

## جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از سنگ شیل گلاکونیت‌دار استان گلستان و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آنها

سید عبدالصاحب حسینی<sup>۱</sup>، محسن علمائی<sup>۲</sup>، سید علیرضا موحدی نائینی<sup>۳</sup>، فرهاد خرمالی<sup>۴</sup> و رضا قربانی نصرآبادی<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۲- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۳- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۴- استاد گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۵- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخچه مقاله	چکیده
دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۳ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۲/۱۱	هوادیدگی زیستی کانی‌های سیلیکاتی منبع عمده پتاسیم برای گیاهان در شرایط طبیعی می‌باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از سنگ شیل گلاکونیت‌دار در استان گلستان و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آنها بود. تعداد پنج نمونه یک کیلوگرمی از خاک ریزوسفر گندم از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری و پنج نمونه یک کیلوگرمی از سنگ شیل گلاکونیت‌دار جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها، سنجش میزان آزادسازی پتاسیم در محیط کشت الکساندروف حاوی مسکویت و گلاکونیت به روش نورسنجی شعله‌ای انجام شد. شناسایی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی آنها انجام گردید. آزمون‌های محرک رشدی در جدایه‌هایی که از لحاظ ظاهری متفاوت بوده و از توانمندی بالایی در آزادسازی پتاسیم برخوردار بودند صورت پذیرفت. در نهایت بهترین جدایه با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA شناسایی شد. از تعداد ۴۰ جدایه اولیه، ۲۰ جدایه از خاک ریزوسفری و ۲۰ جدایه از خاک حاصل از پودر سنگ شیل گلاکونیت‌دار جداسازی شدند. آزادسازی پتاسیم توسط ۱۰ جدایه برتر نشان داد که بیشترین مقدار پتاسیم آزاد شده مربوط به جدایه ۳۹ به میزان ۳۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر از مسکویت و ۳۱/۸ میلی‌گرم بر لیتر از گلاکونیت بود. بیشترین مقدار سیدروفور، اکسین و انحلال فسفر نامحلول توسط جدایه شماره ۳۹ مشاهده گردید. نتایج توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA نشان داد که جدایه ۳۹ متعلق به گونه <i>آرتروباکتر فناترینیورانس</i> بود. این مطالعه نشان داد باکتری‌های بومی از توانایی خوبی در آزاد کردن پتاسیم از منبع شیل گلاکونیتی برخوردارند.

\* عهده دار مکاتبات

Email: olamaee-m@yahoo.com

## مقدمه

مقدار متوسط پتاسیم پسته زمین در حدود ۲/۴ درصد است. پتاسیم موجود در خاک به چهار شکل ساختمانی، پتاسیم غیرقابل تبادل، پتاسیم قابل تبادل، و محلول یافت می‌شود و گیاهان پتاسیم را در شکل محلول جذب می‌کنند (۷). با این حال در حدود ۹۰ الی ۹۸ درصد پتاسیم خاک، به شکل ذخائر معدنی و کانی‌های خاک است که به راحتی در دسترس گیاه قرار نمی‌گیرد (۲۸). مهم‌ترین منابع پتاسیم در خاک‌های معدنی آلومینوسیلیکات‌های اولیه شامل فلدسپارها و میکاها می‌باشند، ولی به طور کلی میکاها مهم‌ترین منبع طبیعی پتاسیم در خاک‌ها هستند. زمانی که پتاسیم محلول و تبدلی خاک به کمتر از حد کفایت گیاه کاهش می‌یابد، پتاسیم غیرتبدلی می‌تواند از بین لایه‌های کانی‌های رسی آزاد گردد، مقدار پتاسیم آزاد شده در این شرایط تحت تأثیر مقدار و نوع کانی‌های ثانویه پتاسیم‌دار مانند میکاها، رس‌های ایلاتی و ورمی‌کولیت می‌باشد (۲۳).

یکی از مهم‌ترین کانی‌های سیلیکاتی با پتاسیم بالا کانی گلاکونیت است. سنگ شیل گلاکونیت‌دار به عنوان یک کانی سیلیکاتی حاوی سه تا هفت درصد پتاسیم می‌باشد و یکی از منابع کودهای غیرشیمیایی با منشأ طبیعی است که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تا آن‌که بتواند به‌عنوان یک منبع مناسب جهت تأمین نیازهای پتاسیمی گیاهان نقش مهمی را ایفا کند (۱۲). این کانی جزء خانواده میکاها و میکاهای اکتاهدرال می‌باشد که به صورت یک سیلیکات ورقه‌ای آلومینیوم غنی از آهن و پتاسیم با شبکه لایه‌ای ۲:۱ هستند و به عنوان رهاکننده پتاس برای گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۴). این کانی در زون کپه داغ (سازند آیتامیر) استان گلستان که یکی از قطب‌های مهم کشاورزی کشور می‌باشد به وفور یافت می‌شود.

پتاسیم یک عنصر مهم در رشد و نمو گیاهان می‌باشد و به عنوان اسمولیت معدنی عمده در تنظیم اسمزی و نگهداری فشار تورگر در گیاهان نقش دارد. این عنصر

باعث توسعه سلولی، عمل سلول‌های روزنه، حرکات برگ و در فعال‌سازی تعداد زیادی از آنزیم‌ها، فتوسنتز، ساختن پروتئین‌ها، متابولیسم اکسیداتیو، تعادل بار الکتریکی غشاهای سلولی، تشکیل و انتقال نشاسته، قند و چربی‌ها موثر است (۴).

