تحقیقات آب و خاک ایران، دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۳۹۵-۳۸۵)

بررسی توان آزادسازی پتاسیم و فسفر برخی جدایه‌های باکتریایی در شرایط درون‌شیشه‌ای و شناسایی باکتری‌های کارآمد

شکوفه مرادی[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲*]، ناصر علی‌اصغرزاد[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲. دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳. استاد، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۰ – تاریخ بازنگری: ۳۱/ ۶/ ۱۳۹۵- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۱۸)

چکیده

پتاسیم یکی از عناصر پرمصرف ضروری برای رشد و توسعه گیاهان است و در سال‌های اخیر تأمین زیستی آن از طریق باکتری‌های آزادکننده پتاسیم در کانون توجه تحقیقات قرار گرفته است. در این آزمایش توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های سیلیکاتی، توسط چندین باکتری جداسازی شده از نمونه‌های ریزوسفری گیاهان گرامینه، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل جدایه‌های باکتریایی و دو نوع کانی میکا (بیوتیت و موسکویت) بود. پس از جداسازی باکتری‌ها از ریشه‌های ضدعفونی شده گیاهان گرامینه با استفاده از محیط کشت NFB، تعداد ۸ جدایه شاخص برای آزمایش نهایی مورد استفاده قرار گرفت. توان رهاسازی پتاسیم جدایه‌ها با بهره‌گیری از محیط کشت الکساندروف مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین میزان پتاسیم آزادشده به میزان ۱۱/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر توسط جدایه Az-8 به دست آمد که ۲۰٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت و پایین‌ترین مقدار ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توسط جدایه Az-15 مشاهده شد. به‌طور متوسط آزادکنندگی پتاسیم از کانی بیوتیت ۸۲٪ بیشتر از موسکویت مشاهده شد. در بین باکتری‌های جداسازی شده جدایه‌های Az-8، Az-12 و Az-19 توانایی بالایی در آزادسازی پتاسیم نشان دادند. همچنین در این آزمایش بین تغییرات pH و میزان رهاسازی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتریایی همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها و نتایج توالی‌یابی آنها نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به جنس *سودوموناس* می‌باشند. با توجه به نتایج امیدوارکننده آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای سویه‌های فوق، بهره‌گیری از آنها در تأمین نیاز پتاسیمی گیاهان در کشت گلخانه و مزرعه توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های آزادکننده پتاسیم، بیوتیت، موسکویت، الکساندروف، *سودوموناس*

مقدمه

اهمیت عنصر پتاسیم در کشاورزی و سلامتی انسان و حیوانات شناخته شده است. منابع اصلی پتاسیم برای رشد گیاهان در شرایط طبیعی، هوازدگی کانی‌های پتاسیم‌دار[۱] (فلدسپارها، میکاها، ایلایت و غیره) و تجزیه بقایای گیاهی و کمپوست (Compost) می‌باشد که در این میان میکاها (Mica) فراوان‌ترین منبع پتاسیم برای گیاهان هستند (Basak and Biswas, 2010). میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی در چرخه پتاسیم دارند. عناصر موجود در کانی‌ها زمانی برای گیاهان قابل استفاده خواهند بود که کانی‌ها دچار هوازدگی شوند. در این میان میکروارگانیسم‌های خاک شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها قادر به تخریب ساختار بلوری کانی‌ها و رهاسازی پتاسیم محبوس در آنها هستند (Sugumaran and Janarthanam, 2007). با توجه به اینکه شکل غالب پتاسیم در خاک به‌صورت ساختمانی و موجود در ساختار کانی‌های سیلیکاتی است درصورتی‌که این کانی‌ها به‌آرامی دچار هوازدگی زیستی (Biological weathering) و انحلال شوند پتاسیم موجود در آنها برای گیاهان قابل جذب خواهد شد. ریزجانداران در هوادیدگی کانی‌ها کارایی ویژه‌ای دارند. بسیاری از سنگ‌ها و مواد کانی دارای عناصر ضروری به‌ویژه پتاسیم و آهن برای رشد ریزجانداران و گیاهان می‌باشند. کارکرد ریزجانداران باعث آزاد شدن عناصر غذایی از کانی‌ها می‌شود (Uroz *et al*., 2009).

شماری از ریزجانداران خاک می‌توانند کانی‌هایی مانند میکاها (ایلایت) و ارتوکلازها (Orthoclase) را با ساخت اسیدهای آلی و کلات کردن عناصر، هوادیده کنند و باعث رها

* نویسنده مسئول: rsarikhani@yahoo.com

1. Feldspars, Mica, Illite

Archive of SID

www.SID.ir

شدن پتاسیم شوند (Barker *et al*., 1997). ساخت کربوکسیلیک اسید (Carboxylic acid) و پلی‌ساکاریدها (Polysaccharides) در برخی از ریزجانداران باعث آزادسازی پتاسیم از فلدسپار می‌گردد (Sheng *et al*., 2003). روی‌هم‌رفته ریزجانداران دارای چندین مکانیسم برای هوادیدگی کانی‌ها می‌باشند که آزاد کردن اسیدهای آلی (مانند سیتریک، اگزالیک و تارتاریک) و لیگاندهای دیگر و اکسید یا احیا کردن عناصر کانی‌ها از آن جمله هستند (Dong, 2010; Huang and Song, 1988). برخی از گونه‌های باکتری قادر به متحرک‌سازی و رهاسازی پتاسیم (Potassium release) در خاک می‌باشند. باکتری‌های سیلیکاتی به دلیل رهاسازی پتاسیم، سیلسیوم و آلومینیم از کانی‌های نامحلول سیلیکاتی به این نام نامگذاری شده‌اند. استفاده از باکتری‌های محرک رشد از قبیل باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم[1] (Potassium solubilizing bacteria) به خاطر فراهمی کم پتاسیم در زمین‌های زراعی در کشورهایی نظیر چین و کره مورد توجه قرار گرفته است (Han and Lee, 2005). باکتری‌های *Pseudomonas*، *Burkholderia*، *Bacillus mucilaginosus*، *B. edaphicus*، *B. circulans* و *Paenibacillus* sp. توانایی رهاسازی پتاسیم از کانی‌های حاوی پتاسیم را دارند(Sheng, 2005).

