد شده باشد. علاوه بر این ممکن است پتاسیم در سلول باکتری جذب شود و یا دوباره پتاسیم آزاد شده تثبیت شود (۳).

تأثیر تیمارهای آزمایش بر خصوصیات رشدی گیاه ذرت: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن خشک ریشه، ارتفاع گیاه، شاخص سبزی‌نگی و غلظت پتاسیم در ریشه و اندام هوایی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

اگرچه ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم به طور معنی‌داری در مقایسه با محیط کشت تلقیح نشده پتاسیم بیش‌تری آزاد کردند اما آن‌ها توانایی‌های متفاوتی برای آزادسازی پتاسیم از بیوتیت داشتند. این تفاوت احتمالاً به دلیل تولید انواع مختلف اسیدهای آلی توسط جدایه‌های باکتری باشد (۱۸، ۴۰). با این حال مقدار بسیار کم پتاسیم محلول در محیط کشت مایع حاوی کانی بیوتیت تلقیح نشده ممکن است به دلیل اختلال ساختاری در میکا ناشی از هیدرولیز باشد که منجر به آزادسازی پتاسیم در محیط کشت مایع شده است (۳۵، ۷۶).

طبق نتایج حاصل حداکثر میزان آزادسازی پتاسیم با گذشت زمان در روز بیست و یکم بود؛ به طوری که این آزادسازی در زمان اول کندتر و سپس با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. افزایش آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم با افزایش زمان انکوباسیون توسط پژوهش‌های بازوشا (۲۰۱۳) و ستیاواتی و موتینا (۲۰۱۶) نیز نشان داده شده است (۱۰، ۵۸). نیهالا جابین و سید اسماعیل (۲۰۱۷) نیز گزارش نمودند که مقدار آزادسازی پتاسیم از میکا با

جدول ۳- تجزیه واریانس پارامترهای مورد اندازه‌گیری در تیمارهای باکتریایی.

Table 3. Analysis of variance of the measured parameters in bacterial treatments.

میانگین مربعات Mean squares						درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variation
غلظت پتاسیم ریشه Potassium concentration in root	غلظت پتاسیم اندام هوایی Potassium concentration in shoot	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	شاخص سبزی‌نگی Greenness index	ارتفاع اندام هوایی Shoot Height		
0.046*	0.508*	0.548*	0.225 ^{ns}	9.069*	14.617*	9	جدایه باکتری Bacterial isolate
0.003	0.013	0.223	0.255	1.545	5.350	20	خطا Error
4.38	4.12	10.91	6.89	2.94	5.22	-	ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation %

* و ^{ns} به ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و نداشتن معنی‌داری می‌باشند.

* and ^{ns} indicate a significant difference in the 5% probability level and no significance, respectively.

شاخص سبزی‌نگی در تیمار SK و تیمارهای دارای ریزوباکتری حل‌کننده پتاسیم (SM1B11، SM1B5، SM1B13، SM2B11 و SM2B13) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد منفی و تیمارهای SM1 و SM2 بود ولی تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های باکتریایی مختلف و تیمار کود سولفات پتاسیم نبود.

در بین تیمارهای مورد بررسی تنها تیمارهای SK، SM2B5 و SM2B11 مقدار وزن خشک ریشه را از ۲/۹۴ گرم در گلدان در تیمار شاهد منفی به ترتیب به ۳/۸۶ و ۴/۲۸ و ۳/۸۷ گرم در گلدان افزایش دادند. هم‌چنین تیمارهای SK و SM2B11 ارتفاع گیاه را از ۳۸/۶۶ سانتی‌متر در تیمار شاهد منفی به ترتیب به ۴۵ و ۴۲/۷۵ سانتی‌متر افزایش دادند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مورد آزمایش بر پارامترهای رشدی گیاه ذرت.

Table 4. Results of comparison of the mean of the treated treatments on the growth parameters of corn.

شاخص سبزی‌نگی Greenness index	ارتفاع اندام هوایی (cm) Shoot Height	وزن خشک ریشه (g/pot) Root Dry weight	وزن خشک اندام هوایی (g/pot) Shoot Dry weight	تیمار Treatment
28.9 ^b	39.16 ^{bc}	3.21 ^{bc}	6.35 ^a	SM1
29.53 ^b	39.25 ^{bc}	3.22 ^{bc}	6.63 ^a	SM2
32.16 ^a	41.08 ^{abc}	3.24 ^{bc}	6.4 ^a	SM1B5
32.53 ^a	42.33 ^{abc}	3.11 ^{bc}	6.88 ^a	SM1B11
33.16 ^a	38.5 ^c	3.34 ^{bc}	6.85 ^a	SM1B13
32.4 ^a	39.33 ^{bc}	4.28 ^a	6.57 ^a	SM2B5
32.33 ^a	42.75 ^{ab}	3.87 ^{ab}	7.06 ^a	SM2B11
33.56 ^a	38.83 ^{bc}	3.73 ^{abc}	6.76 ^a	SM2B13
29.38 ^b	38.66 ^c	2.94 ^c	6.43 ^a	(Negative control)S
33.06 ^a	45 ^a	3.86 ^{ab}	7.12 ^a	(Positive control) SK