گروهی از باکتری‌های مفید خاکری علاوه بر آزادسازی پتاسیم، با استفاده از مجموعه عواملی سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند که به آنها باکتری محرک رشدی گیاه<sup>۱</sup> گفته می‌شود. باکتری‌های محرک رشد قادرند با استفاده از روش‌هایی مانند افزایش انحلال عناصر غذایی کم‌محلول مانند فسفر، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن)، تولید اکسین، رهاسازی متابولیت‌های ثانویه نظیر تنظیم‌گرها یا هورمون‌های رشد و موادی از این قبیل و یا تسهیل جذب عناصر غذایی از محیط رشد گیاه باعث تحریک و افزایش رشد گیاه شوند (۸). جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها جز دسته باکتری‌های محرک رشدی گیاه هستند، اما از بین این باکتری‌ها جنس‌های *سودوموناس*، *باسیلوس* و *آرتروباکتر* از شاخص‌ترین آن‌ها می‌باشند (۲۱). ریزجانداران باکتریایی آزادکننده پتاسیم غالباً هتروتروف و هوازی بوده و سازوکارهای آن‌ها در رهاسازی پتاسیم شامل تولید و ترشح اسیدهای آلی و پروتون، ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید لیگاندهای آلی و سیدروفورها می‌باشند. بنابراین هنگامی که کمبود پتاسیم رخ می‌دهد با فعالیت ریزجانداران باکتریایی در محیط ریزوسفر، کانی‌ها هواده شده و پتاسیم خود را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (۷).

درج‌در و همکاران (۹) باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم<sup>۲</sup> را در خاک‌های ریزوسفری گیاهان بررسی نمودند و جدایه‌های *سودوموناس*، *باسیلوس* و *پنی‌باسیلوس* مهم‌ترین باکتری‌ها در آزادسازی و حل‌کنندگی پتاسیم در این مطالعه بود. عرب‌عامری و همکاران (۲) باکتری‌های

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

2- potassium solubilizing bacteria

رقت‌سازی متوالی، محلول تهیه و بر روی محیط انتخابی الکساندروف آگار بر حسب گرم بر لیتر (ساکارز ۱۰ گرم، فسفات پتاسیم سه‌آبه دو گرم، سولفات منیزیم هفت‌آبه پنج گرم، کربنات کلسیم یک گرم، آگار ۱۵ گرم، مسکویت پنج گرم و  $\text{pH}=7/5$ ) کشت گردیدند. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند (۲۲). برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از روش لکه‌گذاری و تولید هاله شفاف در اطراف کلنی روی محیط الکساندروف آگار استفاده گردید (۹، ۱۷، ۲۰). واکنش گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی، آزمون‌های تحریک‌کنندگی رشدی گیاه روی ۴۰ جدایه جداسازی شده انجام شد. آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، ساکارز، احیای نیترات، لوان، سترات، حرکت، آزمون هوازی و بی‌هوازی بودند (۲۵). نمونه‌های جداسازی شده برتر در ادامه خالص‌سازی و روی اسلنت حاوی آگار مغذی در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

#### انحلال کمی پتاسیم در محیط الکساندروف از کانی مسکویت و گلاکونیت

تعداد ۴۰ جدایه مرحله قبل در محیط کشت<sup>۱</sup> TSB بر حسب گرم بر لیتر (۱۵ گرم کازئین هیدرولیز شده به طریقه آنزیمی، پنج گرم آرد سویای هضم شده به وسیله آنزیم پیپسین، پنج گرم کلرید سدیم، و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با سرعت تکان دادن ۱۲۰ دور در دقیقه پیش کشت داده و پس از یکسان‌سازی جمعیت ( $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ) به میزان ۵۰۰ میکرولیتر در ۵۰ میلی‌لیتر محیط تخمیر TSB تلقیح شدند و مقدار یک میلی‌لیتر از کشت تازه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر از هر دو محیط با سه تکرار تلقیح و برای شمارش جمعیت باکتری‌ها از روش شمارش کلنی روی پلیت حاوی محیط کشت جامد<sup>۲</sup> استفاده شد. مقدار کانی شیل گلاکونیت‌دار در محیط کشت بر اساس مقدار پتاسیم موجود در کانی مسکویت معادل‌سازی و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در

حل‌کننده پتاسیم را از کانی‌های سیلیکاتی جداسازی نمودند و جدایه‌های سودوموناس را معرفی کردند. هان و لی (۱۳) سویه‌های مختلف باکتریایی آزادکننده پتاسیم را از کانی‌های سیلیکاتی مسکویت مطالعه نمودند نتایج مطالعه آنها نشان داد که سویه‌های *باسیلوس*، *آرتروباکتر* و *سودوموناس*، توانایی بالایی در آزادسازی پتاسیم دارند. همچنین، فرانزوسی و همکاران (۱۲)، الیا و همکاران (۱۰) باکتری‌های آزادکننده پتاسیم را در کانی سیلیکاتی شیل گلاکونیت‌دار بررسی نمودند؛ نتایج مطالعه آنها نشان داد که جنس‌های *سودوموناس* و *آرتروباکتر* سویه‌های برتر و دارای توانایی بسیار بالایی در آزادسازی پتاسیم می‌باشند. با توجه به مطالعات محدود در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم از کانی سیلیکاتی شیل گلاکونیت‌دار بومی در کشور، هدف از این پژوهش، بررسی و جداسازی این باکتری‌ها، همچنین شناسایی، غربال‌گری با روش‌های بیوشیمیایی و بررسی کمی و کیفی سویه‌ها و انتخاب سویه برتر در آزادسازی پتاسیم می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های سیلیکاتی، تعداد پنج نمونه از خاک ریزوسفر گندم و پنج نمونه از سنگ شیل گلاکونیت‌دار در سازند آیتامیر استان گلستان در فروردین ۱۳۹۴ جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیولوژی گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال، و بلافاصله مراحل جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های باکتریایی آغاز شد.

#### جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده

**پتاسیم:** نمونه‌های خاک ریزوسفری و سنگ شیل گلاکونیت‌دار پس از پودر شدن از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند. سه گرم از هر نمونه به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط مایع الکساندروف انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و با سرعت تکان دادن ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت (۹). از نمونه‌های موجود با روش

1- Tryptic Soy Broth (TSB)

2- Count Plate

۵۳۰ نانومتر قرائت شد. میزان اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب با منحنی استاندارد غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شده از ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه گردید (۲۰).