Keshavarz zarjani *et al*. (2013) اقدام به جداسازی و شناسایی شش باکتری آزادکننده پتاسیم از برخی خاک‌های ایران نمودند. توانایی همه ایزوله‌ها در حضور بیوتیت (Biotite)، موسکویت (Muscovite) و خاک اسیدشویی شده از طریق آنالیز مقادیر پتاسیم محلول بعد از گذشت ۵ روز انکوباسیون (Incubation) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس مورد آزمایش قرار گرفت. شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی ایزوله‌ها حاکی از آن بود که ۵ جدایه به گونه *B. megaterium* و یک گونه به *Arthrobacter* sp. تعلق دارد. Meana *et al*.(2015) از ریزوسفر محصولات ذرت، موز، نیشکر، سیب‌زمینی، نخود، توتون و تنباکو اقدام به جداسازی ۱۲ جدایه باکتری آزادکننده پتاسیم نمودند. جداسازی آنها بر اساس توانایی جدایه‌ها در انحلال پتاسیم از کانی‌های بیوتیت و موسکویت بود و شناسایی آنها بر اساس شناسایی مولکولی 16S rDNA صورت گرفت. نتایج آنها نشان داد که جدایه‌های *Agrobacterium tumefactions* OPVCS11 و *Rhizobium pusense* OPVS6 بالاترین انحلال پتاسیم را داشتند و همچنین نشان دادند که با کاهش قابل ملاحظه در pH محیط، انحلال پتاسیم در حضور هر دو کانی بیوتیت و موسکویت به طور چشمگیری افزایش یافت.

Liu *et al*. (2006) با انجام آزمایشی در حضور باکتری *B. mucilaginosus* تولید همزمان اسید آلی و پلی‌ساکارید را از عوامل انحلال کانی میکا توسط این باکتری دانستند. پلی-ساکارید تولیدشده توسط باکتری قادر است تا مقدار زیادی از اسیدهای آلی را به خود جذب نماید و متصل شدن پلی‌ساکارید در این وضعیت به کانی‌ها باعث ایجاد ناحیه‌ای با غلظت بالای اسیدهای آلی در نزدیکی کانی شده و به انحلال آن کمک می‌نماید. همچنین پلی‌ساکاریدها قادر به جذب سطحی SiO_2 می‌باشند که این موضوع تعادل بین فاز جامد و محلول را تحت تأثیر قرار داده و منجر به انحلال بیشتر SiO_2 و K^+ می‌شود. دو مکانیسم فوق در تجزیه کانی‌های سیلیکاتی به‌وسیله باکتری فوق مطرح می‌باشند. Sugumaran and Janarthanam (2007) در آزمایشی به بررسی میزان انحلال کانی‌های میکروکلین (Microcline)، موسکوویت و اورتوکلاز در حضور باکتری *B. mucilaginosus* MCRCp1 پرداختند و بیشترین میزان انحلال پتاسیم به مقدار ۴/۲۹ میلی‌گرم در لیتر با کانی موسکویت به دست آمد. تلقیح این باکتری با گیاه بادام‌زمینی منجر به افزایش ماده خشک به میزان ۱۲۵ درصد و میزان روغن به مقدار ۳۵/۴۱ درصد شد. آنها افزایش میزان پتاسیم قابل‌استفاده خاک را از ۸۶/۵۷ به ۹۹/۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک گزارش نمودند.

Hu *et al*. (2006) برای ارزیابی انحلال پتاسیم توسط سویه‌های KNP413 و KNP414 از کانی‌های کائولینایت (Kaolinite)، فلدسپار (Feldspar) و مونتموریلونایت (Montmorillonite) در محیط الکساندروف (Aleksandrov) به‌عنوان تنها منبع پتاسیم استفاده نمودند. آنها پس از تلقیح میکروبی و انجام انکوباسیون در شرایط دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شیک در ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ روز، میزان پتاسیم آزادشده در روشناور را اندازه‌گیری نمودند. آنها برای غربالگری باکتری‌های فوق ابتدا از طریق انحلال ۲/۵ گرم از نمونه خاک موردنظر در ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف، سوسپانسیون میکروبی تهیه نمودند، سپس به مدت ۴۸ ساعت در شرایط شیک با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تحت دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند، در ادامه تهیه سری رقت و انتقال آن بر روی پلیت حاوی محیط جامد الکساندروف صورت پذیرفت. مشاهده کلنی‌ها و انجام خالص‌سازی آنها بعد از انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای فوق انجام گرفت (Hu *et al*., 2006).

با نگاهی به تحقیقات فوق درمی‌یابیم که به‌منظور غربالگری و جداسازی و شناسایی سیلیکاباکترها (Silica

1 .Potassium solubilizing bacteria

Archive of SID

www.SID.ir

bacteria) از محیط‌های انتخابی نظیر محیط الکساندروف یا سایر محیط‌ها با حضور کانی‌های پتاسیم نظیر پودر فلدسپار، میکا، موسکویت به‌عنوان تنها منبع پتاسیم استفاده شده است (YiFeng *et al.*, 2009). جداسازی اولیه آنها در محیط‌های جامد صورت پذیرفته و ارزیابی کارایی آنها در محیط‌های مایع و همچنین در کشت‌های گلخانه‌ای یا مزرعه‌ای در حضور گیاهان مختلف به انجام رسیده است. بعضاً در مواردی جدایه‌های موجود در بانک‌های میکروبی با بکارگیری محیط‌های مناسب مورد سنجش قرار گرفته‌اند. بر این اساس در این مطالعه توانایی هشت جدایه منتخب که در مطالعات قبلی با بکارگیری محیط NFB جداسازی شده بودند برای این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند تا ضمن مشخص نمودن پتانسیل رهاسازی پتاسیم این جدایه‌ها در حضور بیوتیت و موسکویت، در نهایت جدایه‌های توانمند شناسایی شده و در کارهای تحقیقاتی پیش‌رو مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی مورداستفاده

در این آزمایش هشت جدایه باکتریایی (Az-8، Az-12، Az-13، Az-15، Az-18، Az-19، Az21 و Az-65) تهیه‌شده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز استفاده شد. گرچه هدف اصلی تحقیقِ منتج شده به این جدایه‌ها، جداسازی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم نبوده است، به همین منظور شرح کوتاهی از نمونه‌برداری خاک، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها مورداستفاده در این آزمایش داده می‌شود.