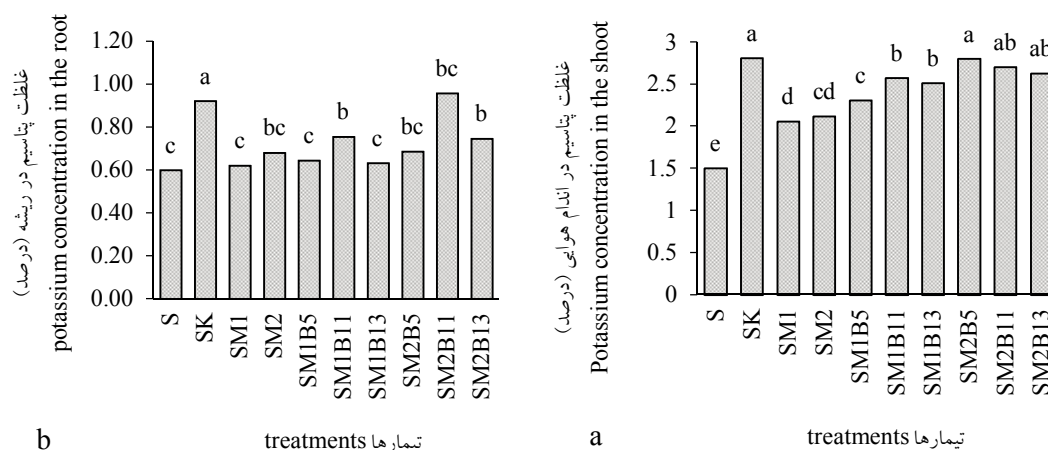
غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت: غلظت مطلوب پتاسیم در اندام هوایی ذرت بین ۱/۹ تا ۳ درصد گزارش شده است (۳۷). در بین تیمارهای مورد بررسی بیشترین غلظت پتاسیم در اندام هوایی مربوط به تیمارهای کود سولفات پتاسیم (۲/۸۱) درصد) و SM2B11 (۲/۸۰ درصد) بود که در دامنه حد کفایت پتاسیم برای ذرت قرار داشت در حالی که کمترین آن مربوط به تیمار شاهد منفی (۱/۵۰ درصد) بود که کمتر از حد کفایت پتاسیم برای ذرت بود. در سطح ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی و تلقیح با جدایه‌های باکتریایی B11، B13 و B5 غلظت پتاسیم در اندام هوایی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد بدون تلقیح باکتری (SM1 و SM2) و همچنین نسبت به خاک شاهد منفی (S) افزایش نشان دادند. همچنین بیشترین (۰/۹۶ درصد) و کمترین (۰/۶۰ درصد) غلظت پتاسیم در ریشه در تیمار SM2B11 و شاهد منفی مشاهده شد. پس از تیمار SM2B11 بیشترین غلظت پتاسیم در ریشه در تیمار کود سولفات پتاسیم مشاهده شد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. مشابه با غلظت پتاسیم در اندام هوایی، در سطح ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی و تلقیح با جدایه‌های باکتریایی B11، B13 و B5 غلظت پتاسیم در ریشه به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد بدون تلقیح باکتری (SM1 و SM2) و همچنین نسبت به خاک شاهد منفی (S) افزایش نشان دادند (شکل ۴).

نتایج این پژوهش نشان داد که که تلقیح گیاه با جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم موجب افزایش غلظت پتاسیم در گیاه ذرت شدند که مشابه با نتایج سایر پژوهشگران بود (۵، ۴۷، ۶۱). قدم‌خانی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای تأثیر دو گونه باکتری را در افزایش غلظت پتاسیم در گیاه بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترین

پژوهش‌های متعددی تأثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم را بر افزایش وزن خشک ریشه، ارتفاع گیاه و شاخص سبزی‌نگی گیاه گزارش کردند (۵۰، ۷۵، ۲۴، ۵۲، ۲۸، ۱۶). ژانگ و کنگ (۲۰۱۴) مشاهده کردند که در بین جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم، جدایه *Klebsiella variicola* (XF11) به همراه پودر فلدسپار به‌طور معنی‌داری وزن خشک گیاه را از ۰/۴۹ گرم به ۱/۰۲ گرم افزایش داد (۷۵). قدم‌خانی و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که تلقیح گیاه گندم با *Enterobacter cloacae Rhizo_33* و ترکیب *Enterobacter cloacae Rhizo_33* و *Pseudomonas sp. Rhizo_9* به ترتیب موجب افزایش ۷۵/۵ و ۳۴/۴ درصد وزن خشک ریشه، ۳/۶ و ۱/۶ درصد ارتفاع گیاه و ۱۵ و ۱۴/۱ درصدی شاخص سبزی‌نگی گیاه نسبت به شاهد شد اما وزن خشک اندام هوایی معنی‌دار نشد (۲۰). شنگ (۲۰۰۵) افزایش معنی‌داری در عملکرد گیاه و همچنین جذب بیش‌تر پتاسیم توسط پنبه به‌دلیل استفاده از کانی‌های حاوی پتاسیم (ایلات) تلقیح شده با گونه‌های *Bacillus edaphicus NBT* آزادکننده پتاسیم را مشاهده کردند (۵۹). احتمالاً دلیل افزایش معنی‌داری وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاه توسط جدایه‌های باکتریایی، توانایی این باکتری‌ها در تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند ایندول استیک اسید، اکسین، اتیلن، سیتوکینین و همچنین جیبرلین باشد (۱، ۲۳) که از طریق تحریک رشد ریشه و به‌دنبال آن جذب بیش‌تر آب و عناصر غذایی توسط گیاه موجب افزایش زیست‌توده و رشد گیاه می‌شوند (۴). همچنین ریزوباکتری‌های حل‌کننده پتاسیم نه تنها موجب افزایش پتاسیم فراهم (پتاسیم قابل تبادل + پتاسیم محلول) خاک می‌شوند بلکه آزادسازی آهن و منگنز به محلول خاک را نیز افزایش می‌دهند که متعاقباً موجب افزایش جذب آن‌ها توسط گیاه و در نتیجه بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شود (۲۰، ۲۲).