### اندازه‌گیری کمی توان حلالیت فسفات معدنی نامحلول

به منظور اندازه‌گیری میزان حلالیت فسفر ۱۰ جدایه برتر در محیط مایع، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت PKV<sup>۴</sup> واحدها بر حسب گرم بر لیتر (۱۰، Glucose، ۰/۵، (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>، ۰/۵، NaCl، ۰/۵، KCl، ۰/۱، MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O، ۰/۵، Yeast، ۰/۵، FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O، ۰/۵، MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O، extract، ۵، (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) منتقل گردید؛ سپس نمونه‌ها به مدت چهار روز بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از زمان انکوباسیون نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، قرار گرفت و میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر توسط باکتری با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های (۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر فسفر) مختلف KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> محاسبه گردید (۱۳). از بین ۱۰ جدایه برتر یک جدایه که دارای بیشترین مقدار آزادسازی پتاسیم و تحریک‌کنندگی رشدی گیاه را داشت برای شناسایی مولکولی انتخاب شد.

### شناسایی مولکولی جدایه منتخب با روش تکثیر 16S rRNA و توالی‌یابی آن

استخراج و خالص‌سازی DNA ژنومی جدایه انتخابی برای شناسایی مولکولی و به منظور تکثیر قطعه 16S rRNA انجام شد. تکثیر قطعه 16S rRNA باکتری به

دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند (۱۵). مقدار پتاسیم آزاد شده در روزهای پنجم و دهم با استفاده از روش نور سنجی شعله‌ای با استفاده از دستگاه مدل (Model PFP7 Flame Photometer) قرائت شد (۱۷). تعداد ۱۰ جدایه برتر این مرحله برای ادامه آزمون تحریک‌کنندگی رشدی گیاه انتخاب شدند.

### آزمون‌های محرک رشدی در جدایه‌های برتر حل‌کننده پتاسیم

**توانایی تولید سیدروفور:** آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور توسط ۱۰ جدایه برتر با استفاده از محیط کشت Cas-Agar انجام گرفت، این محیط بر اساس روش اصلاح‌شده‌ی الکساندر و زوبرر (۱) تهیه و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه‌گذاری روی پلیت‌ها تلقیح شد، توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل‌گرفته در اطراف کلنی باکتری‌ها و بعد از گذشت ۱۲۰ ساعت ارزیابی گردید (۷).

### آزمون کمی توان تولید اکسین

اندازه‌گیری توان تولید اکسین (IAA)<sup>۱</sup> توسط ۱۰ جدایه برتر با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوفسکی انجام گرفت. باکتری‌های جدا شده در محیط TSA<sup>۲</sup> کشت و به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۳). از کلنی‌های رشد یافته برای تلقیح ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی ال-تریپتوفان<sup>۳</sup> با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. از ارلن‌های مذکور در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت نمونه‌گیری شد و پس از گذراندن مراحل سانتریفیوژ، محلول شفاف رویی به آرامی جدا و یک میلی‌لیتر از این محلول به دو میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (دو میلی‌لیتر محلول نیم مولار FeCl<sub>3</sub> و ۹۸ میلی‌لیتر HClO<sub>4</sub> ۳۵ درصد) افزوده شد. در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج

1- Indole-3- acetic acid

2- Tryptic Soy Agar (TSA)

3- L-Tryptophane

4- Pikovskaya (PKV)

توانایی انحلال پتاسیم و فسفر را داشتند با استفاده از محیط حاوی کانی‌های پتاسیم و فسفر مانند کائولینت و فلدسپار جداسازی کردند. در ادامه از میان ۴۰ نمونه باکتری جداسازی شده، ۱۰ جدایه به‌عنوان جدایه‌های برتر (جدایه‌های ۱-۳-۱۱-۱۴-۱۹ از خاک حاصل از پودر کانی گلاکونیت و جدایه‌ها ۲۲-۲۷-۳۱-۳۸-۳۹ از خاک ریزوسفر گندم) انتخاب شدند. پس از انجام آزمون‌های مختلف محرک رشدی شامل تولید سیدروفور، تولید اکسین و حل‌کنندگی فسفات از منبع تری‌کلسیم فسفات، در نهایت جدایه شماره ۳۹ از خاک ریزوسفر گندم جهت انجام آزمایش‌های مولکولی انتخاب گردید.

### سنجش آزادسازی پتاسیم از کانی مسکویت

تجزیه واریانس منابع تغییرات مربوط به میزان آزادسازی پتاسیم به‌صورت اسپلیت در زمان، نشان از تأثیر زمان بر این ویژگی با اطمینان ۹۹ درصد می‌باشد (جدول ۲). نتایج تأثیر جدایه‌ها بر آزادسازی پتاسیم در محیط الکساندروف (با کانی مسکویت) در بازه زمانی پنج و ۱۰ روز (جدول ۳) نشان داد که میزان آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌ها با افزایش زمان گرماگذاری افزایش می‌یابد. بین مقدار پتاسیم آزاد شده در دو بازه زمانی پنج و ۱۰ روز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود داشت ( $P < 0.05$ ). بر اساس نتایج به‌دست آمده میزان پتاسیم آزاد شده در پنج روز از ۱۱/۶ تا ۳۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر و در ۱۰ روز از ۱۳/۷ تا ۳۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود و جدایه‌های شماره ۱، ۳، ۱۱، ۱۴، ۱۹، ۲۲، ۲۷، ۳۱، ۳۸ و ۳۹ به ترتیب با ۲۷/۲، ۳۰/۳، ۲۸/۳، ۳۰/۵، ۳۰/۱، ۲۷/۱، ۳۱/۸، ۳۰/۷، ۳۰/۲ و ۳۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر پتاسیم به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند. بیشترین میزان آزادسازی پتاسیم مربوط به جدایه شماره ۳۹ با ۳۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر بود.

### سنجش آزادسازی پتاسیم از سنگ شیل گلاکونیت‌دار

نتایج تأثیر جدایه‌ها بر آزادسازی پتاسیم در محیط الکساندروف (با سنگ شیل گلاکونیت‌دار) در بازه زمانی پنج و ۱۰ روز (جدول ۴) نشان داد که میزان آزادسازی

روش استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و با استفاده از پرایمرهای (5'-) F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', R: 5'- (GGTTACCTTGTTACGACTT-3 صورت گرفت. پس از تکثیر قطعه 16S rRNA تعیین توالی آن توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام پذیرفت. توالی خوانده شده سپس با استفاده از برنامه Blast N با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مقایسه شد.

