نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۶، ص. ۱۱۳۴-۱۱۲۰

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 4, Sept.-Oct. 2017, p. 1120-1134

توانایی باکتری‌های‌حل‌کننده پتاسیم در افزایش رشد گندم و جذب پتاسیم در زیستگاه درون شیشه‌ای

نعیمه عنایتی‌ضمیر[۱*] – احمد لندی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱

چکیده

هوادیدگی کانی‌های خاک، خاستگاه بسیاری از عناصر غذایی ضروری رشد گیاه مانند پتاسیم هستند. کانی های میکایی خاستگاه اصلی برآورد پتاسیم در خاک های کشورمان هستند. این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های حل کننده پتاسیم از ریزوسفر گندم و بررسی توانایی این باکتریها در بهره گیری از پتاسیم ساختاری کانی‌های مسکوویت و ورمی‌کولیت انجام شد. این پژوهش در زیستگاه درون شیشه‌ای با آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش سه سطح باکتری (شاهد بدون مایه زنی، و مایه زنی با باکتری۱ و ۲) و چهار گونه تیمار کانی پتاسیم (مسکویت، ورمیکولیت، مسکویت+K_2HPO_4 ، ورمیکولیت + K_2HPO_4) بود. در پایان دوره کشت، بخش هوایی گیاه برداشت و به روش خاکستر خشک پتاسیم آن به کمک فروغ سنج اندازه گیری شد. همچنین صفات وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، بلندی گیاه و درازی ریشه اندازه-گیری شد. این بررسی نشان داد که پیامد مایه زنی دو باکتری برهمه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در سطح یک درصد معنی‌دار است. همه ویژگی های یاد شده در بودن *Bacillus subtilis* و کانی ورمی‌کولیت بالاترین اندازه‌ها را داشتند. اندازه پتاسیم جذب شده در گیاه به گونه معنی‌داری وابسته به بستر کشت گیاه بود. اندازه پتاسیم جذب شده در گیاه، در سطح یک درصد به گونه معنی‌داری وابسته به باکتری حل‌کننده پتاسیم بود. بیش‌ترین غلظت پتاسیم اندام هوایی (۰/۰۶۲ درصد) در تیمار بستر ورمی‌کولیت به همراه پتاسیم محلول در بودن *Bacillus subtilis* بود. بیشترین اندازه جذب پتاسیم در اندام هوایی گیاه (۰/۰۴۹میلی‌گرم در گلدان) نیز در بستر ورمی‌کولیت به همراه پتاسیم محلول در بودن *Bacillus subtilis* و پس از آن در اندام هوایی گیاه (۰/۰۳۶ میلی‌گرم در گلدان) کشت شده در بستر مسکویت به همراه پتاسیم محلول در بودن *Bacillus subtilis* با اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد اندازه‌گیری شد.

واژه‌های کلیدی: بلندی گیاه، پتاسیم نامحلول، مسکویت، ورمی‌کولیت، وزن خشک

مقدمه

پتاسیم یکی از عناصر غذایی ضروری پرنیاز و فراوان‌ترین کاتیون جذب شده در بیشتر گیاهان است که نقش مهمی در رشد و دگرگونی آنها دارد. پتاسیم در فعالیت آنزیم‌ها، افزایش شادآبی یاخته، افزایش فتوسنتز، کمک در جابجایی قند و نشاسته، کمک در جذب نیتروژن و برای ساخت پروتئین در گیاه نیاز است. افزون بر متابولیسم گیاه، پتاسیم مایه بهبود کیفیت محصول می‌شود، زیرا پتاسیم در پر کردن دانه، وزن دانه، افزایش پایداری به بیماری نقش داشته و افزون بر آن مایه افزایش پایداری گیاه در برابر تنش‌ها می‌شود (۲۲) .

این عنصر بیشتر به سه ریخت در خاک، پتاسیم فراهم برای گیاه (محلول و تبادلی)، پتاسیم میان‌لایه‌ای و پتاسیم درون ساختاری خاک، دیده می‌شود. در میان این سه ریخت پتاسیم در خاک، غلظت پتاسیم محلول خاک بسیار کم است (۱ تا ۲ درصد از همه آن) و بخش بزرگی از پتاسیم (۹۸ درصد پتاسیم خاک) به گونه نامحلول در خاک است (۱۲). اگر چه کمبود پتاسیم مانند کمبود نیتروژن و فسفرگسترده نیست اما بسیاری از خاکهای کشاورزی که در آغاز از این عنصر غنی بودند با برداشت پی در پی گیاه، رواناب، آبشویی و فرسایش خاک با کمبود این عنصر روبرو شده‌اند (۳۰).

بخش عمده پتاسیم در خاک در ساختمان کانیهای پتاسیم‌دار مثل مسکویت، بیوتیت و فلدسپارها وجود دارد. به گونه معمول بیشتر

۱ و ۲– به ترتیب دانشیار و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
(* – نویسنده مسئول: (Email:n.enayatzamir@scu.ac.ir
DOI: 10.22067/jsw.v31i4.57235

کانی‌های پتاسیم‌دار خاک که پتاسیم مورد نیاز گیاه را از طریق آزادسازی پتاسیم تأمین می‌کنند شامل بیوتیت، مسکویت، میکروکلین و ارتوکلاز می‌باشد (۳۲ و ۱۴). اسپارکس و هانگ (۳۳) بیان داشتند پتاسیم ساختمانی در شرایط کمبود پتاسیم اهمیت ویژه‌ای دارد. زمانی که پتاسیم محلول و تبادلی خاک به کمتر از حد کفایت گیاه کاهش می‌یابد، پتاسیم غیرتبادلی می‌تواند از بین لایه‌های کانی‌های رسی آزاد شود. امروزه مصرف بالای کودهای شیمیایی برای تامین مواد غذایی مورد نیاز گیاه نمی‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش بهره‌وری از خاک باشد، زیرا مایه آن می‌شود که مواد مغذی اضافی از طریق آب‌های مازاد به سفره‌های آبی زیرزمینی و یا رودخانه‌ها و یا در نهایت به دریاها بریزد. افت کیفیت محصولات کشاورزی در پیامد عدم مصرف بهینه کود، انباشت فلزهای سنگین و نیترات در ماده خشک گیاه، از بین رفتن ذخیره ماده آلی خاک، کمبود سایر عناصر مغذی ضروری رشد و به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان همه از مشکلات ناشی از عدم توجه به مصرف کودهای شیمیایی به لحاظ نوع، اندازه و نوع مصرف آن می‌باشد. پرداختن به راهکار زیستی با توجه به مسایل و مشکلات زیست محیطی ناشی از کاربرد کودهای شیمیایی ضروری به نظر می‌رسد.

در این شیوه می توان از کودهای زیستی به عنوان جایگزین کودهای شیمیایی بهره گیری نمود. بعضی میکروارگانیسم‌ها در خاک قادر به آزاد کردن پتاسیم، از کانیهای دارای پتاسیم مثل میکا، ایلایت و ارتوکلاز از طریق تولید و ترشح اسیدهای آلی و تولید کلات به داخل محلول خاک می‌باشند (۲۵). لذا بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌های آزاد کننده پتاسیم یک روش امیدبخش برای افزایش پتاسیم قابل بهره گیری در خاک خواهد بود.