کنگ (۲۰۱۴) دلیل این افزایش رشد و رهاسازی پتاسیم از کانی‌های سیلیکاتی را همان‌طور که قبلاً ذکر شد نتیجه تولید اسیدهای آلی مختلف معرفی کردند (۷۵). باکتری‌ها با تأثیر فرآیندهای متابولیک و با تخریب و تجزیه کانی بیوتیت، پتاسیم را از کانی آزاد کرده و به شکل قابل‌استفاده برای گیاه درمی‌آورند. پلی‌ساکاریدهای کپسولی تولید شده توسط باکتری از طرفی عوامل فنلی C₆H₆O و کربوکسیلی COOH را آزاد می‌کنند که قادر به واکنش و تشکیل پیوند با عناصر موجود در کانی‌های سیلیکاتی از جمله سیلیسیم بوده و باعث آزادسازی و انحلال بیش‌تر عناصری هم‌چون سیلیسیم و پتاسیم و انتقال آن به داخل محلول خاک می‌شوند. از طرف دیگر جذب اسیدهای آلی باعث ایجاد ناحیه‌ای با غلظت بالای اسیدهای آلی در نزدیکی کانی شده و به حالیت آن کمک می‌کند (۳۱، ۳۴، ۶۰).

غلظت پتاسیم در ریشه و اندام هوایی مربوط به *Enterobacter cloacae Rhizo_33* بود که به ترتیب ۴۰/۵ و ۵۰/۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (۲۰). سینگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که تلقیح باکتری *Bacillus mucilaginosus* به خاک حاوی کانی میکا، غلظت پتاسیم در ذرت و گندم را به ترتیب ۲/۵ و ۱/۳ برابر در مقایسه با شاهد منفی افزایش داد (۶۵). کشاورز زرجانی و همکاران (۲۰۱۳) اثر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم و کود سولفات پتاسیم را بر غلظت پتاسیم در گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند که کاربرد کود سولفات پتاسیم غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه را به ترتیب ۰/۶۹ و ۳ برابر در مقایسه با تیمار شاهد منفی افزایش داد. نتایج آن‌ها نشان داد که جدایه‌های باکتریایی کارآیی کم‌تری نسبت به کود سولفات پتاسیم در افزایش غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه داشتند (۲۹). ژانگ و



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مورد آزمایش بر غلظت پتاسیم در اندام هوایی (a) و غلظت پتاسیم در ریشه (b) بر حسب (درصد). (خاک شاهد منفی (S)، شاهد مثبت (کود سولفات پتاسیم (SK))، سطح ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی بیوتیت (SM1)، سطح ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی بیوتیت (SM2) و سه جدایه برتر (B5، B11 و B13)

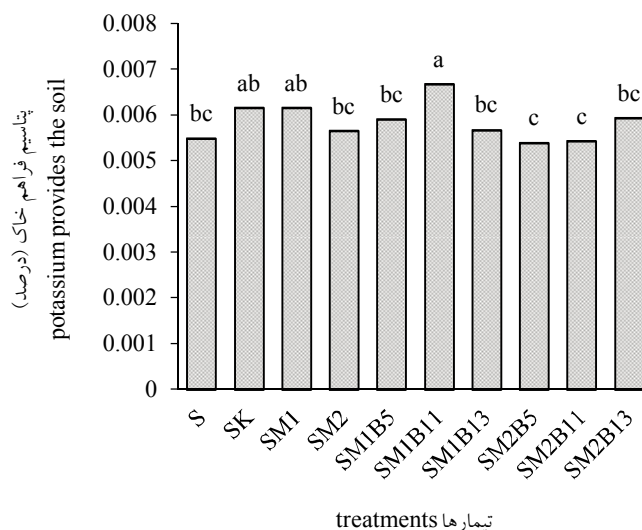
Figure 4. Comparison of the mean effect of tested treatments on potassium concentration in shoots (a) and potassium concentration in roots (b) in terms of (%).

(Negative control soil (S), positive control soil (potassium sulfate fertilizer (SK)), level 2500 mg / kg mineral biotite (SM1), level 5000 mg / kg mineral biotite (SM2) and three top isolates B5, B11 and B13)

نسبت داد (۳۱). سینگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که احتمالاً افزایش جذب پتاسیم در گیاه به دلیل تحرک رشد ریشه و یا طولی شدن تارهای کشنده به وسیله باکتری‌ها و سایر ریزجانداران باشد (۶۵). از مهم‌ترین عوامل کم بودن غلظت پتاسیم در گیاه در برخی تیمارهای حاوی کانی بیوتیت می‌توان به تخلیه بخش سهل‌الوصول پتاسیم بین‌لایه‌ای، خشبی شدن ریشه‌ها و کاهش توانایی گیاه در جذب پتاسیم اشاره کرد (۴۹).