**آنالیز آماری:** برای ارزیابی میزان آزادسازی پتاسیم، آزمایش به‌صورت خردشده در زمان (اسپلیت در زمان) و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا و تجزیه شد. آزمایش مربوط به میزان فسفر و اکسین اندازه‌گیری شده برای هر محیط به‌صورت طرح اسپلیت در زمان انجام گردید، به نحوی که اثر جدایه به‌عنوان فاکتور اول و زمان به‌عنوان فاکتور دوم مورد تجزیه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

### نتایج و بحث

#### جداسازی و خالص‌سازی

تعداد ۴۰ جدایه (شماره یک تا ۲۰ از خاک حاصل از پودر سنگ شیل گلاکونیت‌دار و شماره ۲۰ تا ۴۰ از خاک ریزوسفر گندم) با قابلیت آزادسازی پتاسیم با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی و همچنین برخی آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمون گرم بر اساس روش‌های استاندارد آنها در حد جنس احتمالی جداسازی و شناسایی شدند (جدول ۱). نورکینا و پامیناسکایا (۱۸) دو جنس *باسیلوس* و *سودوموناس* را از خاک ریزوسفری گیاهان زراعی مختلف تحت عنوان باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم جداسازی نمودند. فانگ و یان (۱۱) باکتری *باسیلوس موسیلاثرینوس* که توانایی انحلال کانی‌های پتاسیم‌دار مانند فلدسپار و ایلایت را داشتند جداسازی و شناسایی نمودند. هو و همکاران (۱۴) دو گونه *باسیلوس* که





جدول (۲) نتایج تجزیه واریانس شامل میانگین مربعات (درجه آزادی) تاثیر جدایه‌های باکتریایی، زمان و محیط کشت بر آزادسازی عناصر غذایی در شرایط آزمایشگاهی

Table (2) Results of analysis of variance including mean squares (degree of freedom) of bacterial, time and media factors on nutrients release under laboratory conditions

میانگین مربعات (درجه آزادی)			منابع تغییرات
Mean of squares (df)			
تولید اکسین	انحلال فسفات	آزادسازی پتاسیم	Sources of variations
Auxin production	Phosphate solubilization	Potassium release	جدایه (Isolate)
1038.23** (9)	48452.59** (9)	143.39** (39)	محیط کشت (Medium)
-	-	614.28** (1)	جدایه در محیط کشت (Isolate × Medium)
-	-	29.69** (39)	خطای a (Error a)
7.56 (20)	12.82 (20)	0.02 (80)	زمان (Time)
996.52** (2)	17739.78** (4)	906.67** (1)	جدایه در زمان (Isolate × Time)
75.35** (18)	744.97** (36)	59.29** (39)	محیط در زمان (Time × Medium)
-	-	28.94** (1)	جدایه در محیط در زمان (Isolate × Time × Medium)
-	-	39.56** (39)	خطای b (Error b)
4.04 (40)	10.32 (80)	0.02 (80)	ضریب تغییرات (درصد) (Coefficient of variation (%))
13.19	1.93	0.72	

\*\* به معنی وجود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح یک درصد است

\*\* Indicating statistical significant difference at  $P < 0.01$

جدول (۳) تاثیر جدایه‌ها بر آزادسازی پتاسیم (میلی گرم بر لیتر) از مسکوویت در محیط الکساندروف در بازه زمانی پنج و ۱۰ روز

Table (3) The effects of isolates on potassium ( $\text{mg l}^{-1}$ ) release from muscovite in Alexandrov medium in periods of 5 and 10 days

جدایه‌ها	رهاسازی پتاسیم در پنج روز	رهاسازی پتاسیم در ۱۰ روز	جدایه‌ها	رهاسازی پتاسیم در پنج روز	رهاسازی پتاسیم در ۱۰ روز
Isolates	Potassium release in 5 days	Potassium release in 10 days	Isolates	Potassium release in 5 days	Potassium release in 10 days
1	25.7	27.2	21	16.8	22.8
2	16.8	18.1	22	23.4	27.1
3	29.6	30.3	23	25.6	26.5
4	11.4	19.7	24	16.1	15.2
5	11.1	23.8	25	28.1	30.4
6	10.6	22.7	26	17.8	26.5
7	13.1	27.7	27	26.8	31.8
8	11.2	26.3	28	15.6	23.2
9	14.8	24.4	29	19.6	28.4
10	17.2	20.7	30	25.9	28.1
11	26.7	28.3	31	28.3	30.7
12	11.6	20.4	32	20.5	23.8
13	22.1	18.3	33	15.1	25.6
14	25.3	30.5	34	18.9	24.1
15	24.5	21.8	35	15.4	26.9
16	15.4	27.7	36	16.6	26.2
17	13.8	27.5	37	15.6	25.9
18	18.9	31.1	38	28.3	30.2
19	29.6	30.1	39	30.9	34.2
20	12.8	25.5	40	13.7	29.9



جدول (۴) تأثیر جدایه‌ها بر آزادسازی پتاسیم (میلی گرم بر لیتر) از سنگ شیل گلاکونیت‌دار در محیط الکساندروف در بازه زمانی پنج و ۱۰ روز

Table(4) The effects of isolates on potassium ( $\text{mg l}^{-1}$ ) release from glauconitic shale in Alexandrov medium in periods of 5 and 10 days