شنگ (۲۹) با اضافه کردن باکتری *Bacillus edaphicus* به خاک پنبه و کلزا در یک آزمایش گلدانی به ترتیب افزایش ۲۴-۱۹ درصد و ۲۱-۱۹ درصد در وزن خشک ریشه و اندام هوایی دید. همچنین غلظت پتاسیم در پنبه۳۴-۳۱ درصد و در کلزا ۳۱-۲۸ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. هو و همکاران (۱۳) باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم (*Bacillus mucilaginosus*) را از خاک جداسازی کردند. این دو سویه به گونه معنی‌داری قادر به آزادسازی پتاسیم از کانی پتاسیم‌دار محیط کشت الکساندروف بودند. ساگمارن و جانارتانم (۳۴) باکتریهای آزاد کننده پتاسیم را از خاک، سنگها و نمونه‌های معدنی جداسازی کردند و تأثیر این باکتریها را در آزادسازی پتاسیم از ارتوکلاز، میکروکلین و میکای مسکوویت مطالعه کردند. در بین جدایه‌ها *Bacillus mucilaginosus* بیشترین آزادسازی پتاسیم را داشت و در بین کانیهای پتاسیم‌دار بیشترین اندازه پتاسیم آزاد شده در تیمار میکای مسکویت بود. لذا، بهره گیری از باکتریهای آزاد کننده پتاسیم یک روش امید بخش برای افزایش پتاسیم قابل بهره گیری در خاک خواهد بود. این پژوهش با هدف بررسی پیامد باکتریهای آزاد کننده پتاسیم در عرضه پتاسیم توسط کانیهای مسکوویت و ورمیکولیت در جذب پتاسیم در گیاه گندم در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، آماده سازی و اسیدشویی کانی‌های مسکویت و ورمیکولیت

نمونه‌های خاک از منطقه پیرامون ریشه گندم کشت شده در دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید. برای این کار تعداد ۱۲ نمونه به‌صورت تصادفی برداشت و سپس نمونه مرکب از آن تهیه گردید. کانی‌ها از معدنی در یزد تهیه و سپس توسط XRF آنالیز شدند (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب عناصر (درصد) کانی مسکویت و ورمیکولیت با بهره‌گیری از فلورسانس پرتو ایکس

Table1- Minerals component (%) of muscovite and vermiculite using fluorescence X-Ray

عنصر Element / کانی Mineral	Na_2O اکسید سدیم	MgO اکسید منیزیم	Al_2O_3 اکسید آلومینیوم	SiO_2 کوارتز	K_2O اکسید پتاسیم	CaO اکسید کلسیم	Fe_2O_3 اکسید آهن
مسکویت muscovite	0.64	0.08	33.99	48.34	9.98	0.17	1.77
ورمیکولیت vermiculite	0.64	11.78	18.08	44.09	5.50	2	15

برای یکنواخت نمودن اندازه کانی‌ها، پودر هر کانی به گونه جداگانه از دو غربال ۲۰۰ و ۲۷۰ مش عبور داده شدند و کانی مانده بر الک زیرین برای اسیدشویی بهره گیری شد. برای زدودن پتاسیم قابل تبادل، کانی‌ها با اسید کلریدریک ۰/۰۱ مولار تا خروج کامل پتاسیم قابل تبادل شسته شدند. اندازه پتاسیم محلول رویی توسط دستگاه جذب اتمی خوانده شد. در این روش تقریباً ۹۰ درصد پتاسیم در همان

مرحله اول از کانی استخراج می‌شود اما برای اطمینان از خروج کامل پتاسیم قابل بهره‌گیری از کانی پودر شده سه بار به گونه متوالی اسیدشوئی انجام شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای ۷۲ ساعت خشک شدند.

جداسازی و شناسایی باکترهای حل کننده پتاسیم

برای این کار ۱۰ گرم از خاک نمونه برداری شده را برداشته و با بهره گیری از محلول نمکی سترون ۰/۷ درصد (۷ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و برای ۲ ساعت با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد. برای آماده سازی رقت‌های متوالی، در هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر محلول نمکی سترون ریخته شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک در لوله اول ریخته و ورتکس شد. به این ترتیب رقت 10^{-2} ایجاد شد. برای ساخت رقت‌های بعدی ۱ میلی‌لیتر از محلول لوله اول (رقت 10^{-2}) برداشته و در لوله دوم ریخته و ورتکس شد، تا به رقت 10^{-9} برسد. ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های تهیه شده روی محیط کشت آگار مغذی به‌گونه زیگزاگی کشت داده شد (۶). تشتک‌های کشت شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس برای ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پس از خالص‌سازی باکتری‌ها بر پایه ریخت پرگنه یا کلنی آن‌ها برای جداسازی باکتری‌های حل کننده پتاسیم از روش لکه‌گذاری بر روی محیط کشت جامد الکساندروف (pH ۷) با محتویات مندرج در جدول ۲ بهره‌گیری شد (۱۰).

جدول۲- محیط کشت غربال‌گری باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم

Table2- Contents of potassium solubilizing bacteria screening medium

ترکیب Component	Glucose گلوکز	$MgSO_4.7H_2O$ سولفات منیزیم	$FeCl_3$ کلرید آهن	$CaCO_3$ کربنات کلسیم	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$ مونوکلسیم فسفات	Mineral کانی	Agar آگار
($g\ L^{-1}$)	5	0.005	0.01	2	2	2	15

تشکیل هاله در پیرامون کلنی باکتری ها نشان دهنده توانایی باکتری در انحلال پتاسیم است. جدایه‌هایی که بیشترین قطر هاله را داشتند به عنوان جدایه های برتر گزینش شدند (۲). شناسایی جدایه-های حل کننده پتاسیم بر پایه ویژگی های ریخت شناختی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و بر پایه راهنمای گروه‌بندی باکتری‌های برگی انجام شد (۷). برای استخراج DNA باکتری از کیت شرکت سیناژن و بر پایه پروتکل درج شده بهره‌گیری شد. بعد از استخراج DNA ژنومی برای اطمینان از استخراج و بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، ۵ میکرولیتر از محلول دارای ژنوم با یک میکرولیتر محلول رنگی لودینگ دای بر روی ژل آگارز یک درصد دارای Safe stainبا ولتاژ ۸۰ ولت و برای ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز از پرایمرهای عمومی (FD1 و RP1) که قابلیت تکثیر ژنوم در ناحیه ژن 16s rRNA را داشتند، بهره گیری شد (۳۸). پرایمرهای فوق توسط شرکت ژن فن‌آوران سنتز شده و براساس دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد. تکثیر ژنوم با بهره‌گیری از ترکیبات بافر، پرایمر رفت و برگشت، $dNTP_S$، $MgCl_2$، Taq DNA polymerase، Template DNA و آب در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با بهره‌گیری از برنامه تکثیر شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۰چرخه شامل یک دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سلسیوس و۱۵۰ ثانیه سنتز در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. نتایج مربوط به تعیین توالی قطعه تکثیر شده باکتری در کشور کره جنوبی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ویرایش و با برنامه Blast با دیگر توالی‌های موجود مقایسه و نوع باکتری مشخص شد.

تهیه و آماده‌سازی زادمایه باکتری

دو جدایه با نسبت قطر هاله به کلنی بالاتر برای تهیه زادمایه گزینش شدند. برای هر باکتری به گونه جدا ازهم اندازه لازم از محیط کشت مایع مغذی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از سرد شدن محیط کشت، چند کلونی از هر باکتری در ارلن مایر دارای محیط کشت وارد شده و برای ۲۴ ساعت در دمای۲۸ درجه سلسیوس با ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده و گرمادهی شدند (۳۱). پس از این مدت محیط کشت دارای باکتری برای۵ دقیقه با قدرت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و یاخته‌های باکتری به گونه قرص درآمدند، سپس محلول رویی دور ریخته شد و یاخته‌های باکتری دوباره در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمدند. کدورت سوسپانسیون باکتری بر اساس استاندارد مک‌فارلند معادل نیم‌مک‌فارلند (۱۰۸*۱/۵ CFU/ml) بود. برای تلقیح به لوله‌های دارای گندم این سوسپانسیون تا رسیدن به جمعیت 10^{6} رقیق شد.