چندین نمونه خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری به همراه ریشه گیاهان گرامینه (Grasses)، از استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان، تحت کاربری‌های مختلف (مرتع و زیر کشت گندم، جو و برنج) تهیه و جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. یکی از اهداف اولیه که در پژوهش اصلی مورد توجه بوده است، جداسازی باکتری‌های اندوفیت (Endophytic bacteria) از ریشه گیاهان گرامینه، با قابلیت تثبیت نیتروژن بوده و ازآنجایی‌که تغییر رنگ آبی ناشی از تثبیت نیتروژن در محیط کشت NFB (Nitrogen free bromothymol blue) عاری از نیتروژن، روش مناسبی برای تشخیص این باکتری‌هاست، از این شاخصه به‌منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت قادر به تثبیت نیتروژن استفاده شده است (Moradi, 2016). توضیح این مطلب ضروری است که هیچ یک از محیط‌های کشت آزمایشگاهی کاملاً اختصاصی برای یک گونه خاص میکروبی نمی‌باشد و این امکان وجود دارد که سایر میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه نمونه‌های مشابه و نزدیک ازنظر تبارشناسی و فیزیولوژیکی در چنین محیط‌هایی رشد نموده و جداسازی شوند. به این صورت پتانسیل رهاسازی پتاسیم هشت جدایه از میان جدایه‌های دیگر در محیط کشت مایع الکساندروف مورد ارزیابی قرار گرفت. نحوه جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های فوق به شرح زیر بود؛ به‌منظور جداسازی باکتری‌ها از ریشه، ابتدا ریشه‌ها در زیر جریان آب شسته شدند، سپس ۰/۵ گرم از قطعات ریشه نازک و ظریف را پس از شستشو با آب مقطر استریل، با استفاده از اتانول ۹۶٪ و هیپوکلریت سدیم (Sodium hypochlorite) (وایتکس) ۰/۵٪ ضدعفونی کرده و در یک لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به‌خوبی له کرده و از سوسپانسیون به‌دست‌آمده رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-4} تهیه شد. از رقت‌های تهیه‌شده، ۱۰۰ میکرو لیتر به محیط کشت NFB نیمه‌جامد افزوده و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. پس از آن، جدایه‌هایی که توانایی تشکیل غشای بالارونده (Rising Pellicle) را داشتند، در محیط جامد NFB کشت خطی شدند و پس از رشد، کلنی‌های سفید تشکیل شده، جهت خالص‌سازی به محیط کنگورد (Congo Red) انتقال داده شدند (Tarand and Do bereiner 1979).

محیط کشت و ارزیابی آزادسازی پتاسیم

برای سنجش توان باکتری‌ها در آزادسازی پتاسیم از محیط کشت الکساندروف استفاده شد. اجزاء این محیط مطابق جدول (۱) می‌باشد. اما جهت آماده‌سازی کانی‌های بیوتیت و موسکویت (شکل ۱) به‌منظور استفاده در سنجش درون‌شیشه‌ای (In vitro) ابتدا پیش تیمار اسیدشویی کانی‌ها با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار انجام پذیرفت. به‌منظور خارج نمودن پتاسیم محلول و سهل‌الوصول از ساختار کانی‌ها، قبل از افزودن کانی در محیط کشت از شستشو با آب و اسید استفاده شد. با انجام این تیمار آزادسازی پتاسیمی که سخت رهاشونده است بر عهده باکتری خواهد بود. از کانی‌های اسیدشویی شده به میزان ۶۰ میلی‌گرم به هر ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط الکساندروف افزوده شد (Sarikhani, 2016).

شکل ۱. کانی‌های بیوتیت و موسکویت مورداستفاده در آزمایش

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. اجزای محیط کشت الکساندروف (Aleksandrov) و پیکوفسکایا (Pikovskaya)

اجزای محیط کشت	الکساندروف	پیکوفسکایا
	مقدار مورد نیاز (گرم بر لیتر)	مقدار مورد نیاز (گرم بر لیتر)
گلوکز	۵	۱۰
تری‌کلسیم‌فسفات	۲	۵
میکا (بیوتیت یا موسکویت)	۲	-
عصاره مخمر	-	۰/۵
سولفات آمونیوم	-	۰/۵
کلرید پتاسیم	-	۰/۲
سولفات منگنز	-	۰/۰۰۰۱
سولفات آهن	-	۰/۰۰۰۱
سولفات منیزیم	۰/۵	۰/۱
کلرید آهن	۰/۰۰۵	-
کلرید کلسیم	۰/۱	-

برای اندازه‌گیری میزان پتاسیم آزادشده توسط باکتری‌ها، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل تیمارهای باکتری و کانی‌های میکا (بیوتیت و موسکویت) بود. بدین منظور از باکتری‌های مورد آزمایش، کشت شبانه (Overnight) در محیط مایع NB (Nutrient broth) تهیه شد و از آن ۲ میلی‌لیتر به هر ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت الکساندروف مایع (جدول ۱) که به‌طور مجزا شامل کانی‌های بیوتیت یا موسکویت به‌عنوان منبع پتاسیم بودند، افزوده شد. برای نمونه شاهد بدون تلقیح میکروبی، از ۲ میلی‌لیتر NB استریل استفاده شد. ارلن‌ها به مدت یک هفته در شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، ارلن‌ها از شیکر خارج شده و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. محلول زلال رویی جدا شده و به لوله‌های تمیز انتقال داده شدند. پس از اندازه‌گیری pH محلول روشناور با استفاده از pH متر، میزان پتاسیم آزادشده در محیط الکساندروف توسط جدایه‌های باکتریایی با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد. در پایان میزان آزادکنندگی پتاسیم جدایه‌ها از طریق مقایسه با منحنی استاندارد تهیه‌شده توسط KCl محاسبه شد (Jones, 2001).

اندازه‌گیری توان انحلال فسفات

به‌منظور ارزیابی توان انحلال فسفات جدایه‌ها از منبع تری-کلسیم فسفات (Tricalcium phosphate) و محیط کشت پیکوفسکایا (جدول ۱) استفاده شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار انجام شد. از جدایه‌ها کشت شبانه در محیط مایع NB تهیه شد و از سوسپانسیون باکتریایی ۵۰۰ میکرو لیتر به هر ارلن حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت پیکوفسکایا افزوده شد (SobbaRao, 1999). در تیمار شاهد بدون تلقیح میکروبی نیز ۵۰۰ میکرو لیتر محیط NB استریل استفاده شد. ارلن‌ها به مدت ۶ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس و شیک ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از انکوباسیون، ارلن‌ها از شیکر خارج شدند و در دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول زلال رویی به لوله‌های شیشه‌ای تمیز انتقال داده شد و به هر کدام ۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر معرف زرد (Nitro-vanado-molybdate) افزوده شد. پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر، میزان جذب نمونه‌ها قرائت شد. در پایان میزان حلالیت فسفر جدایه‌ها از طریق مقایسه با منحنی استاندارد تهیه‌شده توسط KH_2PO_4 محاسبه شد (Olsen and Sommers, 1982).