تأثیر تیمارهای آزمایش بر غلظت پتاسیم فراهم خاک: نتایج نشان داد که پس از برداشت گیاه غلظت پتاسیم فراهم خاک در تیمار SM1B11 (۰/۰۰۶ درصد) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد منفی (۰/۰۰۵ درصد) بود ($P < 0/05$). سایر تیمارها به‌جز SM2B5 و SM2B11 نیز باعث افزایش غلظت پتاسیم فراهم خاک نسبت به شاهد منفی شدند. اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم با افزایش مقدار پتاسیم فراهم خاک (محلول و تبادل) (شکل ۵) موجب دسترسی بیش‌تر گیاه به پتاسیم و افزایش غلظت پتاسیم در ریشه می‌شود. ریشه گیاه به همراه باکتری‌های آزادکننده پتاسیم با تولید و ترشح اسیدهای آلی، پایین آوردن pH و به وجود آوردن محیط اسیدی در ریزوسفر توانسته است باعث هوادهی کانی سیلیکاتی و جذب پتاسیم غیرتبدلی آن شود. افزایش میزان انحلال پتاسیم به واسطه باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم موجب دسترسی بیش‌تر و بهتر گیاه و در نهایت جذب آن می‌شود (۷۴). افزایش بیش‌تر غلظت پتاسیم در اندام هوایی نسبت به ریشه نشان‌دهنده تحرک مناسب پتاسیم در آوند آبکش و انتقال زیاد به اندام‌های هوایی است (۷۳). لین و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که آزادسازی زیاد پتاسیم از میکا و سپس جذب آن توسط گیاه به دلیل تلقیح با جدایه‌های باکتریایی حل‌کننده پتاسیم را می‌توان به افزایش جمعیت باکتری‌ها در ریشه و خاک ریزوسفر



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایش بر غلظت پتاسیم فراهم خاک (عصاره‌گیری شده با استات آمونیوم).

(خاک شاهد منفی (S)، شاهد مثبت (کود سولفات پتاسیم (SK))، سطح ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی بیوتیت (SM1)، سطح ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کانی بیوتیت (SM2) و سه جدایه برتر B5، B11 و B13)

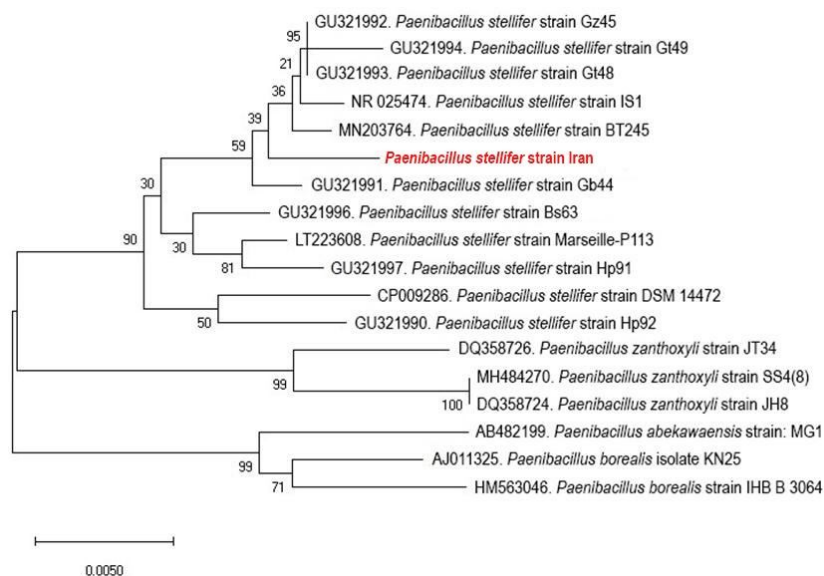
Figure 5. Comparison of the mean effect of experimental treatments on soil potassium concentration (extracted with ammonium acetate).

(Negative control soil (S), positive control soil (potassium sulfate fertilizer (SK)), level 2500 mg / kg mineral biotite (SM1), level 5000 mg / kg mineral biotite (SM2) and three top isolates B5, B11 and B13)

افزایش یافت (۶۲). مقدار کم‌تر پتاسیم خاک در تیمارهای SM2B5 و SM2B11 احتمالاً به دلیل جذب بیش‌تر پتاسیم توسط گیاه ذرت در این تیمارها باشد.

آنالیز شناسایی مولکولی جدایه برتر (B11):
براساس نتایج به‌دست آمده از شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای جدایه B11 به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. سویه مورد مطالعه در کنار سایر سویه‌های پانی‌باسیلوس در یک شاخه با میزان Bootstrap (ضریب حدود اطمینان شاخه‌ها) ۵۹ درصد قرار گرفت. گونه *Paenibacillus stellifer Iran* به‌همراه گونه‌های ایرانی و غیر ایرانی دیگر از این گونه یک کلید (شاخه) را تشکیل داده است.

پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که غلظت پتاسیم فراهم خاک با تلقیح باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۴۸، ۶۵). هان و لی (۲۰۰۶) اثر تلقیح باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم را بر جذب پتاسیم مواد معدنی سنگی در رشد لفل و خیار بررسی کردند. این پژوهشگران گزارش نمودند که در تیمارهای حاوی باکتری، پتاسیم قابل‌دسترس خاک در این دو گیاه نسبت به شاهد به‌ترتیب ۱۴/۳ و ۱۱/۵ درصد افزایش یافت (۲۴). شنگ و همی (۲۰۰۶) هم در پژوهشی گزارش نمودند که با تلقیح *Bacillus edaphicus* در خاک حاوی کانی‌های ایلیت و فلدسپار پتاسیم‌دار، به‌طور معنی‌داری میزان پتاسیم قابل دسترس خاک از ۷۰/۶ میلی‌گرم در کیلوگرم به ۸۷/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم



شکل ۶- درخت فیلوژنی توسط نرم‌افزار MEGA7 بر اساس توالی ژن 16SrRNA رسم شده است که رابطه بین سویه مورد مطالعه و سایر سویه‌ها را نشان می‌دهد. مقادیر Bootstrap بدست آمده با ۱۰۰۰ تکرار در شاخه‌ها نیز مشخص شده است. نوار مقیاس نشان‌دهنده ۰/۰۰۵ تعویض نوکلئوتید در هر سایت است. توالی مرجع از ژن بانک با شماره دسترسی که در ابتدا آورده شده است بدست آمده است

Figure 6. The phylogenetic tree was drawn by MEGA7 software based on the 16SrRNA gene sequence that shows the relationship between the studied strain and other strains. Bootstrap values obtained with 1000 repetitions in branches are also specified.

The scale bar indicates 0.005 nucleotide substitution at each site. The reference sequence was obtained from the gene bank with the access number given at the beginning

نتیجه گیری

تمامی جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه با گذشت زمان قادر به آزادسازی پتاسیم معدنی از کانی بیوتیت و همچنین کاهش میزان pH در شرایط آزمایشگاهی بودند اما این توانایی در میان آن‌ها متفاوت بود. بیش‌ترین میزان آزاد سازی پتاسیم و کاهش pH در محیط کشت به ترتیب مربوط به جدایه‌های B5, B11 و B13 بود. تلقیح باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در خاک موجب بهبود رشد گیاه و افزایش غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت شدند. به طوری که جدایه B11 از نظر بهبود رشد گیاه و افزایش غلظت پتاسیم در گیاه کارایی مشابه با کود سولفات پتاسیم داشت و به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. تعیین توالی نشان داد که جدایه برتر مورد نظر به گونه‌ای از *Paenibacillus stellifer strain BT245* با میزان ۹۹/۳۷ درصد شباهت تعلق دارد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در حضور کانی بیوتیت می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب و دوست‌دار محیط زیست برای کودهای شیمیایی پتاسه مثل سولفات پتاسیم در نظر گرفته شود.

همان‌طور که در شکل ۶ مشخص است به نظر می‌رسد گونه *Paenibacillus stellifer strain BT245* با شماره دسترسی MN203764 گروه خواهری این کلید باشد. این نتیجه بیانگر آن است که سویه مورد نظر به گونه‌ای از *Paenibacillus stellifer strain BT245* با میزان ۹۹/۳۷ درصد شباهت تعلق دارد. و همچنین از نظر فاصله ژنتیکی نیز کم‌ترین فاصله (۰/۰۰۵) را با این سویه دارد. در نهایت گونه مورد نظر با شماره دسترسی MT072206 در پایگاه NCBI ثبت شد. هیو و همکاران (۲۰۰۶) دو سویه (KNP413 و KNP414) که توانایی حل‌کنندگی پتاسیم و فسفات را داشتند از خاک جدا کردند و پس از استخراج DNA و توالی‌یابی مشخص شد که سویه‌ها به جنس پانی‌باسیلوس برای مثال *P. mucilaginosus* طبقه‌بندی شدند (۲۶). پژوهشگران دیگر نیز پس از شناسایی مولکولی دریافتند که نمونه مورد مطالعه شباهت زیادی به پانی‌باسیلوس دارد (۳۵، ۱۷).

منابع

1. Archana, D.S. 2007. Studies on potassium solubilizing bacteria. M.Sc. thesis. Dharwad University of Agricultural Sciences. 72p.
2. Archana, D.S., Nandish, M.S., Savalagi, V.P., and Alagawadi, A.R. 2013. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. Bioinfolet - A Quarterly Journal of Life Sciences. 10: 248-257.
3. Ashrafi Saedloo, S., Rasouli-Sadaghiani, M.H., Asadzadeh, F., and Barin, M. 2017. Quantitative modeling of potassium release from feldspar by *Bacillus* bacteria. Iranian Journal of Soil and Water Research. 45: 1. 95-103. (In Persian)
4. Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. Biology and Fertility of Soils. 40: 188-193.
5. Badr, M.A. 2006. Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. Journal Applied Science Research. 2: 1191-8.
6. Bagyalakshmi, B., Ponmurugan, P., and Balamurugan A. 2012a. Impact of different temperature, carbon and nitrogen sources on solubilization efficiency of native potassium solubilizing bacteria from tea (*Camellia sinensis*). Journal of Biological Research. 3: 36-42.