کشت گیاه در زیستگاه سترون

در این آزمایش از گندم رقم چمران که داری توان جوانه زنی بالایی بودند (۹۸ درصد) واز گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران آماده گردید، بهره گیری شد. برای گندزدایی رویه دانه‌ها و جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی، بذرها برای ۱۰دقیقه درمحلول

هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفته و سپس با آب مقطر سترون چندین بار شستشو داده شدند (۱). کشت گیاه و این آزمون در لوله‌هایی با قطر ۳ سانتیمتر و بلندی ۱۲ سانتیمتر انجام گردید. داخل هر لوله نزدیک ۱۲۰ گرم کانی آماده شده ریخته شد. دهانه لوله‌ها با کاغذ آلومینیومی بسته شد و لوله‌ها در اتوکلاو استریل شدند. سپس در زیستگاه سترون شده ۲ بذر درهر لوله کاشته شدند و در هنگام کاشت، هر بذر با اندازه ۵۰۰ میکرولیتر باکتری شناسایی شده (با فراوانی 10^6 ×۵ یاخته درهرمیلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری) مایه زنی گردید. برای هر تیمار ۹ لوله کشت در نظر گرفته شد. این آزمون در سه تکرار (هر تکرار شامل ۳ لوله) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح باکتری (شاهد بدون مایه زنی، باکتری۱، باکتری۲) و چهار نوع منبع پتاسیم (مسکویت، ورمیکولیت، مسکویت+K_2HPO_4 ، ورمیکولیت + K_2HPO_4) بود. مجموعاً ۱۰۸ لوله در نظر گرفته شد. ترکیب محلول غذایی مورد بهره‌گیری عبارت بود از : ۰/۲۵ میلی مولار KH_2PO_4، ۲ میلی مولار $Ca(NO_3)_2$، ۱ میلی مولار $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۸۸ میلی مولار K_2SO_4، ۰/۱ میلی مولار KCl، ۰/۵ میکرومولار $MnSO_4$، ۱ میکرومولار H_3BO_3، ۰/۲ میکرومولار $CuSO_4$، ۰/۲ میکرومولار $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$، ۱ میکرومولار $ZnSO_4$، ۱۰۰میکرو مولار Fe-EDTA و pH نزدیک ۶/۸ (۳۶). به اندازه ۵ میلی لیتر محلول غذایی دارای پتاسیم به برخی از لوله‌ها بر پایه طرح آزمایشی و ۵ میلی لیتر از محلول غذایی یاد شده اما بدون نمک دارای پتاسیم به دیگر لوله‌ها افزوده شد. لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با دوره روشنایی۱۶ساعت و ۸ ساعت تاریکی برای ۱۸روز نگهداری شدند. در پایان روز هجدهم گیاهچه‌ها برداشت شدند و شاخص‌های وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، درازی اندام هوایی و درازی ریشه اندازه‌گیری گردید. اندازه پتاسیم اندام هوایی پس از هضم خشک و عصاره‌گیری با بهره‌گیری از فلیم فتومتر خوانده و با بهره‌گیری از منحنی استاندارد غلظت پتاسیم محاسبه شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش ۱۵ جدایه بر پایه تفاوت در ویژگی‌های ریخت شناختی بر روی محیط کشت آگار مغذی جداسازی شدند. اما بر پایه نتایج حاصل از غربال‌گری انحلال پتاسیم از کانی‌های ورمی‌کولیت و مسکویت سه جدایه با توانایی انحلال پتاسیم شناسایی شدند و دو جدایه برای آزمایش روی گیاه گزینش شدند. نتایج انحلال کانی در محیط کشت جامد الکساندروف در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- قطر کلنی و هاله پدید آمده با سویه‌ها در پلیت دارای کانی ورمیکولیت و مسکویت

Table 3- Strains produced halo and colony diameter in plate containing vermiculite and muscovite

Diameter (mm) قطر / باکتری Bacterium	کلنی Colony	هاله Halo	هاله به کلنی Halo/Colony	کلنی Colony	هاله Halo	هاله به کلنی Halo/Colony
	مسکویت Muscovite			ورمیکولیت Vermiculite		
Bacillus subtilis	5.4	8.1	1.5	4.5	9	2
Corynebacterium glutamicum	4.4	6.1	1.3	5.5	8	1.4
P. putida	8.7	6.3	0.72	6.7	5.8	0.86

همچنین برخی ویژگی‌های ریخت شناختی و بیوشیمیایی جدایه‌های قادر به انحلال پتاسیم در جدول ۴ ارایه شده است. بر پایه نتایج شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌ها از جنس‌های باسیلوس، کورینه‌باکتریوم و پسودوموناس بودند.*Bacillus subtilis* را بسیاری از گروه باکتری های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه به ویژه از دیدگاه حل فسفات‌های نامحلول و نیز تولید سیدروفور گزارش کرده‌اند (۲۴ و ۳۵). بر پایه یافته ها *Bacillus subtilis* توانایی بالاتری در برابر دو سویه دیگر در انحلال پتاسیم داشت. گروه گسترده ای از باکتریها از جنس‌های *Pseudomonas* ، *Bacillus edaphicus*، *Bacillus circulans* توان رهاسازی پتاسیم از کانیهای پتاسیم دارند (۱۸). لیو و همکاران (۱۹) نشان دادند *Bacillus mucilaginosus* دارای توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی میکا با تولید اسیدهای آلی و همچنین اگزوپلی‌ساکاریدها است. مطابق یافته‌های ناهر و همکاران (۲۰) کورینه‌باکتریوم به عنوان یک باکتری محرک رشد شناخته شده است چون توانست مایه افزایش وزن توده گیاه و نیز افزایش غلظت نیتروژن در گیاه گردد. کورینه‌باکتریوم‌ها در تولید سیدروفور فعال بوده و نیز گونه‌هایی از آن‌ها به دلیل داشتن توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول و تثبیت غیرهمزیست نیتروژن به عنوان باکتری‌های افزاینده رشد گیاه معرفی شده‌اند (۳۵). رهاسازی پتاسیم از بیوتیت توسط *P. putida* P13 با ایجاد هاله در محیط الکساندروف (نسبت قطر هاله به کنی نزدیک ۱/۳) توسط ساریخانی(۲۶) گزارش شده است. براساس نتایج بدست آمده از مقایسه توالی 16S rRNA، جدایه‌ها، تشابه ۹۸ درصدی با نام‌های یاد شده در جدول ۴ داشتند که با آزمون‌های بیوشیمیایی نیز همخوانی داشت.

جدول ٤- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مشخصات جدایه‌های قادر به آزادسازی پتاسیم

Table 4- Biochemical tests results and characteristics of potassium solubilizing isolates

آزمون Test	نتایج Results		
شکل Shape	باسیل Rod shaped	باسیل با قطر زیاد و گرزی Coryne form	کوکوباسیل Coccobacill
واکنش گرم Gram staining	+	+	−
تست اسنات Ksnot	+	+	−
اسپور Spour	Central oval بیضی- مرکزی	−	-
کاتالاز Catalase	+	+	+
اکسیداز Oxidase	+	−	+
ژلاتیناز Gelatin hydrolysis	+	+	-
مصرف سیترات Citrate utilization	−	−	+
TSI	K/A	K/A	K/K
سولفید هیدروژن H_2S	−	−	−
تولید اندول Indole	−	−	−
حرکت Motility	+	−	+
هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis	+	−	-
اکسیداسیون/تخمیر گلوکز Oxidatie Fermentative	+	+	+
متیل رد Methyl Red	−	−	-
وگس پرسکوئر Voges Proskaur	+	−	-
دنیتریفیکاسیون No_3 reduction	−	+	+
NaCl 6.5%	+	+	+
اوره آز Urease	+	+	+
مانوز Manose	+	No need	No need
ساکارز Sucrose	+	+	+
مالتوز Maltose	No need	+	−
لاکتوز Lactose	−	−	−
نام جدایه Isolate name	*Bacillus subtilis*	*Corynehbacterium glutamicum*	*Pseudomonas putida*

تاثیر تیمارها بر برخی ویژگی‌های ظاهری گیاه

جدول ۵ تجزیه واریانس پیامد تیمارها بر بلندی گیاه، درازی ریشه، وزن تر و خشک، و غلظت پتاسیم و پتاسیم جذب شده در اندام هوایی گیاه را نشان می‌دهد. برهم کنش تیمارها برهمه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در سطح یک درصد معنی‌دار شد.