شناسایی مولکولی

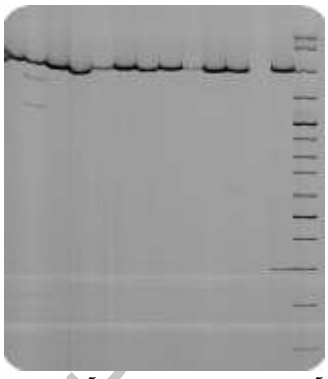
شناسایی جدایه‌هایی که توان آزادکنندگی پتاسیم آنها بالاتر بود مورد توجه قرار گرفت و بدین منظور اقدام به شناسایی مولکولی مبتنی بر تکثیر ژن 16S rDNA شد و از آغازگرهای 24F و 1525R استفاده شد (جدول ۲). برنامه PCR (Polymerase Chain Reaction) به‌کاررفته دارای ۳۰ چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) Felexigene این چرخه‌ها شامل یک چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه، در پی آن ۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، دمای ۵۳ درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای یک دقیقه و دمای فراوان شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد. یادآور می‌شود که برای انجام PCR از تک کلنی باکتری‌ها بهره‌گیری شد و بدین گونه از استخراج DNA ژنومی باکتری چشم‌پوشی شد. ابتدا ۳۰ میکرو لیتر آب دیونیزه استریل را داخل تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته، سپس لوپ مستقیم استریل شده در شعله را به کلنی تماس داده و به داخل آب انتقال داده، آنگاه مدت ۱۰-۵ دقیقه در آب جوشانده تا DNA باکتری در محلول آزاد شود. با فراهم نمودن سایر اجزاء PCR تنها ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون حاوی DNA به آن انتقال داده شد. نوارهای پدیدار شده (نزدیک ۱۵۰۰ جفت باز) پس از ران شدن محصول PCR بر روی ژل آگاروز (Agarose gel) و اطمینان از تکثیر باند موردنظر بقیه DNA تکثیرشده از

Archive of SID
www.SID.ir

قطعه رمزکننده 16S rRNA جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲). پس از توالی‌یابی نمونه‌ها توالی‌های موردنظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI، BLAST-n شدند و به بررسی یافته-های آنها پرداخته شد (Sarikhani, 2014).

جدول ۲. آغازگرهای عمومی برای تکثیر بخش 16S rDNA باکتری‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای پیوند
F۲۴	’۳’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ۵	۵۳T_m:
R۱۵۲۵	’۳’ AAGGAGGTGATCCAGCCGCA ۵	



شکل ۲. تصویر ژل آگاروز مربوط به باند به‌دست‌آمده از تکثیر ژن 16S rDNA جدایه‌های باکتریایی

شناسایی بیوشیمیایی

به‌منظور تکمیل شناسایی باکتری‌ها پس از انجام شناسایی مولکولی و مشخص شدن جنس هر جدایه اقدام به شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها با انجام برخی آزمون‌های ساده بیوشیمیایی نظیر تست اکسیداز، نیترات، سیترات، اوره‌آز، نشاسته، قندها، ژلاتیناز، ایندول، تریپتوفان و تولید سولفید هیدروژن شد. تست‌های بیوشیمیایی منطبق با روش بکار رفته توسط (Khoshrou *et al.*, 2014) انجام شد. به دلیل شرح کامل این روش‌ها در منبع فوق از آوردن توضیحات اضافی صرف نظر شده است.

طرح آزمایشی

برای اندازه‌گیری میزان پتاسیم آزادشده توسط باکتری‌ها، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. همچنین آزمایش ارزیابی توان انحلال فسفات جدایه‌ها از منبع تری‌کلسیم فسفات به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

هشت جدایه مورداستفاده در این آزمایش از میان ۲۴ جدایه انتخاب شدند. به‌منظور تائید نتایج قبلی و ارزیابی توان آزادکنندگی پتاسیم جدایه‌های برتر در حضور کانی‌های بیوتیت و موسکویت، آزمایش حاضر صورت گرفت.

ارزیابی رهاسازی پتاسیم

تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر فاکتورهای مورد آزمایش شامل جدایه‌های باکتریایی و کانی میکا (بیوتیت و موسکویت) و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور در میزان آزادسازی پتاسیم، در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳. تجزیه واریانس آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌ها

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۸	۵۷/۰۱۵**
منبع پتاسیم	۱	۲۴۰/۷۹۳**
باکتری × منبع پتاسیم	۸	۱۰/۴۸۸**
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۳۰۶
ضریب تغییرات	٪۷/۶۵	

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

پس از مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده مشاهده شد که جدایه‌های Az-12، Az-19 و Az-65 با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۳). جدایه‌های Az-13، Az-15 و Az-18 مقادیر بسیار پایینی به خود اختصاص دادند به صورتی که ۶۹-۵۳٪ نسبت به شاهد کاهش نشان دادند. بالاترین میزان آزادسازی پتاسیم که ۲۰٪ نسبت به شاهد افزایش داشت، ۱۱/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر بود که در جدایه Az-8 مشاهده شد که پایین‌ترین مقدار pH نیز در این جدایه به دست آمد. جدایه‌های Az-12 و Az-19 نیز افزایش نشان دادند اما با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند و به ترتیب نسبت به شاهد ۱۱ و ۴ درصد افزایش داشتند. پایین‌ترین میزان آزادسازی پتاسیم، ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر بود که در جدایه Az-15 مشاهده شد و بیشترین کاهش (۶۹٪) را در مقایسه با شاهد نشان داد. به نظر این جدایه‌ها پتاسیم محلول در محیط کشت را در بیوماس میکروبی خود جذب نموده و همین دلیلی بر کاهش میزان پتاسیم قرائت‌شده می‌باشد. اما در مورد برخی از جدایه‌های آزادکننده پتاسیم تولید اسیدهای آلی، عوامل کلات‌کننده

Archive of SID

www.SID.ir

(Chelating agents)، تولید پلی‌ساکاریدها و غیره به‌عنوان عواملی مؤثر در رهاسازی پتاسیم گزارش شده است (Dong, Sheng *et al*., 2003; 2010). نتایج آزمایش نشان داد که بین pH اندازه‌گیری شده و رهاسازی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتریایی، علی‌رغم انتظار، همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده نشد ($P> 0.05$ و $r = 0.12$). تنها در جدایه Az-8 بالاترین میزان رهاسازی پتاسیم و پایین‌ترین میزان pH به دست آمد که می‌توان گفت یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای تجزیه کانی‌های بیوتیت و موسکویت و انحلال بیشتر پتاسیم توسط این جدایه باکتری، اسیدی کردن محیط و تولید یون H^+ بوده است. درحالی‌که در سایر تیمارهای باکتری این رابطه معکوس مشاهده نشد. در برخی مطالعات مشابه نیز هیچ‌گونه تغییری در pH محیط‌های کشت تلقیح شده در طی مدت انکوباسیون مشاهده نکردند. (Keshavarz zarjani *et al*., 2013) گزارش کردند که در محیط کشت حاوی بیوتیت در طول ۵ روز انکوباسیون هیچ تغییری در pH مشاهده نشد. آنها احتمال دادند که این امر احتمالاً به خاطر وجود ناخالصی‌های اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و سدیم در این کانی بوده است که در اثر هوازدگی، این ترکیبات آزاد و وارد محیط کشت شده است و در نتیجه موجب قلیایی شدن محیط کشت در اثر تولید یون OH و مانع از اسیدی شدن محیط کشت شده است. در تحقیقی دیگر Sugumaran and Janarthanam, (2007) گزارش کردند که در pH محیط کشت حاوی موسکویت، میکروکلین و یا ارتوکلاز تلقیح‌شده با *B. mucilaginosus* هیچ تغییری در طول مدت انکوباسیون رخ نداد. تحقیقات نشان دادند که توانایی باکتری‌ها در تجزیه کانی‌ها می‌تواند به علت تولید و ترشح پروتون، اسیدهای آلی، سیدروفورها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باشد (Rogers and Bennett, 2004; Liermann *et al*., 2000). لذا در میان عوامل مختلف موثر در رهاسازی پتاسیم، به نظر می‌رسد که تولید پلی‌ساکاریدها و یا ترکیبات آلی کمپلکس‌کننده (سیدروفورها) توسط جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده در این آزمایش منجر به تجزیه کانی‌های میکایی شده است.