جدایه‌ها	رهاسازی پتاسیم در پنج روز	رهاسازی پتاسیم در ۱۰ روز	جدایه‌ها	رهاسازی پتاسیم در پنج روز	رهاسازی پتاسیم در ۱۰ روز
Isolates	Potassium release in 5 days	Potassium release in 10 days	Isolates	Potassium release in 5 days	Potassium release in 10 days
1	27.9	23.4	21	17	23.4
2	15.7	26	22	23.5	26
3	26.9	19.4	23	14.4	19.4
4	15.8	15.6	24	17.7	15.6
5	11.9	15.3	25	9.8	15.3
6	14.5	18.9	26	13.4	18.9
7	16.7	25.3	27	24.1	25.3
8	8.5	23.7	28	16.2	23.7
9	12.6	23.4	29	10	23.4
10	14.8	26.7	30	11	26.7
11	21.7	28.3	31	25	28.3
12	17.2	23.8	32	20.7	23.8
13	18.4	19.4	33	16.7	19.4
14	26	21.9	34	19.6	21.9
15	23.5	24.5	35	8.5	24.5
16	11.8	21.2	36	15.8	21.2
17	12.5	14.1	37	11.5	14.1
18	12.4	29.8	38	25.2	29.8
19	28.8	31.8	39	29.6	31.8
20	21.9	16.8	40	13.1	16.8

### مقایسه آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌های برتر در دو محیط مسکویت و سنگ شیل گلاکونیت‌دار

نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که زمان گرماگذاری از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر میزان آزادسازی پتاسیم در کانی‌ها می‌باشد. عرب‌عامری و همکاران (۲) در مطالعه خود نشان دادند که زمان گرماگذاری تأثیر مثبتی بر میزان آزادسازی پتاسیم دارد.

با افزایش زمان گرماگذاری میزان پتاسیم در چهار روز به مقدار ۳۱/۸۷ میلی‌گرم بر لیتر بود. ونگ و همکاران (۲۹) در مطالعه خود نشان دادند که ارتباط مثبتی بین زمان گرماگذاری با آزادسازی پتاسیم وجود دارد و با افزایش زمان گرماگذاری اندازه آزادسازی پتاسیم افزایش پیدا می‌کند آنها اندازه آزادسازی را در

سه بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بررسی کردند و نشان دادند که بیشترین اندازه آزادسازی به مقدار ۵۱ میلی‌گرم بر لیتر در ۲۱ روز به دست آمده است. افزایش زمان گرماگذاری به دلیل تولید بیشتر اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها عامل افزایش حلالیت پتاسیم می‌باشد (۱۹). بدر و همکاران (۶) نشان دادند که اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌های سیلیکاتی مانند اسید سیتریک، اسید تارتاریک، اسید مالیک، اسید سوکسینیک، و اسید اگزالیک در حلالیت کانی‌های پتاسیم‌دار مؤثر می‌باشند. توانایی آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در pH ۵/۶-۵/۶ در مدت هفت روز، به میزان ۳۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر است و در نتیجه با افزایش زمان گرماگذاری این مقدار افزایش می‌یابد (۱۶).

جدول (۵) مقایسه آزادسازی پتاسیم (میلی گرم بر لیتر) توسط جدایه‌های برتر از مسکویت و گلاکونیت  
 Table (5) Comparison of potassium ( $\text{mg l}^{-1}$ ) release by superior isolates from muscovite and glauconite

کانی Mineral	جدایه‌ها Isolates									
	1	3	11	14	19	22	27	31	38	39
مسکویت (Muscovite)	27.2	30.3	28.3	30.5	30.1	27.1	31.8	30.7	30.2	34.2
گلاکونیت (Glauconite)	29.7	28.3	26.9	28.2	29.2	26	25.3	28.3	29.8	31.8

درصد سویه‌ها بالاتر از ۱۹ میلی‌متر در روز می‌باشد و سویه‌های برتر انتخاب شده توان بالایی برای تولید سیدروفور دارند. ونگ و همکاران (۲۹) نشان دادند سویه‌های برتر در آزادسازی پتاسیم از جنس‌های سودوموناس و آرتروباکتر بوده که توانایی بالایی در تولید سیدروفور داشتند. رسولی صدقیانی و همکاران (۲۵) میزان تولید سیدروفور را در سویه‌های سودوموناس بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که گونه‌های بومی توانایی تولید سیدروفور بیشتری نسبت به گونه‌های غیر بومی دارند.

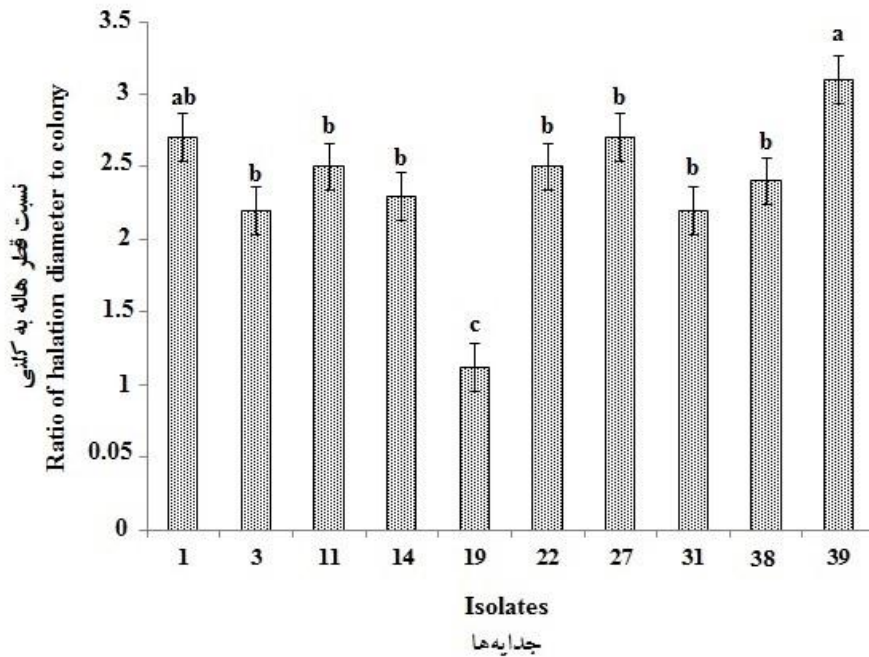
#### اندازه‌گیری توان تولید اکسین

تجزیه واریانس منابع تغییرات مربوط به میزان اکسین به صورت اسپلیت در زمان، نشان از تأثیر زمان بر این ویژگی با اطمینان ۹۹ درصد می‌باشد (جدول ۲). توان تولید اکسین در جدایه‌های برتر در بازه زمانی ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت (شکل ۲)، نشان داد که بین سویه‌های انتخاب شده در تولید اکسین اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ) و بیشترین مقدار مربوط به جدایه شماره ۳۹ به میزان ۵۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت و کمترین آن مربوط به جدایه شماره ۲۷ به میزان ۵/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر در زمان ۹۶ ساعت بود. با افزایش زمان گرماگذاری تولید اکسین کاهش یافت. با توجه به این که بیشترین میزان تولید اکسین در زمان ۷۲ ساعت بود، به نظر می‌رسد که پس از گذشت ۷۲ ساعت این جدایه‌ها به فاز ایستایی رسیده باشند و حداکثر میزان سنتز اکسین نیز در این زمان به دست آمده است.