جدول ۵- نتایج تجریه واریانس پیامد تیمارها بر برخی صفات گیاه و غلظت پتاسیم

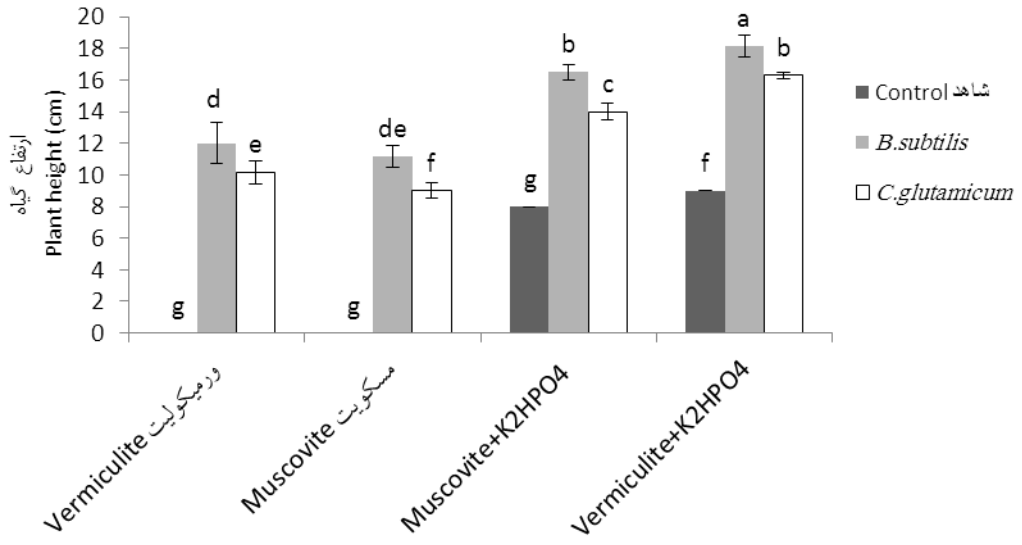
Table 5- ANOVA results of treatments effects on some plant characteristics and potassium concentration

منابع تغییر SOV	درجه آزادی DF	بلندی گیاه Height	درازی ریشه Root length	وزن تر اندام هوایی Arial wet weight	وزن خشک اندام هوایی Arial dry weight	وزن تر ریشه Root wet weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	غلظت پتاسیم potassium concentration	پتاسیم جذب شده potassium uptake
منبع پتاسیم Potassium source	3	150.4**	54.1**	22179.8**	26008.3**	14532.1**	5204.05**	0.006**	0.0006**
باکتری Bacterium	2	319.2**	53.8**	174749.1**	34574.1**	2726.1**	29150.3**	0.006**	0.002**
منبع پتاسیم*باکتری Potassium source*Bacterium	6	4.79**	7.8**	1151.8**	4699.4**	2637.1**	2375.1**	0.0007**	0.0002**
خطا Error	24	1.1	0.75	50.3	74.3	194.2	123.4	0.00005	0.000001
ضریب تغییرات CV		9.7	16.2	3.8	12.4	20.1	17.3	7.8	8.2

**significant $p<0.01$

آزمون میانگین برهم کنش تیمارها بر بلندی اندام هوایی و درازی ریشه در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. هر دو صفت با کاربرد هر دو باکتری نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشتند. با توجه به نتایج بدون افزودن پتاسیم محلول در آغاز رشد، باکتریهای قادر به رهاسازی پتاسیم توانستند پتاسیم اولیه مورد نیاز گیاه را تامین کنند. اما این آزمایش طی ۱۸روز به اجرا درآمد و نمی‌توان اظهار داشت که آیا در درازی دوره رشد و تا رسیدن به عملکرد دانه این باکتریها می‌توانند پتاسیم مورد نیاز را تامین نمایند. بیشترین بلندی اندام هوایی و درازی ریشه به تیمار ورمی‌کولیت به‌همراه پتاسیم در بودن *Bacillus subtilis* بدست آمد. لیفشیتز و همکاران (۱۷) مشاهده کردند که مایه‌زنی بذرهای کلزا با *Pseudomonas putida* GR12-2 با توانایی تولید ایندول استیک اسید، به اندازه ۲ تا ۳ برابر مایه افزایش درازی ریشه می‌شود. افزایش رشد ریشه یکی از مهمترین معیارها برای سنجش اثرات مفید باکتریهای محرک رشد گیاه است. تولید ایندول استیک اسید توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه مایه طویل شدن وتکثیر یاخته‌های ریشه می‌شود (۲۱).

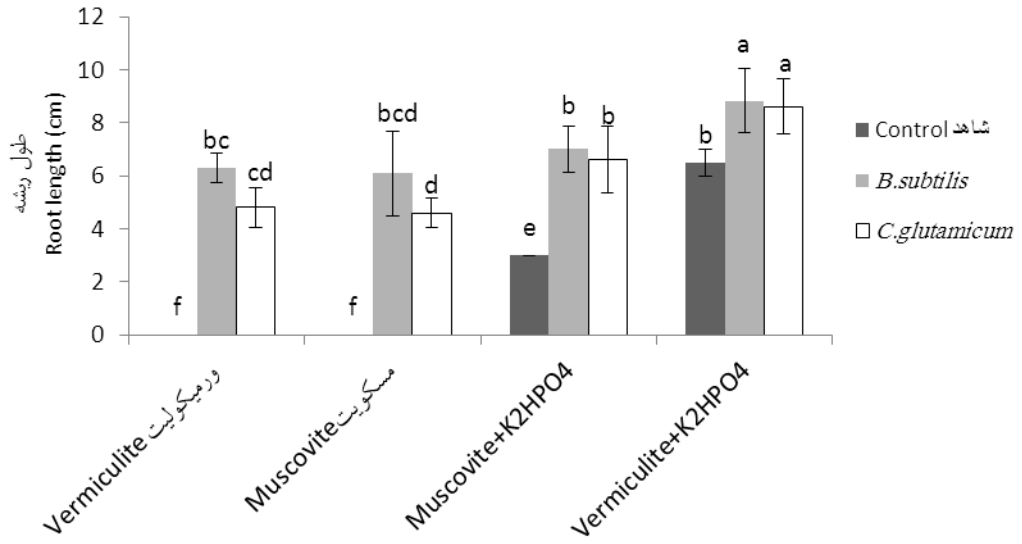
آزمون میانگین برهم‌کنش تیمارها بر وزن تر اندام هوایی در شکل ۳ نشان داده شده است. وزن‌تر اندام‌هوایی با کاربرد هر دو باکتری نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بیشترین اندازه وزن تر اندام‌هوایی به تیمار ورمی‌کولیت به‌همراه پتاسیم و در بودن *Bacillus subtilis* اختصاص داشت. طبق یافته‌های کیتراشری و همکاران (۹) اندازه جوانه‌زنی در گیاهان برنج تیمار شده با *Bacillus subtilis* و وزن تر اندام هوایی در گیاهان برنج تیمار شده با این باکتری به گونه معنی‌داری بالاتر از تیمارهای بدون باکتری بود. یو و همکاران (۳۹) نشان دادند که در گیاهان فلفل تیمار شده با *Bacillus subtilis* اندازه وزن تر گیاه و بلندی آن به طورمعنی‌داری بالاتر از گیاهان تیمار نشده بود. باکتریهای محرک رشد از یک طرف با بهبود وضعیت آبی گیاه و از طرفی دیگر با افزایش میزان فتوسنتز، میزان اسیمیلات تولیدی را افزایش داده و مایه افزایش زیتوده گیاه می‌شوند. نتایج حاضر نیز تفاوت معنی‌دار وزن تر گیاهان تیمار شده با باکتری و گیاهان تیمار نشده با باکتری را نشان می‌دهد.