در تمامی تیمارهای آزمایش، آزادکنندگی پتاسیم از کانی بیوتیت بیشتر از موسکویت (به‌طور متوسط ۸۲٪) مشاهده شد و البته در این میان در جدایه‌های Az-18 و Az-15 تقریباً یکسان بود (شکل ۴). آزادسازی بیشتر پتاسیم از بیوتیت نسبت به موسکویت در آزمایش‌های پیشین نیز گزارش شده است و دلیل آن را باید در ساختار تری‌اکتاهدرال (Trioctahedral) کانی نسبت به ساختار دی‌اکتاهدرال (Dioctahedral) کانی موسکویت جستجو نمود. پژوهش‌های انجام‌شده در مورد آزادشدن پتاسیم بین لایه‌ای در کانی‌های خالص نشان داده است که پتاسیم بین لایه‌ای در میکاهای تری‌اکتاهدرال آسان‌تر از میکاهای دی‌اکتاهدرال آزاد می‌شود (Shu-Xin*et al*., 2007). کانی بیوتیت نسبت به موسکویت بیشتر مستعد تغییرات زیستی یا هوادیدگی بیولوژیکی از جانب باکتری‌هاست. کارایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم با توجه به نوع باکتری و طبیعت کانی‌های حاوی پتاسیم متفاوت می‌باشد. همچنین میزان رهاسازی پتاسیم از این منابع به شرایطی نظیر pH و شرایط تهویه و حضور اکسیژن مرتبط است. برای مثال در مطالعه‌ای رهاسازی پتاسیم از کانی‌ها به ترتیب زیر بود: ایلایت> فلدسپار> موسکویت و میزان پتاسیم آزادشده ۳۵/۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. تفاوت‌ها در مقادیر به‌دست‌آمده ناشی از متفاوت بودن شرایط آزمایش‌های مختلف می‌باشد.

Hu *et al*. (2006) برای ارزیابی انحلال پتاسیم توسط سویه‌های KNP413 و KNP414 از کانی‌های کائولینایت، فلدسپار و مونت‌موریلونایت در محیط الکساندروف به‌عنوان تنها منبع پتاسیم استفاده نمودند. نتایج آنها حاکی از آن بود که انحلال پتاسیم در حضور جدایه‌ی KNP414 افزایش یافت (Hu *et al*., 2006). Parmar and Sindhu (2013) آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های ریزوسفری را در شرایط تغذیه‌ای و محیطی بررسی کردند. تلقیح ۲۰ سویه باکتری باعث آزادسازی مقدار چشمگیری پتاسیم از میکا شد. مقدار پتاسیم آزادشده توسط سویه‌های گوناگون باکتری از ۱۵ تا ۴۹ میلی‌گرم بر لیتر بود.

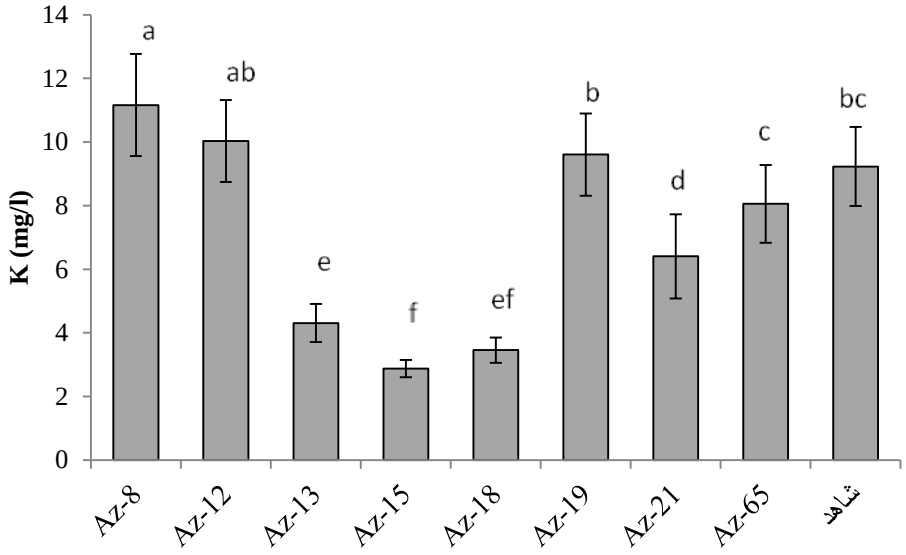
Meana *et al*. (2015) در مطالعه خود موفق به جداسازی و شناسایی باکتری‌های آزادکننده پتاسیم به نام‌های *Agrobacterium tumefaciens* OPVS11 و *Rhizobium pusense* OPVS6شدند که در میان باکتری‌های دیگر دارای بالاترین انحلال پتاسیم بودند. همچنین آنها نشان دادند که با کاهش قابل‌ملاحظه در pH محیط، انحلال پتاسیم هم در حضور بیوتیت و هم در حضور موسکویت به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش یافت و در ارزیابی آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های غربالگری شده از کانی‌های بیوتیت و موسکویت استفاده نمودند و محدوده رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت ۴۹/۷۳-۸/۸۸ میلی‌گرم بر لیتر و از موسکویت را ۱۲/۸۶-۲/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند.