ژانگ و کنگ (۳۰) در مطالعه خود نشان دادند که در بین کانی‌های سیلیکاتی بیوتیت، مسکویت، و سنگ شیل گلاکونیت‌دار اندازه آزادسازی پتاسیم به ترتیب ۳۱/۴۵، ۲۸/۲۴ و ۲۳/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر بود که بیشترین اندازه آزادسازی از کانی بیوتیت بود و دلیل این امر را می‌توان به ترکیب شیمیایی این کانی نسبت داد. میانگین اندازه آزادسازی پتاسیم در جدایه‌های برتر در دو محیط مسکویت و سنگ شیل گلاکونیت‌دار، نشان داد که میزان پتاسیم آزاد شده در کانی مسکویت (به دلیل تفاوت در ترکیب شیمیایی، و اندازه ذرات) بالاتر از سنگ شیل گلاکونیت‌دار می‌باشد؛ بنابراین نتایج مطالعات فوق با این مطالعه مطابقت دارند و مشخص گردید که میزان آزادسازی پتاسیم در کانی‌های مسکویت و سنگ شیل گلاکونیت‌دار با افزایش زمان گرماگذاری افزایش پیدا می‌کند.

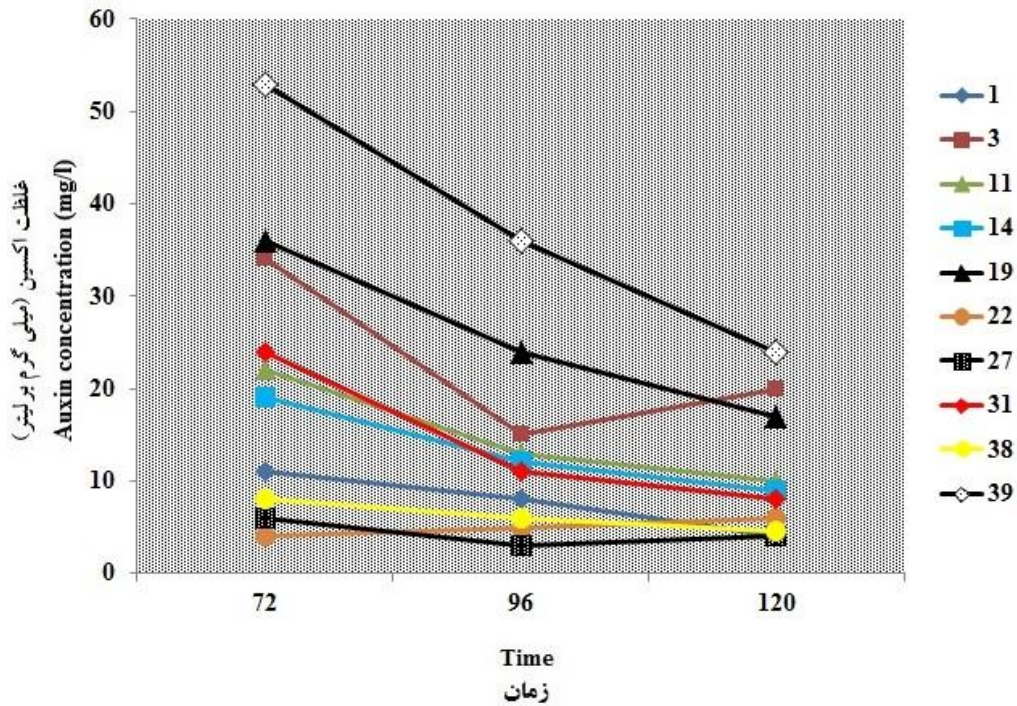
#### اندازه‌گیری سیدروفور

میزان سیدروفور تولید شده توسط جدایه‌های برتر (شکل ۱) نشان داد که کمترین نسبت قطر هاله به کلنی، ۱/۱۲ مربوط به جدایه شماره ۱۹ و بیشترین به میزان ۳/۱ مربوط به جدایه شماره ۳۹ بود. نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که میزان تولید سیدروفور در ۱۰ جدایه مورد آزمایش در سطح ۰/۰۵ درصد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). آرکانا و همکاران (۳) نیز توان تولید سیدروفور را در باکتری‌های آزادکننده پتاسیم بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که گسترش هاله در ۱۵



شکل (۱) توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مورد بررسی (ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی داری با همدیگر ندارند)

Figure (1) Siderophore production ability of considering isolates (The columns with the same letters are not significantly different ( $p < 0.05$ ))



شکل (۲) توان تولید اکسین در بازه زمانی مختلف توسط جدایه‌های مورد بررسی

Figure (2) Auxin production capacity during different periods in the studied isolates

فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات مورد آزمایش قرار گرفته است و مهم‌ترین باکتری‌هایی که این توانایی را دارند شامل: سودوموناس، باسیلوس، ریزوبیوم، ازتوباکتر و آرتروباکتر گزارش شده است (۲۶). آغاز نشتیفانی و همکاران (۵) حلالیت فسفات معدنی توسط ۱۷ جدایه بومی سودوموناس در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بررسی کردند و نتایج ایشان نشان داد که بین گونه‌های سودوموناس از لحاظ آزادسازی فسفات نامحلول تفاوت وجود دارد. بیشترین میزان انحلال فسفر در زمان ۷۲ ساعت به مقدار ۴۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین میزان انحلال ۲۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هو و همکاران (۱۴) نشان دادند که باسیلوس‌ها با تولید اسیدهای آلی و منابع کلاته‌کننده در تولید فسفر محلول خاک مؤثر هستند. ماریا و همکاران (۱۶) توان تولید فسفر محلول را به‌طور هم‌زمان در باکتری‌های آزادکننده پتاسیم و فسفر بررسی کردند که نتایج آن‌ها نیز نشان داد که سویه‌های انتخاب شده به دلیل ترشح اسیدهای آلی و کاهش دادن pH خاک توان بالایی برای آزادسازی فسفر دارند.