شکل ۱- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر بلندی گیاه

Figure 1- Mean comparison of treatments effect on plant height

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05)

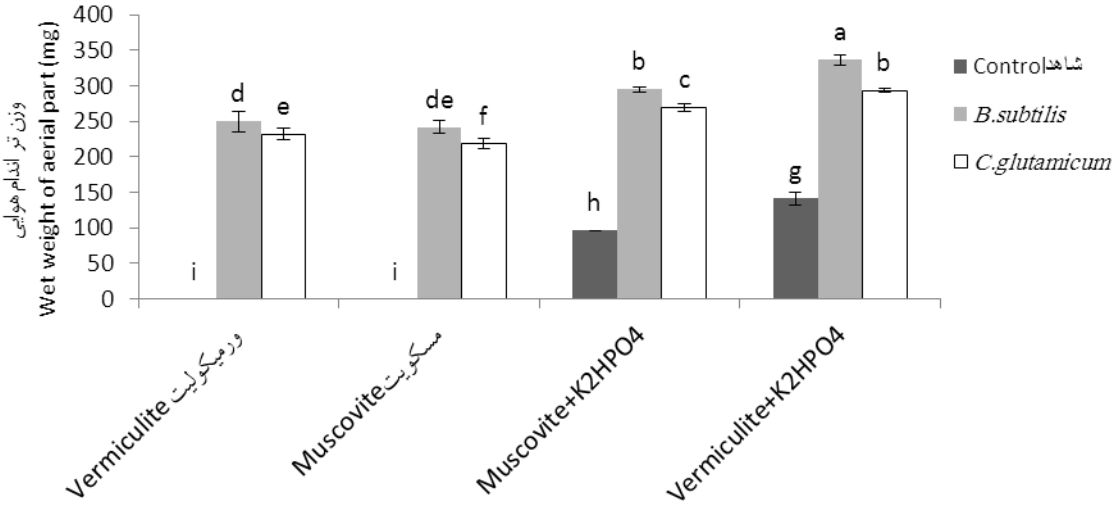


شکل ۲- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر درازی ریشه

Figure 2- Mean comparison of treatments effect on root length

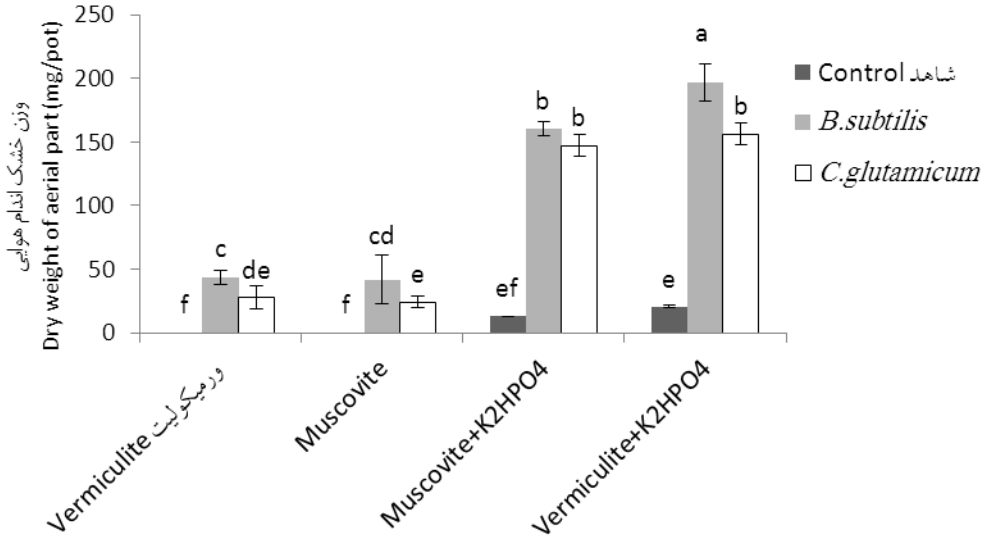
باکتری‌های ریزوسفری از راه ساخت هورمون‌های رشد، افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر و پتاسیم از راه ساخت اسیدهای آلی و معدنی، تولید سیدروفور و افزایش حلالیت آهن و روی و تولید آنزیم ACC–دآمینا مؤثر در کاهش اثرات سوء اتیلن تنشی، به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (۱۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم کنش تیمارها بر وزن خشک اندام هوایی گیاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۵). نتایج آزمون میانگین برهم کنش تیمارها نشان داد که با افزودن پتاسیم محلول در ابتدای کشت به لوله‌ها وزن خشک اندام هوایی در بودن هر دوکانی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد داشت. همچنین پیامد هر دو باکتری نیز در سطح ۵ درصد بر افزایش این صفت معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد پیامد باکتری بسیار بارزتر از پیامد پتاسیم محلول که در ابتدای کشت اضافه شد، می‌باشد. بالاترین اندازه این صفت در تیمار ورمی‌کولیت به‌همراه پتاسیم در بودن *Bacillus subtilis* به‌دست

آمد. یکی از سازوکارهای افزایش وزن خشک اندام هوائی را می‌توان به تولید مواد محرک رشد گیاه مثل ایندول استیک اسید و جیبرلین نسبت داد. چاکرا بورتی و همکاران (۸) گزارش کردند که باکتریهای که *Bacillus megaterium* قادر به تولید ایندول استیک اسید که این ترکیب تولید شده توسط باکتری می‌تواند مایه افزایش وزن خشک اندام هوایی و عملکرد گردد. افزایش محتوای آب نسبی برگ ها می‌تواند منجر به افزایش میزان فتوسنتز و در نتیجه افزایش وزن زیتوده گیاهی می‌شود. نتایج باسیلیو و همکاران (۳) نشان داد که وزن خشک ریشه و برگ و ارتفاع گیاه در گندم تلقیح شده با باکتری محرک رشد افزایش یافت؛ آنها یکی از دلایل افزایش عملکرد این گیاهان را به افزایش جذب آب در گیاه نسبت دادند.



شکل ۳- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر وزن‌تر اندام هوایی

Figure 3- Mean comparison of treatments effect on fresh weight of aerial part

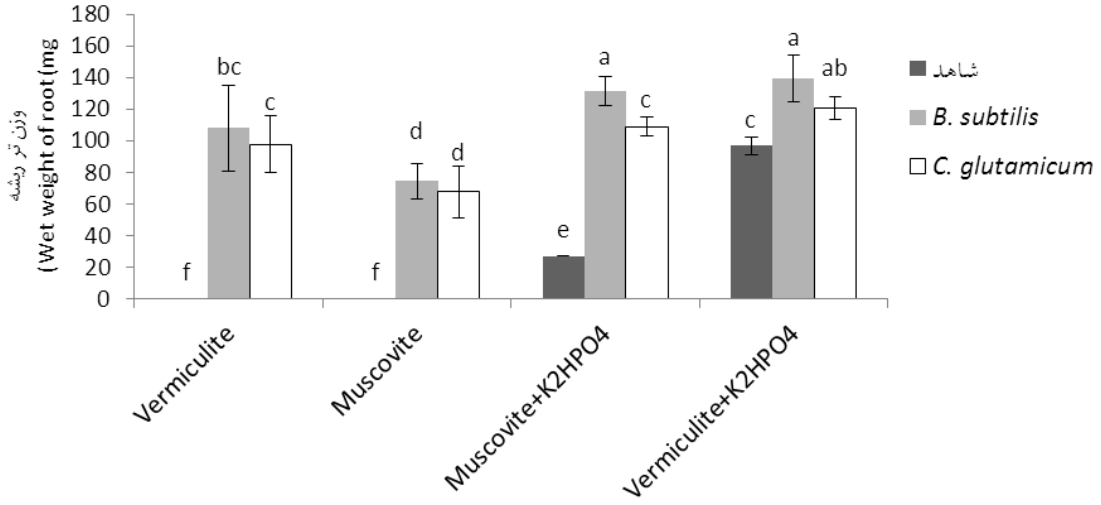


شکل ٤- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر وزن‌خشک اندام هوایی

Figure 4- Mean comparison of treatments effect on dry weight of aerial part

نتایج آزمون میانگین برهم‌کنش تیمارها نشان داد که با افزودن پتاسیم محلول در ابتدای کشت به لوله‌ها وزن تر و خشک ریشه (شکل‌های ۵ و ۶) در بودن هر دوکانی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد داشت. همچنین اثر هر دو باکتری نیز در

سطح ۵ درصد بر افزایش این دو صفت معنی‌دار بود. بالاترین میزان این دو صفت در تیمار ورمی‌کولیت به‌همراه پتاسیم در بودن *Bacillus subtilis* به‌دست آمد و پس از آن تیمار مسکویت به همراه پتاسیم محلول در بودن *Bacillus subtilis* با اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد قرار داشت.