ارزیابی انحلال فسفات

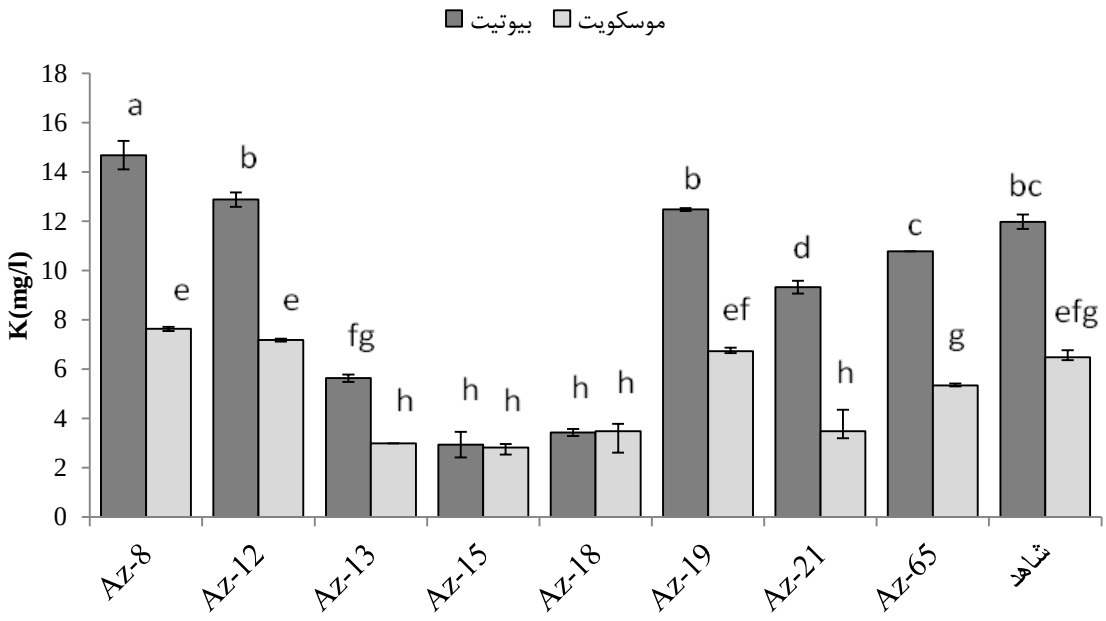
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر جدایه‌های مورد آزمایش بر انحلال فسفات در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۴).

Archive of SID

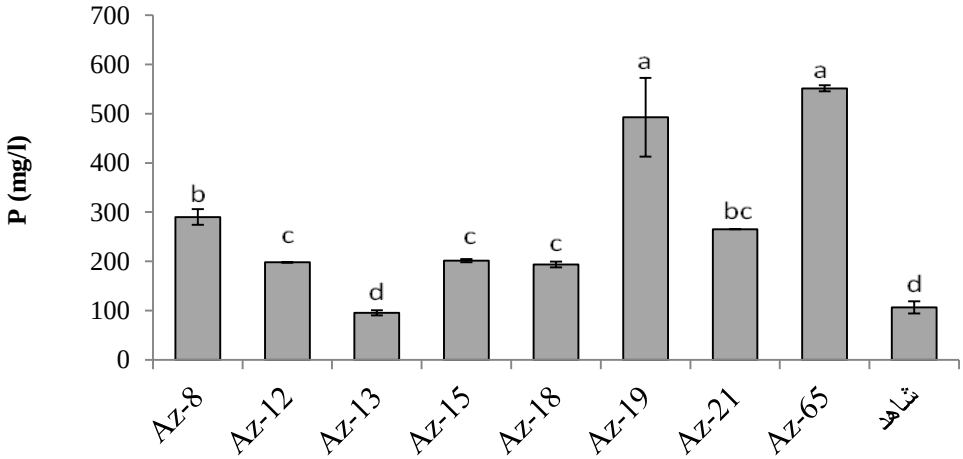
www.SID.ir



شکل ۳. آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتری



شکل ۴. آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌های باکتری در حضور بیوتیت و موسکویت (اثر متقابل باکتری در کانی میکا)



شکل ۵. انحلال فسفر توسط جدایه‌های باکتری

www.SID.ir

جدول ۴. تجزیه واریانس انحلال فسفات توسط جدایه‌ها

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۸	۰/۲۰۱**
خطای آزمایشی	۱۸	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات	٪۲/۲۵	

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

بالاترین میزان انحلال فسفر، ۵۵۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر بود که در جدایه Az-65 مشاهده شد و توانست نسبت به شاهد بیش از ۵ برابر افزایش نشان دهد. همچنین جدایه Az-19 نیز با انحلال ۴۹۲/۷ میلی‌گرم بر لیتر، ۴/۶ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد و با جدایه Az-65 در یک گروه آماری قرار گرفتند. در جدایه Az-13 کمترین انحلال فسفات مشاهده شد که ۹۵/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر بود و با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت. جدایه‌های Az-12، Az-15 و Az-18 در یک گروه آماری قرار گرفتند و توانستند ۸۹-۸۲٪ فسفر بیشتری را نسبت به شاهد حل کنند. جدایه Az-8 با جدایه Az-21 در یک گروه آماری قرار گرفتند و به ترتیب ۲/۷ و ۲/۴ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. با افزایش جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، مقدار pH ۴-۳/۲ واحد کاهش می‌یابد که می‌توان گفت انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی نتیجه‌ای از اثر ترکیبی کاهش pH و تولید اسیدهای آلی به‌ویژه اسید گلوکونیک (Gluconic acid) است (Krishnaveni, 2010; Perez *et al*., 2007). در بررسی توان انحلال فسفات توسط میکروارگانیسم‌ها از منابع معدنی مختلفی ازجمله تری‌کلسیم‌فسفات، سنگ فسفات، فلوئورآپاتیت (Fluorapatite) و هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite) استفاده شده است. اغلب گزارش‌ها حاکی از آن است که انحلال فسفر توسط جدایه‌های باکتریایی ازجمله حل‌کنندگان قوی فسفر مانند *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Rhizobium*، از منبع تری‌کلسیم‌فسفات بیش از سایر منابع است زیرا دارای انحلال‌پذیری بالاتری نسبت با سایر منابع نظیر سنگ فسفات هست (Rodriguez and Fraga, 1999). در مطالعات زیادی به انحلال فسفات به‌عنوان یکی از خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی از منابع مختلف فسفر توجه ویژه شده است و نتایج مختلفی را گزارش نمودند. Saghafi *et al*. (2014) انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم‌فسفات را برای جدایه‌های ریزوبیومی با استفاده از محیط کشت اسپربر (Sperber) مایع بررسی کردند و میزان انحلال فسفر را با روش زرد محاسبه کرده و نشان دادند که توان انحلال فسفات باکتری‌ها ۱۵۸/۶-۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود و بالاترین میزان متعلق به *R. legominosarum* SMR111 بود. Khan *et al*. (2009) نشان دادند که *Pseudomonas fluorescens* از منابع تری‌کلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم (Aluminum phosphate) و فسفات آهن (Iron phosphate) به ترتیب ۱۰۰، ۹۲ و ۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر آزاد ساخت. Malboobi *et al*. (2009) در تحقیق خود انحلال فسفات را توسط *P. putida*، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند.