#### شناسایی مولکولی جدایه برگزیده

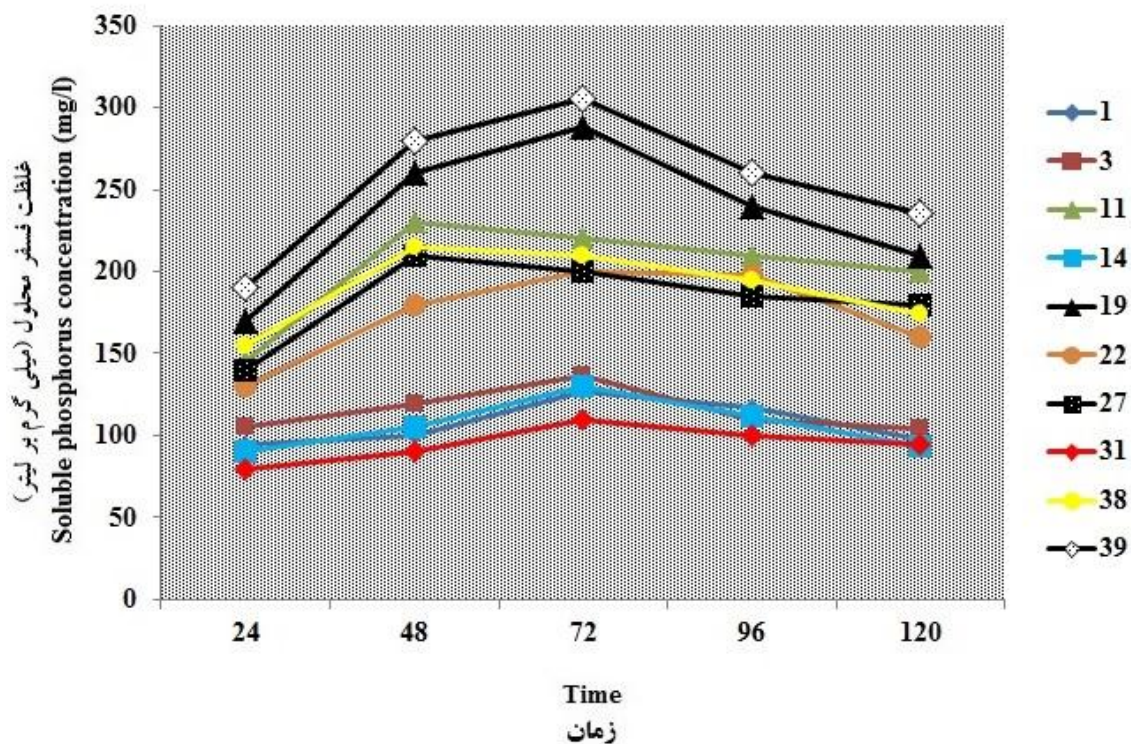
نتایج حاصل از توالی‌خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه مذکور با ۱۳۳۹ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه *Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 (T)* به شماره دسترسی CP002379 قرابت فیلوژنی دارد.

روییو و همکاران (۲۷) در تحقیقی میزان تولید اکسین را در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر، سودوموناس و انتروباکتر بررسی نموده و حداکثر مقدار تولید اکسین را در جدایه‌های ازتوباکتر کروکوکوم و در فاز ایستایی رشد گزارش نمودند.

رسولی صدقیانی و همکاران (۲۵) نشان دادند که بعضی از جدایه‌های سودوموناس از توانایی بالایی در تولید اکسین به مقدار ۶۷ میلی‌گرم بر لیتر برخوردارند. نتایج عرب‌عامری و همکاران (۲) در مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات و بررسی برخی از فاکتورهای تحریک‌کنندگی رشدی نشان داد که سودوموناس‌ها، باسیلوس‌ها در زمان ۷۲ ساعت به مقدار ۳۷ میلی‌گرم بر لیتر تولید اکسین دارند.

#### اندازه‌گیری فسفر آزاد شده از تری‌کلسیم‌فسفات

اثر زمان بر میزان آزادسازی فسفر براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس منابع تغییرات به‌صورت اسپلیت در زمان، با اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). میزان حلالیت فسفر در جدایه‌های مورد بررسی در بازه زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت (شکل ۳)، نشان داد اندازه فسفر محلول بین جدایه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ )، بیشترین اندازه فسفر در ۷۲ ساعت مربوط به جدایه شماره ۳۹ به میزان ۳۲۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در ۲۴ ساعت مربوط به جدایه شماره ۳۱ به میزان ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. توانایی باکتری‌های مختلف در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول مانند تری‌کلسیم‌فسفات، دی‌کلسیم



شکل (۳) توان تولید فسفر محلول در بازه زمانی مختلف در جدایه‌های مورد بررسی

Figure (3) Phosphorus production capacity during different periods in the studied isolates