7. Bahadur, I., Meena, V.S., and Kumar, S. 2014. Importance and application of potassic biofertilizer in Indian Agriculture. International Research Journal of Biological Sciences. 12: 80-85.
8. Basak, B.B., and Biswas, D.R. 2008. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by *Sudan (Sorghum vulgare Pers)* grown under two Alfisols. Plant and Soil. 317: 235-255.
9. Basak, B.B., Sarkar, B., Biswas, D.R., Sarkar, S., Sanderson, P., and Naidu, R. 2017. Biointervention of naturally occurring silicate minerals for alternative source of potassium: challenges and opportunities. Advances in Agronomy. 141: 115-145.
10. Basavesha, K.N. 2013. Studies on Bacteria Solubilizing both Potassium and Phosphorus and Their Effect on *Maiza (Zea Mays L.)*. MSc thesis. Dharwad University of Agricultural Sciences. 96p.
11. Black, W.C., and Duteau, N.M. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. P 361-373. In: J.M., Crampton, C.B., Beard and C. Louis (eds.), the Molecular Biology of Insect Disease Vectors. Springer, Dordrecht.
12. Bremner, J.M., and Mulvaney, C.S. 1982. Nitrogen-total. P 595-624, In: A.L. Page (Ed.), Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI.
13. Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. P 891-901, In: C.A. Black (Ed.), Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI.
14. Darsouei, R., Karimi, J., Ghadamyari, M., and Hosseini, M. 2018. Natural Enemies of the *Sugar Beet Army Worm, Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae)* in Northeast Iran. Entomological News. 127: 446-464.
15. Das, D.K. 2011. Introductory Soil Science (3rd Edition). Kalyani Publishers, Ludhiana (India). 645p.
16. Deilamirad, M., Sarikhani, M.R., and Oustan, S.H. 2017. Effect of Potassium Releasing *Pseudomonads* on Growth and K Uptake of *Tomato* in Two Soils with Different Amount of Available K. Journal of water and soil (Agricultural Sciences and Technology). 31: 4. 1159-1170. (In Persian)
17. Dorjdor, J., Yazdansetad, S., Arzanesh, M.H., and Ajoudanifar, H. 2014. Screening of indigenous potassium-solubilizing bacterial strains and evaluation of their ability in solubilization of absorbable potassium. Journal of Microbial World. 7: 3. 252-264. (In Persian)
18. Etesami, H., Emami, S., and Alikhani, H.A. 2017. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 17: 897-911.
19. Gee, G.H., and Bauder, J.W. 1986. Particle size analysis. P 383-409, In: A. Klute (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2 physical properties, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
20. Ghadamkhani, A., Enayatizamir, N., and Norouzi Masir, M. 2017. Effects of potassium solubilizing bacteria on potassium uptake and some growth indicators of *wheat* under greenhouse conditions. Journal of Soil Management and Sustainable Production. 7: 3. 139-152. (In Persian)
21. Girgis, M.G.Z., Khalil, H.M., and Sharaf, M.S. 2008. In vitro evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some *Bacillus* strains. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2: 68-81.
22. Haghghi, H., Sam Daliri, M., Mobaser, H.R., and Abbas Moosavi, A. 2011. Effect of different nitrogen and potassium fertilizer levels on quality and quantity yield of flue-cured *tobacco (Coker 347)*. World Journal Applied Science. 15: 941-946.

23. Han, H.S., and Lee, K.D. 2005. Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of *eggplant*. Research Journal Agricultural Biology Science. 1: 176-180.
24. Han, H.S., and Lee, K.D. 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: 130-136.
25. Hatami, H., Karimi, A.R., Fotovat, A., and Khademi, H. 2013. The effect of barium chloride on potassium release in a number of potassium-bearing silicate minerals and study Potassium release kinetics in these minerals. Journal of Water and Soil. 27: 4. 732-741. (In Persian)
26. 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: 983-990.
27. Jones, J.B. 2001. Laboratory Guide for Conduction soil tests and plant Analysis. U.S: CRC press LLC. 363p.
28. Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., and Samiyappan, R. 2010. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of *banana (Musa spp)* under field conditions. Applied Soil Ecology. 45: 71-77.
29. Keshavarz Zarjani, J., Aliasgharzad, N., Oustan, S.H., and Emadi, S.M. 2013. Release of potassium and iron from biotite and phosphorus minerals from tricalcium phosphate by seven strains of bacteria in vitro. Iranian of Soil Research (Formerly Soil and Water Sciences). 27: 4. 1-10. (In Persian)
30. Khamwan, S., Boonlue, S., Riddech, N., Jogloy, S., and Mongkolthanaruk, W. 2018. Characterization of endophytic bacteria and their response to plant growth promotion in *Helianthus tuberosus* L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 13: 153-159.
31. Lin, Q.M., Rao, Z.H., Sun, Y.X., Yao, J., and Xing, L.J. 2002. Identification and practical application of silicate dissolving bacteria. Agricultural Sciences in China. 1: 81-85.
32. Lian, B. 1998. A study on how silicate bacteria GY92 dissolves potassium from illite. Acta Mineralogica Sinica. 18: 234-238.
33. Lian, B., Wang, B., Pan, M., Liu, C., and Teng, H.H. 2008. Microbial release of potassium from K bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. Geochimica ET Cosmochimica Acta. 72: 87-98.
34. Liu, W., Xu, X., Wu, S., 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.
35. Liu, D., Lian, B., and Dong, H. 2012. Isolation of *Paenibacillus sp.* and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. Geomicrobiology Journal. 29: 413-421.
36. Loeppert, R.H., and Sparks, D.L. 1996. Carbonate and gypsum. P 437-474, In: D.L. Sparks (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 3 chemical methods, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
37. Malakouti, M.G., Moshiri, F., and Gheybi, M.N. 2006. Optimal concentration of nutrients in soil and some crops and orchards. Soil and Water Research Institute. 21p. (In Persian)
38. Manning, D.A.C., Baptista, J., Limon, M.S., and Brandt, K. 2017. Testing the ability of plants to access potassium from framework silicate minerals. Science of the Total Environment. 574: 476-481.
39. Maurya, B.R., Meena, V.S., and Meena, O.P. 2014. Influence of Inceptisol and Alfisol's Potassium Solubilizing Bacteria (KSB) isolates on release of K from waste mica. Vegetos. 27: 181-187.
40. Meena, V.S., Maurya, B.R., and Verma, J.P. 2014a. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? Microbiology Research. 169: 337-347.