Moradi and Sarikhani (2016) در مطالعه‌ای به مقایسه انحلال فسفات از منابع سنگ فسفات و تری‌کلسیم‌فسفات توسط برخی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (Phosphate solubilizing bacteria) پرداختند. آنها میزان انحلال فسفات از دو منبع سنگ فسفات (Rock Phosphate) (سنگ فسفات جنوب و سنگ فسفات یزد) و تری‌کلسیم‌فسفات توسط باکتری‌های S16-3، S16-3w، *Bacillus firmus*، *Bacillus megaterium*، *Pseudomonas* sp. C16-2O و *P. fluorescens* را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان انحلال فسفات متعلق به جدایه *Pseudomonas* sp. C16-2O به میزان ۵۳۳/۳ میلی‌گرم در لیتر بود. اگرچه جدایه *Pseudomonas* sp. C16-2O بیشترین انحلال فسفات از تری‌کلسیم‌فسفات را نشان داد اما در حضور سنگ فسفات بیشترین انحلال فسفات مربوط به جدایه S16-3 بود. قابل ذکر است که بین جدایه‌های مورد آزمایش، ازنظر انحلال فسفات از دو منبع سنگ فسفات اختلاف معنی‌داری دیده نشد ولی در تمامی جدایه‌ها بین انحلال فسفر از سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. باکتری‌های مورداستفاده، فسفات بیشتری از تری‌کلسیم فسفات در مقایسه با سنگ فسفات حل کردند و این میزان به‌طور متوسط ۱/۶۷ برابر بود.

شناسایی باکتری‌ها

پس از بررسی توان آزادسازی پتاسیم جدایه‌ها، اقدام به شناسایی مولکولی مبتنی بر ژن 16S rDNA جدایه‌های Az-8، Az-12 و Az-19 شد که توانایی مطلوبی از خود نشان دادند. در شناسایی مولکولی باکتری‌ها صرفاً ۹۰۰-۷۰۰ نوکلئوتید از کل طول ژن 16S rDNA برای توالی‌یابی استفاده شد که با مراجعه به سایت NCBI تشابه توالی‌های به‌دست‌آمده (جدول ۵) با جنس و گونه‌های باکتریایی ارزیابی شد و نتایج Blast-n توالی‌های حاصل از تکثیر ژن رمزکننده 16S rDNA نشان داد که جدایه‌های Az-8 و Az-19 متعلق به جنس Pseudomonas هستند. امکان شناسایی مولکولی جدایه Az-12 فراهم نگردید و

Archive of SID

www.SID.ir

تنها به شناسایی بیوشیمیایی آن بسنده شد که نتایج آن نشان داد که این جدایه متعلق به جنس *Pseudomonas* است. برای تکمیل شناسایی باکتری‌ها پس از انجام شناسایی مولکولی و مشخص شدن جنس هر جدایه اقدام به شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها شد که در جدول (۶ و ۷) خلاصه‌ای از نتایج آزمون بیوشیمیایی گزارش شده است. باکتری‌های کارآمد در آزادسازی پتاسیم در این تحقیق همگی متعلق به جنس Pseudomonas بودند. در مطالعات پیشین به باکتری‌های آزادکننده پتاسیم از جنس‌ها و گونه‌های متنوع اشاره شده است چنانکه جنس‌هایی نظیر *Bacillus* (Diep and Hieu, 2013; Hu *et al*., 2006) *Pseudomonas* (Keshavarzzarjani *et al*., 2013; Sarikhani, 2016)، *Rhizobium* (Meana *et al*., 2015)، *Klebsiella* (Zhang and Cong, 2014)، *Agrobacterium* (Meana *et al*., 2015 ؛Zhang and Cong, 2014)، *Enterobacter* و *Pantoea* (Zhang and Cong, 2014) و *Flavobacterium* (Meana *et al*., 2015) به‌عنوان باکتری‌های آزادکننده پتاسیم به چشم می‌خورد. Zhang and Kong (2014) از خاک ریزوسفری توتون اقدام به جداسازی ۲۷ سویه آزادکننده پتاسیم نمودند، هدف آنها بررسی تلقیح باکتری‌های منتخب در تأمین پتاسیم گیاهچه‌های توتون بود. شناسایی مولکولی مبتنی بر 16S rDNA نشان داد که باکتری‌هایی از جنس *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Pantoea*، *Microbacterium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium* و *Myroides* در بین آنها یافت می‌شود. آنها نشان دادند که تلقیح گیاهان با سویه XF11 متعلق به جنس *Klebsiella* به همراه پودر فلدسپار اثر معنی‌داری بر رشد و تغذیه پتاسیمی گیاه دارد.

جدول ۵. نتایج شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی باکتریها

نتایج Blast-n توالی‌های به‌دست‌آمده از 16S rDNA	جدایه‌های منتخب
Pseudomonas sp./ *P. brassicacearum*/ *P. fluorescens*/ *P. thivervalensis*	Az-8
NS	Az-12
Rhizobium sp./ *Agrobacterium* sp.	Az-18
Pseudomonas sp./*P. putida*/ *P. montelii*/ *P. plecoglossicida*	Az-19
نتایج شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها	**جدایه‌های منتخب**
Pseudomonas fluorescens	Az-8
Pseudomonas alcaligenes	Az-12
Pseudomonas mendocina/ *Pseudomonas borbori*	Az-19

NS: در مورد این جدایه به دلیل عدم توالی‌یابی خوب، تشابه مطلوبی با بانک ژنی مشاهده نشد (Non significant similarity was found)

جدول ۶. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

جدایه	اوره‌آز	نیترات	اکسیداز	کاتالاز	نشاسته	سولفید	سیترات	ایندول
Az-8	–	+	+	+	–	–	+	–
Az-12	–	+	+	+	–	–	+	–
Az-13	–	+	-	+	–	–	–	–
Az-15	+	+	-	+	–	–	-	–
Az-18	–	–	+	+	–	–	–	–
Az-19	–	+/–	+	+	–	–	+	–
Az-21	–	+	–	+	–	–	+	–
Az-65	–	–	+	+	–	–	+	–

جدول ۷. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی (ادامه جدول)

جدایه	گلوکز	لاکتوز	ساکارز	گلیسرول	ژلاتین	تریپتوفان	پرولین	مانیتول
Az-8	+	+	–	–	+	+/–	+	–
Az-12	–	–	–	–	-	+	+	–
Az-13	+/-	–	-	–	-	+	+	–
Az-15	+/-	–	–	–	-	+	+	–
Az-18	–	–	–/+	–	-	+	+	–
Az-19	+	–	–	–	-	+	+	–
Az-21	+	+/–	+	+	-	+	+	+
Az-65	+/-	–	–	–	-	–	+	–