شکل ۵- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر وزن‌تر ریشه

Figure 5- Mean comparison of treatments effect on fresh weight of root

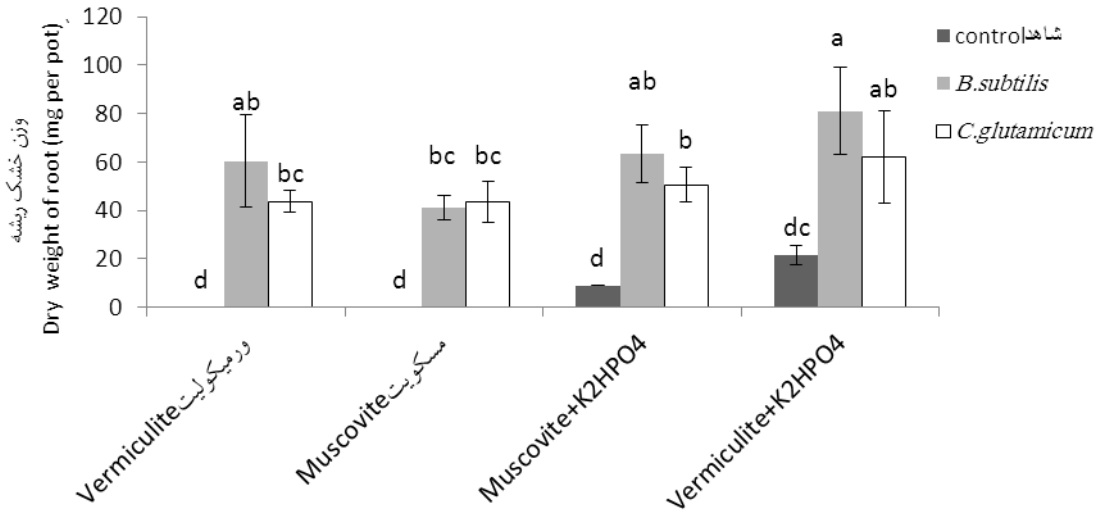
بانچیو و همکاران (۵) بیان کردند بهره‌گیری از باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش حجم ریشه‌ها گردیده که در نهایت جذب آب و مواد غذایی را افزایش داده و سبب افزایش عملکرد گیاه می‌شود. ساگمارن و جانارتام (۳۴) باکتریهای آزادکننده پتاسیم را از خاک جدا کرده و تأثیر آنها را بر آزادسازی پتاسیم از کانیهای پتاسیم‌دار خاک و همچنین رشد گیاه بادام زمینی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد باکتری *Bacillus mucilaginosus* MCRCP1 توانایی بالایی در آزادسازی پتاسیم از میکای مسکویت داشت و اندازه فسفر و پتاسیم قابل بهره‌گیری در خاک به گونه چشمگیری افزایش یافت. همچنین وزن خشک ریشه، اندام هوائی و درصد روغن در نتیجه این مایه زنی به گونه معنی‌داری افزایش یافت (۳۴). اگرچه تولید اسیدهای آلی و معدنی در این پژوهش بررسی نشده است اما بر پایه گزارشات موجود افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی نسبت به شاهد در پیامد مایه زنی با سویه‌های مورد آزمایش را می‌توان به تولید و ترشح ترکیباتی مثل اسیدهای آلی، معدنی، پلی ساکاریدها و سیدروفور توسط این سویه‌ها نسبت داد که مایه آزادسازی پتاسیم از ترکیبات نامحلول شده و به شکل قابل بهره گیری برای گیاه در آمده است. شنگ و همکاران(۲۷) گزارش کردند که تجزیه کانی‌های پتاسیم‌دار و آزادسازی پتاسیم توسط *Bacillus globisporus* به علت تولید اسیدهای آلی می‌باشد. محققین گزارش کردند که *Bacillus megaterium* قادر به تولید سیدروفور می‌باشد (۸).

تاثیر تیمارها بر غلظت و جذب پتاسیم توسط اندام هوایی گیاه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش تیمارها بر غلظت و جذب پتاسیم گیاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۵). نتایج آزمون میانگین برهم‌کنش تیمارها (شکل‌های ۷ و ۸) نشان داد که با افزودن پتاسیم محلول در ابتدای کشت به لوله‌ها غلظت و جذب پتاسیم در بودن هر دوکانی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد داشت.

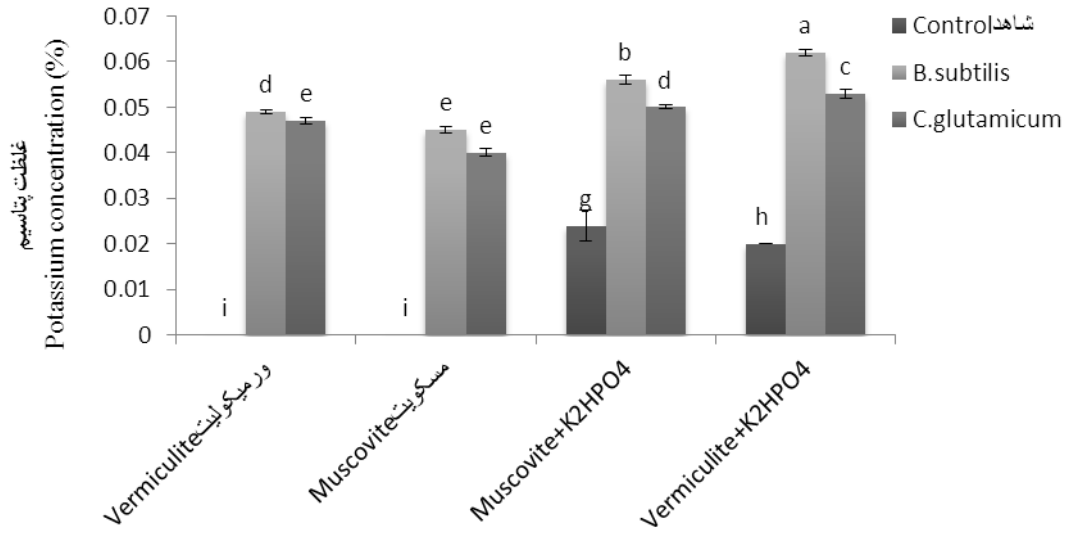
همچنین پیامد هر دو باکتری نیز در سطح ۵ درصد بر افزایش این دو صفت معنی‌دار بود. بیش‌ترین غلظت و جذب پتاسیم در گیاهان کشت شده در بستر ورمی‌کولیت مایه زنی شده با *Bacillus subtilis* و با افزودن پتاسیم محلول در ابتدای آزمایش دیده شد. پس از آن تیمار تغذیه شده با پتاسیم محلول در بستر ورمی‌کولیت با بودن *Corynehbacterium glutamicum* قرار داشت.

یادآور شود که غلظت پتاسیم گیاه در هر دو بستر ورمی‌کولیت و مسکویت در بودن هر کدام از باکتریها بدون افزودن پتاسیم به گونه معنی‌داری بالاتر از غلظت پتاسیم گیاه در هر دو بستر تغذیه شده با پتاسیم محلول و نبودن باکتری بود. در واقع در شرایط تغذیه‌ای بدون پتاسیم، گیاهان مایه زنی‌شده با باکتری انحلال کننده پتاسیم جذب پتاسیم بالاتری در برابر گیاهان بدون باکتری داشتند که این ناهمانندی از دیدگاه آماری چشم‌گیر است.