41. Meena, V.S., Maurya, B.R., and Bahadur, I. 2014b. Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica. *Bangladesh Journal of Botany*. 43: 235-237.
42. Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., and Bajpai, V.K. 2015. Potassium Solubilizing Rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*. 81: 340-347.
43. Mohammadi Kashka, F., Pirdashti, H., Yaghoobian, Y., and Bakhshandeh, E. 2016. Evaluation of Growth and Yield Stability of *Wheat* by Application of *Trichoderma* and *Enterobacter sp.* *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*. 26: 4. 1-15. (In Persian)
44. Nihala Jabin, P.P., and Ismail, S. 2017. Solubilization of Insoluble Potassium by Different Microbial Isolates In vitro Condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6: 3600-3607.
45. Olsen, S.R., and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. P 4013-4030, In: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 1 chemical and biological properties*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
46. Pan, B., Zhang, F., and Smith, D.L. 1998. Genistein addition to the rooting medium of *soybean* at the onset of nitrogen fixation increases nodulation. *Journal of Plant Nutrition*. 21: 8. 1631-1639.
47. Park, M., Singvilay, O., Seok, Y., Chung, J., Ahn, K., and SA, T. 2003. Effect of phosphate solubilizing fungi on P uptake and growth to *tobacco* in rock phosphate applied soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 36: 233-238.
48. Pramanik, P., Goswami, A.J., Ghosh, S., and Kalita, S. 2018. An indigenous strain of potassium-solubilizing bacteria *Bacillus pseudomycooides* enhanced potassium uptake in *tea* plants by increasing potassium availability in the mica waste-treated Soil of North-east India. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. 1364-5072.
49. Rahimzadeh, N., Olamaei, M., Khormali, F., Dordipour, E., and Amini, A. 2013. The effect of silicate dissolving bacteria on potassium release from glauconite in *Canola (Brassica napus)* rhizosphere. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*. 3: 2. 169-185. (In Persian)
50. Ramarethinam, S., and Chandra, K. 2005. Studies on the effect of potash solubilizing/mobilizing bacteria *Frateruria Aurania* on *brinjal* growth and yield. *Pestology Journal*, 11: 35-39.
51. Ranjbar, R., Sepehr, E., Samadi, A., Rasouli Sadagiani, M.H., Barin, M., and Dovlati B. 2019. Isolation of Silicate Minerals-Solubilizing Bacteria from *Tobacco (Nicotiana tabacum L.)* Rhizosphere and Evaluation of their Efficiency on Soil Potassium Release. *Journal of Water and Soil (Agricultural Sciences and Technology)*. 33: 3. 490-500. (In Persian)
52. Rasouli-Sadaghiani, M.H., Sadeghi, S., Barin, M., Sepehr, E., and Dovlati, B. 2016. The Effect of Silicate Solubilizing Bacteria on Potassium Release from Mica Minerals and its Uptake by *Corn* Plants. *Journal of Soil and Water Sciences*. 20: 89-102. (In Persian)
53. Saber, M.S.M., and Zanati, M.R. 1981. Effectiveness of inoculation with silicate bacteria in relation to the potassium content of plants using the intensive cropping technique. *Agricultural Research Review*. 59: 279-292.
54. Saha, M., Maurya, B.R., Meena, V.S., Bahadur, I., and Kumar, A. 2016. Identification and characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from Indo-Gangetic Plains of India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 7: 202-209.
55. Sarikhani, M.R., Ebrahimi, M., Oustan, S.H., and 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. Pp: 695-700.
56. Savostin, P. 1971. Microbial Transformation of Silicates. *Pflanzenernahr Bbodenk.* 132: 37-45.
57. Sen, A., Padhan, D., and Poi, S.C. 2016. Isolation and characterization of mineral potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soils. *Journal of Applied and Natural Science.* 8: 2.705-710.
58. Setiawati, T.C., and Mutmainnah, L. 2016. Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms from *Sugarcane* Rhizosphere. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* 9: 108-117.
59. Sheng, X.F. 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.
60. Sheng, X.F., and Huang, W.Y. 2002. Study on the conditions of potassium release by strain *NBT* of silicate bacteria. *Science Agricultural Sinica.* 35: 673-677.
61. Sheng, X.F., Zhao, F., He, L.Y., Qiu, G., and Chen, L. 2008. Isolation, characterization of silicate mineral solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surface of weathered feldspar. *Canadian Journal of Microbiology.* 54: 1064-1068.
62. Sheng, X.F., and He, L.Y. 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: 66-72.
63. Sheng, X., and Huang, W. 2002. Mechanism of potassium release from feldspar affected by the sprain *Nbt* of silicate bacterium. *Acta Pedologica Sinica.* 39: 863-871.
64. Sindhu, S.S., Parmar, P., and Phour, M. 2014. Nutrient cycling: potassium solubilization by microorganisms and improvement of crop growth. P 175-198. In: N. Parmar, and A. Singh, (eds.), *Geomicrobiology and Biogeochemistry.* Springer Berlin Heidelberg.
65. 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: 1236-1251.
66. Srinivasarao, C., Rupa, T.R., Subba Rao, A., Ramesh, G., and Bansal, S.K. 2006. Release kinetics of nonexchangeable potassium by different extractants from soils of varying mineralogy and depth. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 37: 473-491.
67. Stillings, L.L., Drever, S.L., Brantley, Y.S., and Oxburgh, R. 1996. Rates of feldspar dissolution at pH 3–7 with 0–8 mm oxalic acid. *Chemical. Geology.* 132: 79-90.
68. 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.
69. Suzuki, T., and Yamasato, K. 1994. Phylogeny of spore-forming lactic acid based on 16S rRNA gene sequences bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 115: 13-18.
70. Walkley, A., and Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science.* 37: 29-38.
71. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173: 697-703.
72. Wu, F., Li, J., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, S., Shi, X., Li, L., and Liang, J. 2019. Effects of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Growth, Photosynthesis, and Nutrient Uptake of *Camellia oleifera Abel.* *Journal Forests.* 348: 1-10.