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

نتایج حاکی از آن بود که در اغلب جدایه‌ها رهاسازی پتاسیم در حضور کانی بیوتیت نسبت به موسکویت بیشتر بود. جدایه Az-8 توانست در مقایسه با سایر جدایه‌های باکتریایی توانایی بهتری در رهاسازی پتاسیم نشان دهد. در این میان جدایه‌های Az-13، Az-15، Az-18،Az-21 و Az-65 مقادیر پایین‌تری نسبت به شاهد نشان دادند که به نظر می‌رسد مکانیسم جذب پتاسیم از محیط و آلی شدن آن در سلول‌های باکتری رخ داده و ازآنجایی‌که پس از رسوب‌دادن نمونه‌ها تنها پتاسیم موجود در محلول زلال رویی مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد این بخش از پتاسیم آزادشده از کانی‌های بیوتیت و موسکویت مورد محاسبه قرار نگرفته است. در ارزیابی توان انحلال فسفات از منبع تری-کلسیم‌فسفات مشاهده شد که جدایه‌های Az-19 و Az-65 در انحلال فسفات توانمند هستند. در بین جدایه‌های آزمایش‌شده، Az-8، Az12 و Az-19 به‌عنوان جدایه‌های کارآمدتر در رهاسازی پتاسیم برای شناسایی مولکولی مبتنی بر 16S rDNA کاندید شدند و به منظور تکمیل شناسایی مولکولی برخی تست-های بیوشیمیایی نیز مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از توالی‌یابی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های Az-8 و Az-19 متعلق به جنس *سودوموناس* بودند. جدایه‌هایی نظیر Az-8 به دلیل قابلیت خوبی که در رهاسازی پتاسیم و انحلال فسفات از خود نشان داد، می‌تواند برای انجام آزمایشات بیشتر و دقیق‌تر و سنجش توانایی‌های مطلوب آن در حضور گیاه پیشنهاد شود.

REFERENCES

Barker, W.W., S.A. Welch., and J.F. Banfield. (1997). Geomicrobiology of silicate minerals weathering. Reviews in *Mineralogy and Geochemistry*, 35, 391- 428.

Basak, B.B., and D.R Biswas, (2010). Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria onsolubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. *Biology and Fertility of Soils*, 46(6), 641-648.

Diep, C. N., and T.N. Hieu. (2013). Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, KiênGiang province Vietnam. *American Journal of Life Sciences*,1(3), 88-92.

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

Han, H.S., and K.D. Lee. (2005). Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(2), 176-180.

Hu, X., J. Chen., and J. Guo. (2006). Two phosphate and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 983-990.

Huang, P. M., and S. Song. (1988). Dynamics of potassium release from potassium bearing minerals as influenced by oxalic and citric acids. *Soil Science Society of America Journal*, 52, 383-390.

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

Keshavarz Zarjani, J., Aliasgharzad, N., Oustan, S., M. Emadi., and A. Ahmadi. (2013). Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(12), 1713-1723.

Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., S.M. SaqlanNaqvi., and M. Rasheed. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production, *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1), 48-58.

Khoshrou, B., M.R. Sarikhani., and N. Aliasgharzad. (2014). Molecular and Biochemical Identification of the Bacterial Isolates Used in Common Biofertilizers in Iran. *Journal of Knowledge of soil and water*, 25(4/2), 13-26.

Krishnaveni, M. S. (2010). Studies on phosphate solubilizing bacteria (PSB) in rhizosphere and non-rhizosphere soils in different varieties of foxtail millet (Setariaitalica). *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*, 1(1), 23-39.

Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L., and J.G. Ferry. (2000). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4), 587- 602.

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

Malboobi, M.A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., A. Deljou., and K. MorabbiHeravi. (2009). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1471-1477.

Meana, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., K Kim., and V.K. Bajpai. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340-347.

Moradi, S.H. (2016). Isolation and Identification of

Archive of SID

www.SID.ir

Auxin Producing Azospirilla and Study the Effect of Superior Isolates on Growth and Root Development of Corn. Master's Thesis. University of Tabriz.

Moradi, S.H., and M.R. Sarikhani. (2016). Comparison of phosphate solubility from rock phosphate and tricalsium phosphate sources by phosphate solubilizing bacteria. The Second Congress of Agricultural Sciences and Natural Resources in the development. Iran. Gorgan.

Olsen, S.R., and B.L. Sommers. (1982). Phosphorus. P. 403-430. In: Page et al. (eds) *Methods of soil Analysis*. Part II. 2ed. ASA, SSSA, Madison .WI .USA.

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

Perez, E., Sulbaran, M., M.M. Ball., and L.A. Yarzabal. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistr*y, 39(11), 2905-2914.

Rodriguez, H., and R. Fraga. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.

Rogers, J.R., and P.C. Bennett. (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1), 91-108.

Saghafi, D., H.A. Alikhani., and B. Motesharezadeh. (2014). Evaluation of plant growth promoting characteristics of some Rhizobia isolated from soils of Iran. *Journal of Soil Management and Sustainable*, 4(2), 131-150.

Sarikhani, M.R. (2014). Review of methods for molecular identification of bacteria: Points and considerations. The seventh national conference on agricultural research findings. Iran. Sanandaj.

Sarikhani, M.R. (2016). Increasing potassium (K) release from K-containing minerals in the presence of insoluble phosphate by bacteria. *Biological Journal of Microorganism*, 87-96.

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(10), 1918-1922.

Sheng, X. F., He, L. Y., and W.Y. Huang. (2003). Conditions of releasing potassium by a silicate dissolving bacteria strain NBT. *Agricultureral Sciences in China*, 1(6), 662-666.

Shu-Xin, T. U., GUO. Zhi-Fen., and S.U.N. Jin-He. (2007). Effect of oxalic acid on potassium release from typical Chinese soils and minerals. *Pedosphere*, 17(4), 457-466.

Sugumaran, P., and B. Janarthanam. (2007). Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agriculture Sciences*, 3(3), 350-335.

Tarand, Krieg., and Do bereiner. (1979). Genus II. Azospirillum. *BERGEY'S MANUAL_ OF Systematic Bacteriology*,7-26.

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

YiFeng, Z., L. YunXia., and L. HuaZhong. (2009). Separation and purification of the potassium - releasing bacteria. *Journal of Hubei University for Nationalities - Natural Science edition*, 27(3), 285-288.

Zhang, C., and F. Kong. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants.*Applied Soil Ecology*, 82, 18-25.

Archive of SID

www.SID.ir