در استان گلستان بسیار بالاست، لازم است منابع این کانی به‌طور دقیق مشخص گردد و در جهت افزایش تولید به‌عنوان کود پتاسیمی براساس برآورد مقدار نیاز پتاسیم محصولات مختلف و پتانسیل خاک استفاده شود. با توجه به اینکه این تحقیق به صورت آزمایشگاهی و در محیط کنترل شده صورت گرفت و از آنجایی که هدف انجام این تحقیق شناسایی جدایه برتر و انتقال آن به محیط کشت مزرعه بود، سعی بر آن است در تحقیقات بعدی توانایی جدایه برتر در آزادسازی پتاسیم در شرایط مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات با کاهش pH ریزوسفر، ترشح آنیون‌های آلی و تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی مایه آزادسازی پتاسیم ساختمانی از سنگ شیل گلاکونیت‌دار می‌شوند. پتانسیل آزادسازی پتاسیم بین جدایه‌های باکتری متفاوت بود؛ این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که علاوه بر تأثیر این جدایه‌ها بر آزادسازی پتاسیم، از طریق توانمندی تولید سیدروفور، اکسین و حل کردن فسفر معدنی در رشد گیاه مؤثر هستند. بیشترین مقدار شاخص‌های محرک رشدی مربوط به جدایه شماره ۳۹ می‌باشد که به گونه آرتروباکتر فنانترنیوورانس تعلق دارد. در مجموع به‌نظر می‌رسد با توجه به این که میزان ذخایر سنگ شیل گلاکونیت‌دار

## منابع

1. Alexander, D. B., and Zumber, D. A. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. *Journal of International Society of Soil Science*, 16: 118-124.
2. Aqaz Nashtifani, P., Olamaee, M., Ghorbani Nasr Abadi, R., and Barani Motlagh, M. 2014. Isolation and identification of *Pseudomonas fluorescens* from rhizosphere of tomato and evaluation of bacteria on growth of tomato. MSc Thesis, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resource. (in Persian).
3. Arabameri, E., Olamaee, M., Ghorbani Nasr Abadi, R., and Movahedi Naeini, S. A. 2015. Isolation and identification of silicate solubilizing bacteria and investigation of some of their growth promoting factors. 14<sup>th</sup> Soil Congress of Iran- Biology and Biotechnology of Soil. (in Persian).
4. 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.
5. Archana, D. S., Nandish, M. S., Savalagi, V. P., and Alagawadi, A. R. 2012. Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. *Bioinfolet - A Quarterly Journal of Life Sciences*, 9(4): 627-630.
6. Badr, M. A., Shafei, A. M., and Sharaf, SH. 2006. The dissolution of K and phosphorus bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. *Research Journal of Biological Sciences*, 2(1): 5-11.
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(3): 80-85.
8. Deshwal, V. K., and Kumar, P. 2013. Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas*. *Journal of Academia and Industrial Research*, 4: 2278-5213.
9. Dorj Dar, J., Yazdansetad, S., Arzanesh, M. H., and Ajoodanifar, H. 2014. Screening of indigenous potassium-solubilizing bacterial strains and evaluation of their ability in solubilisation of absorbable potassium. *Journal of microbial world*, 7: 252-264. (in Persian with English abstract).
10. Eliya, M., Nisa Rachmania, M., and Aris, T. 2015. Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing bacteria from the area around the Limestone Mining In Cirebon Quarry. *Research Journal of Microbiology*, 10: 270-279.
11. Fang, S. X., and Yan, L. H. 2006. Solubilization of potassium bearing minerals by wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1): 66-72.

12. Franzosi, C., Castro, L. N., and Celeda, A. M. 2014. Technical evaluation of glauconies as alternative potassium fertilizer from the Salamanca Formation, patagonia, Southwest Argentina. *Natural Resources Research*, 23(3): 311-320.
13. 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(3): 130-136.
14. Hu, X., Chen, J., and Guo, J. 2006. Two phosphate and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbial Biotechnology*, 22: 983-990.
15. Liu, D., Lian, B., and Dong, H. 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal*, 29(5): 413-421.
16. 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. *International Journal of Plant Research*, 27(1): 181-187.
17. Nguyen., T. D., and Cao, N. D. 2014. Isolation, characterization and identification of phosphate and potassium- solubilizing bacteria from weathered materials of granite rock mountain, That Son, in Giang province, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 5(2): 282-291.
18. Norkina, S. P., and Pumpyansakya, L. V. 1956. Certain properties of silicate bacteria dokl. *Japanese Journal of Crop Science*, 28(1): 35-40.
19. Osman, A. G. 2009. Study of some characteristics of silicate bacteria. *Journal of Science and Technology*, 10 (3): 27-35.
20. Parmar, P., and Sindhu, S. S. 2013. Potassium Solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1): 25-31.
21. Pessoa, R. S., Silva, C. A., Moretti, B. S., Neto, A. E. F., Inda, A. V., and Curi, N. 2015. Solubilization of potassium from alternative rocks by humic and citric acids and coffee husk. *Ciência e Agrotecnologia Journal*, 39(6): 553-564.
22. Prajapati, K. B., and Modi, H. A. 2012. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria from ceramic industry soil. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1 (2-3): 8-14.
23. Rahimzadeh, N., Khormali, F., Olamaee, M., and Amini, A. 2014. Changes of mineralogy of glauconite affected by inoculation of silicate solubilizing bacteria from rhizosphere of Canola. *Journal of Soil Biology*, 2: 32-41. (in Persian with English abstract).

24. Rahimzadeh, N., Khormali, F., Olamaee, M., and Dordipour, E. 2012. Releasing of potassium from Muscovite through silicate solubilizing bacteria in vitro conditions. National Conference of Soil, Sustainable Agriculture. (in Persian with English abstract).
25. Rasouli Sadighani, H. 2005. Study of the role of phytosydophores and Psudomonases producing sidrophores in supplying Fe and Zn nedded by wheat cultivars. Ph.D thesis of Soil science, Tarbiat Moddares University. (in Persian with English abstract).
26. Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91: 552-555.
27. Rubio, M. G. T., Plata, S. A., Castillo, J. B., and Nieto, P. M. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indole-3-Acetic Acid and siderophores from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamrica De Microbioloia*, 5: 171-176.
28. Skiba, M., Maj-Szeliga, K., Szymański, W., and Błachowski, A. 2014. Weathering of glauconite in soils of temperate climate as exemplified by a Luvisol profile from Góra Puławska, Poland. *Geoderma*, 14: 212-226.
29. Wang, R. R., Wang, Q., Lin, Y. H. Gang, Q., and Sheng, X. F. 2015. Isolation and the interaction between a mineral-weathering *Rhizobium tropici* Q34 and silicate minerals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 747-753.
30. 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.