73. Yuan, L., Huang, J.G., Li, X.L., and Christie, P. 2004. Biological mobilization of potassium from clay minerals by *ectomycorrhizal* fungi and eucalypt seedling roots. *Plant and Soil*. 262: 351-361.
74. Zeng, X., Liu, X., Tang, J., Hu, S., Jiang, P., and Li, W. 2012. Characterization and potassium solubilizing ability of *Bacillus circulans* ZI-3. *Advanced Science Letters*. 10: 173-176.
75. Zhang, C., and Kong, F. 2014. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *tobacco* rhizospheric soil and their effect on *tobacco* plants. *Applied Soil Ecology*. 82: 18-25.
76. Zhao, F., Sheng, X., Huang, Z., and He, L. 2008. Isolation of mineral potassium-solubilizing bacterial. Strains from agricultural soils in Shandong province. *Biodiversity Science*. 16: 593-600.



Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from the rhizosphere of different plants of the Neishabur region and determine their potential for increasing corn growth and development

A. Mohammadzadeh¹, A. Lakzian^{*2}, A.R. Karimi² and S.S. Hosseini³

¹M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,

²Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,

³Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 12.09.2020; Accepted: 04.17.2021

Abstract

Background and Objectives: Potassium, such as nitrogen and phosphorus, is a macronutrient that plays an important role in plant growth. Large amounts of potassium in the soils comes from the silicate minerals such as phyllosilicate minerals. Potassium in the structure of silicate minerals is not available for plants. Inoculation of potassium solubilizing bacteria as biofertilizers is one of the most important biological approaches to provide potassium for plants. The study aimed to isolate, select, and identify the most efficient potassium solubilizing bacteria and their effect on the availability of potassium in a soil amended with biotite.

Materials and Methods: In the present study, 15 isolates of bacteria from rhizosphere of five different plants (wheat, tomato, alfalfa, corn and basil) were isolated and purified. The determination of potassium solubility of isolates was performed in two separate parts. In the first part, the solubility of potassium by bacterial isolates in liquid Alexandrova culture medium was performed in a completely randomized design with the factorial arrangement in three replications. Experimental factors included 15 bacterial isolates and 3 incubation times (7, 14 and 21 days). The second part of the study was conducted in a completely randomized design to evaluate the effect of selective isolates of potassium-solubilizing bacteria on the growth of single cross cultivar 640 maize in a soil with sandy loam texture class. Experimental treatments included positive control (potassium sulfate fertilizer (SK)), negative control (soil without fertilizer (S)), 2500 mg/kg biotite (SM1), 5000 mg/kg biotite (SM2), B5 isolate + SM1 (SM1B5), B11 isolate + SM1 (SM1B11), B13 isolate + SM1 (SM1B13), B5 isolate + SM2 (SM2B5), B11 isolate + SM2 (SM2B11), and B13 isolate + SM2 (SM2B13). Data analysis was performed using JMP 8 software and the comparison of means was performed using the Tukey test at a probability level of 5% and graphs were drawn with Excel software.

Results: The results of the first part showed that the highest potassium content (16.4 mg / l) and the lowest pH (3.04) belonged to B11 isolates after 21 days of incubation. The results of the second part showed that the highest potassium concentration of shoot (2.81%) and root (0.956%) was observed in potassium sulfate fertilizer treatment (SK) and SM2B11 treatments, respectively. Plant height, green index, and dry weight were higher in the bacterial treatments compare to the negative control. Based on this, the B11 isolate was selected as the superior isolate. Finally, the superior isolate was identified using 16SrRNA gene sequencing and 99.37% was similar to *Paenibacillus stellifer*.

Conclusion: This study showed that potassium solubilizing bacteria can release potassium from the mineral biotite in both laboratory and greenhouse. In both experiments, B11 (*Paenibacillus stellifer*) isolate had the greatest effect on the release of mineral potassium from the mineral biotite. Therefore, its use as a biofertilizer is recommended.

Keywords: Biological fertilizers, Corn, Silicate minerals

* Corresponding Author; Email: lakzian@um.ac.ir