شکل ٦- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر وزن‌خشک ریشه

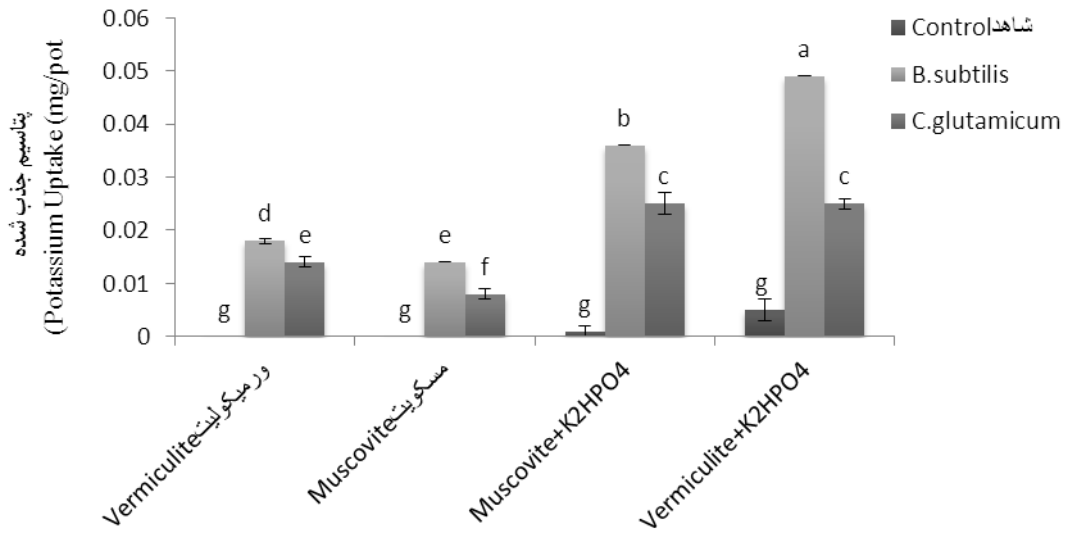
Figure 6- Mean comparison of treatments effect on dry weight of root



شکل ۷- آزمون میانگین پیامد تیمارها بر غلظت پتاسیم اندام هوایی

Figure 7- Mean comparison of treatments effect on potassium concentration of aerial part

این پژوهش نشان دهنده تاثیر مثبت باکتری بر تغذیه پتاسیمی گیاه از کانیهای دارای پتاسیم است. اگرچه گیاه در این بستر کشت با پتاسیم محلول تغذیه نشده است و هیچ گونه پتاسیمی از منبع خارجی دریافت نکرده است اما ریشه گیاه به همراه باکتری انحلال کننده پتاسیم با ترشح اسیدهای آلی و کاهش pH و ایجاد محیط ریزوسفری توانسته است کانی را هوادیده نموده و پتاسیم غیرتبادلی آن را جذب کند. افزایش غلظت پتاسیم اندام هوایی و ریشه در پیامد مایه زنی با باکتریهای آزاد کننده پتاسیم توسط محققین مختلفی گزارش شده است (۴، ۲۷و ۲۳). شنگ و هی (۲۸) افزایش درازی ریشه و بلندی گیاه و همچنین افزایش غلظت پتاسیم را در گیاه گندم مایه زنی شده با *Bacillus edaphicus* را گزارش کردند. وسی (۳۷)گزارش نمود که باکتریهای افزاینده رشد گیاه، نقش زیادی در جذب مواد غذایی در گیاه دارند و می توانند عناصر را از ریخت به گونه فراهم درآورند.



شکل۸ - آزمون میانگین پیامد تیمارها بر جذب پتاسیم توسط اندام هوایی

Figure 8- Mean comparison of treatments effect on potassium uptake by aerial part

خیامیم و همکاران (۱۶) در بررسی خود دیدند که فلوگوپیت توانست نیاز پتاسیمی گیاهان تحت کشت را به خوبی تأمین نماید به گونه ای که غلظت پتاسیم شاخسار جو در محدوده کفایت این عنصر قرار داشت. اندازه پتاسیم رها شده از کانی ورمی‌کولیت به گونه چشم‌گیری بیشتر از کانی مسکویت بود. این تفاوت را می‌توان به فاکتورهای مختلفی مثل ماهیت کانی های پتاسیم‌دار که شامل ساختار کریستالی، ترکیب شیمیایی کانی، درجه تخلیه و تغییر بار لایه‌ای کانی نسبت داد. در مسکویت اولاً موقعیت هیدروکسیل نسبت به ورقه‌های سیلیکات، مایل بوده و فاصله بین پروتون و پتاسیم زیادتر است و آزادسازی پتاسیم کمتر خواهد شد. اما در کانی ورمیکولیت این موقعیت عمودی بوده و پروتون نزدیک به پتاسیم قرار گرفته و نیروی دافعه بیشتری دارد، ثانیاً ابعاد ورقه‌های اکتاهدرال در کانی مسکویت کوچکتر از کانی ورمی‌کولیت است. در نتیجه پتاسیم در مسکویت با نیروی بیشتر نگهداری می‌شود (۱۴ و ۱۵).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان دریافت که گیاه گندم در شرایط تغذیه‌ای بدون پتاسیم در محیط ورمی‌کولیت و مسکویت نتوانسته است از پتاسیم کانی بهره‌گیری کند. هنگامی که بذر با محلول غذایی دارای پتاسیم در آغاز رشد تغذیه شدند، توانستند بسیار ناچیز رشد نمایند، اما با توجه به درازی دوره این آزمایش که بسیار کوتاه بود نمی‌توان اظهار داشت که آیا تا پایان رشد قادر خواهند بود از پتاسیم ساختاری این کانیها در پی تراوش های ریشه ای بهره‌گیری نمایند یا خیر. افزون بر نقش گیاه در بهره گیری از پتاسیم ساختمانی، اندازه آزادسازی پتاسیم از بین لایه های کانی وابسته به ریزجانداران خاک نیز می‌باشد. پژوهش انجام شده نشان داد که مایه زنی هر دو سویه به ریشه گیاه گندم حتی در صورت عدم بهره گیری از پتاسیم محلول در آغاز رشد ، مایه جذب بیشتر پتاسیم در برابر شاهد شد. رشد گیاه در پیامد مایه زنی با هر یک از این دو سویه به گونه چشم‌گیری افزایش پیدا کرد. چون توان آزادسازی پتاسیم در میان سویه‌های آزمایش شده ناهمانند بود بنابراین اندازه پتاسیم جذب شده در گیاه در پیامد مایه زنی با سویه‌ها نیز ناهمانند بود. همچنین اندازه رهاسازی پتاسیم از کانی ورمیکولیت در بودن و نبودن باکتری بیشتر از مسکوویت بود. بنابراین پژوهش و از آنجایی که اندازه کانی ورمی‌کولیت در استان خوزستان بالاست و این کانی منبع سرشاری از پتاسیم برای گیاه است، و از طرفی هر دو سویه باکتری از دیدگاه توان بهبود رشد و جذب پتاسیم در گیاه کارایی خوبی داشته اند می‌توان از این سویه‌ها پس از تایید در پژوهش میدانی در راستای کاهش کاربرد کود پتاسیمی بهره‌گیری نمود.

منابع

1. Ahmad S., and Haddad R. 2011. Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47 (1): 17–27.
2. Aleksandrov V.G., Blagodyr R.N., and Iiiev I.P. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate

bacteria. Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev), 29: 111-114.
3. Bacilio M., Rodrguez 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.
4. Badr M.A. 2006. Efficiency of K-feldspar combined with organic materials and silicate dissolving bacteria on tomato yield. Journal of Applied Sciences Research, 2: 1191-1198.
5. Banchio E., Bogino P.C., Zygadlo J., and Giordano W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Organum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 766-771.
6. Bordoloi N.K., and konwar B.K. 2008. Microbial surfactant enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 63: 73-82.
7. Cappiccinio J. 1992. Microbiology: A laboratory manual. The Benjamin Cummings publishinig company, INC.39. Bridge parkway Redwood city, California.
8. Chakraborty U., Chakraborty B., and Basnet M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in Camellia sinensis by *Bacillus megaterium.* Journal of Basic Microbiology, 46: 186 – 195.
9. Chithrashree A.C., Udayashankar S., Chandra Nayaka M.S., and Reddy C.S. 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Biological Control, 59: 114–122.
10. Girgis M. G. Z., Khalil H.M.A., 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 (1):68-81.
11. Glick B.R. 2004. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. Advances in Applied Microbiology, 56:291–312.
12. Goldstein A.H. 1994. Involvement of the quino protein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogeneous mineral phosphates by gram negative bacteria. Pp. 197-203. In: Torriani-Gorini. A, Yagil E and Silver S, (eds.) Phosphate in Micro-Organisms: Cellular and Molecular Biology. Washington DC, ASM Press.
13. Hu X.F., Che, J., and Guo J.F. 2006. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannumountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 983-990.
14. Huang P.M., and Song S. 1988. Dynamics of potassium release from potassiumbearing minerals as influenced by oxalic and citric acids. Soil Science Society of American Journal, 52: 383-390.
15. Khayamim F., Khademi H., and Sabzalian R. 2011. Effect of *Neotyphodium* endophyte-tall fescue symbiosis on mineralogical changes in clay-sized phlogopite and muscovite. Plant and Soil, 341: 473-484.
16. Khyamim F., Khademi H., Khoushgoftarmanesh A.H., and Ayoubi Sh. 2010. Ability of barley (*Hordeum vulgare* L.) to take up potassium from di-and tri-octahedral micas. Journal of Water and Soil, 23: 4. 170-178. (in Persian with English abstract)
17. Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., and Zaleska I. 1987. Growth promoting of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *pseudomona putida* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology, 33: 390-395.
18. 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.
19. Liu W., Xu X., Yang Q., and Chrisite P. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health, 28:133–140.
20. Naher U.A., Othman R., Shamsuddin Z.H.J., Saud H.M., and Ismail R. 2009. Growth Enhancement and Root Colonization of Rice Seedlings by *Rhizobium* and *Corynebacterium* spp. Internatianal Journal of Agriculture and Biology, 11(5): 1814–9596.
21. Patten C.L., and Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. Applied Environmental Microbiology, 3795-3801.
22. Pettigrew W.T. 2008. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. Physiologia Plantarum, 133: 670–681.
23. Prajapati K., Sharma M.C., and Modi H.A. 2013. Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculentus*). International Journal of Agricultural Sciences and Research, 3(1): 181-188.
24. Rai M. K. 2006. Hand book of microbial biofertilizers. Food products press, an imprint of the Haworth press, Inc, PP: 137-182.
25. Rogers J.R., and Bennett P.C. 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chemical Geology, 203: 91-108.
26. Sarikhani M.R. 2015. Increasing potassium (K) release from K-containing minerals in the presence of insoluble phosphate by bacteria. Biological Journal of Microorganism, 4(16): 87-96.
27. Sheng X.F., Zhao F., He L.Y., Qiu G., and Chen L. 2008. Isolation and characterization of silicate mineral solubilizing *Bacillus globisporus Q12* from the surfaces of weathered feldspar. Canadian Journal of Microbiology, 54: 1064-1068.
28. 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(1): 66-72.
29. 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 Soil Biochemistry, 37: 1918-1922.
30. Sheng X.F., He L.Y., and Huang W.Y. 2002. The conditions of releasing potassium by a silicate dissolving bacterial strain NBT. Agricultural Sciences in China, 1: 662-666.
31. Shilev S., Sancho D.E., and Benlloch-Gonzalez M. 2010. Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. Journal of Environmental Management, 1-5.
32. Sparks D.L. 1987. Potassium dynamics in soils. Advances in Soil Science, 6: 1- 63.
33. Sparks D.L., and Huang P.M. 1985. Physical chemistry of soil potassium. pp: 201–276. In: Munson R. D (Ed.), Potassium in Agriculture. Amatuer Softball Association (ASA),
34. Sugumaran P., and Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Science, 3: 350-355.
35. Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K. K., De, R., Saxena A.K., Nautiyal C.S., Mittal S., Tripathi A.K., and Johri B.N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current science, 89(1): 136-150.
36. Tolay I., Erenoglu B., and Cakmak I. 2001. Phytosiderophore release in Aegilopsis and Triticum species under zinc and iron deficiencies. Journal of Experimental Botany, 52:1093-1099.
37. Vessey F. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Biomedical and Life Sciences. Plant and Soil, 255(2): 571-586.
38. 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 (2):697-703.
39. Yu X., Ai C., Xin L., and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis CAS15*, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology, 47:138-145.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 4, Sept.-Oct. 2017, p. 1120-1134

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۶، ص. ۱۱۳۴-۱۱۲۰

Potassium Solubilizing Bacteria Ability to Increase Wheat Growth and Potassium uptake under in vitro Condition

N. Enayatizamir[1*]- A. Landi [2]

Received: 07-08-2016
Accepted: 01-05-2017

Introduction: Potassium (K) is the third major essential macronutrient for plant growth. Without adequate potassium, the plants will have poorly developed roots, grow slowly, produce small seeds and have lower yields. Due to imbalanced fertilizer application, potassium deficiency is becoming one of the major constraints in crop production. The concentrations of soluble potassium in the soil are usually very low and more than 90% of potassium in the soil exists in the form of insoluble rocks and silicate minerals. Soil microbes have been reported to play a key role in the natural K cycle and therefore, potassium solubilizing microorganisms present in the soil could provide an alternative technology to make potassium available for uptake by plants. Thus, identification of microbial strains capable of solubilizing potassium minerals quickly can conserve our existing resources and avoid environmental pollution hazards caused by heavy application of chemical fertilizers.

Materials and Methods: This study aimed to isolate and identified potassium solubilizing bacteria and evaluate those effect on K availability from muscovite and vermiculite sources to wheat crop under *in vitro* condition. The study was conducted as factorial in completely randomized design at three replications included bacterium inoculation (control, isolate1, isolate 2) and four k sources (muscovite, vermiculite, muscovite+ K_2HPO_4, vermiculite+ K_2HPO_4). Bacterial isolates were obtained from wheat rhizosphere on modified Aleksandrov medium containing muscovite and vermiculite powder as potassium source. Nutrient broth medium was used to prepare an overnight culture of bacteria to inoculate in Aleksandrov medium, which was used to study the dissolution of silicate minerals. The zone of solubilization recorded on Aleksandrov medium. Then the ability of two bacterial strains, including *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* to release mineral K from muscovite and vermiculite was investigated. After 18 days of seed culture, aerial part of plant growth was dry digested and K concentration was determined by flame photometry. Dry and fresh weight of aerial part and root, plant height and root length was recorded.

Results: Three K-solubilizing isolates from 15 isolates identified by biochemical and molecular methods which belonged to *Bacillus subtilis, Pseudomonas putida* and *Corynebacterium glutamicum*. The potassium solubilization zone of each strain on Aleksandrov medium containing muscovite were 8.1, 65.1 and 6.3, respectively. The zone was also 9, 8 and 5.8 in Aleksandrov medium in the presence of vermiculite as insoluble potassium source. According to these results potassium release from vermiculite was more than muscovite, in spite of more potassium content of muscovite. According to the obtained results two strains *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* were selected for in vitro experiment because of halo to colony diameter ratio. The ratio of halo to colony diameter in the presence of muscovite for *Bacillus subtilis, Pseudomonas putida* and *Corynebacterium glutamicum* was 1.5, 0.72 and1.3, respectively. These ratios were 2, 1.4 and 0.8, respectively in the medium containing vermiculite as insoluble potassium source. The results showed that the effect of bacteria inoculation was significant ($p<0.01$) on all measured parameters. After being treated with the each of KSB strains, plant dry weight and uptake of K by wheat seedlings increased significantly. These increases were higher with the combination of *Bacillus subtilis* inoculation and vermiculite powder addition. Potassium concentration of plant was depended to culture medium. Maximum K solubilization occurred when vermiculite was used as a potassium source followed by K_2HPO_4. Also K concentration of plants was significantly ($p<0.05$) affected by bacteria. In our study *Bacillus subtilis* showed the most pronounced beneficial effect on plant growth and K concentration by wheat seedlings. There was significant difference between potassium concentration in aerial part of wheat seedling cultivated in bacteria free medium with soluble potassium and medium containing bacteria without soluble potassium. This results shows the importance of potassium solubilizing bacteria to supply potassium for plant.

Discussion and Conclusion: The enhanced release of mineral K might be attributed to the release of organic

1, 2- Associate Professor and Full Professor of Soil Science, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
(*-Corresponding Author Email: n.enayatzamir@scu.ac.ir)

acids from the bacteria, a mechanism which plays a pivotal role in solubilizing potassium from inorganic source of potassium. According to the results combining the inoculation of potassium solubilizing bacteria and the addition of K bearing minerals could be a promising sustainable alternative to commercial K fertilizer and may help maintain the availability of soil nutrients. Further studies are necessary to determine the effects of these bacterial strains on mobilization of potassium-bearing minerals under field conditions.

Keywords: Dry weight, Height, Insoluble potassium, Muscovite, Vermiculite