

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های سیلیکاتی از ریزوسفر توتون (*Nicotiana tabacum* L.) و بررسی کارایی آن‌ها در فراهمی پتاسیم خاک

رحمت اله رنجبر^{۱*} - ابراهیم سپهر^۲ - عباس صمدی^۳ - میرحسن رسولی صدقیانی^۴ - محسن برین^۵ - بهنام دولتی^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۱

چکیده

برخی از ریزجانداران خاک توانایی انحلال کانی‌های حاوی پتاسیم و آزادسازی پتاسیم آن را دارند. این مطالعه به منظور جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (KSBs) از خاک ریزوسفر توتون و بررسی تأثیر آنها بر آزادسازی پتاسیم از خاک انجام شد. نمونه‌های خاک از ریزوسفر توتون رقم بارلی ۲۱ در مرحله گلدهی بوته برداشت شد. با استفاده از محیط‌کشت جامد الکساندروف، ۹ جدایه KSB جداسازی و خالص‌سازی شدند. سپس ارزیابی‌های کیفی (شاخص حلالیت) و کمی (آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار) به ترتیب در محیط‌کشت جامد و مایع الکساندروف و بررسی تأثیر جدایه‌های KSBs بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در قالب ۳ طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت. بیشترین شاخص حلالیت در اثر فعالیت جدایه‌های باکتری KSB22، KSB42 و KSB10 در محیط‌کشت جامد الکساندروف به ترتیب ۲/۸، ۲/۷ و ۲/۵ به دست آمد و بیشترین میزان پتاسیم محیط‌کشت مایع الکساندروف با مقدار ۹/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تلقیح جدایه‌های باکتری KSB42 و KSB10 بود که میزان آن نسبت به شاهد (محیط‌کشت بدون تلقیح)، سه برابر افزایش یافت. جدایه‌های KSB42 و KSB10 در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار و خاک کاراتر بودند به طوری که میزان پتاسیم قابل استفاده خاک در تلقیح با این جدایه‌ها در مقایسه با شاهد، حدود ۲۹ درصد افزایش یافت. این تحقیق نشان داد که از برخی باکتری‌های ریزوسفر توتون می‌توان در متحرک نمودن منابع نامحلول پتاسیم خاک استفاده کرده و بخشی از نیاز گیاه توتون را که یک گیاه پرنیاز نسبت به پتاسیم است، تأمین نمود.

واژه‌های کلیدی: شاخص حلالیت، کانی پتاسیم‌دار، محیط کشت

مقدمه

یک موضوع مهم در افزایش عملکرد گیاهان پرنیاز پتاسیم است. بسیاری از ریزجانداران خاک با ترشح اسیدهای آلی و پلی‌ساکاریدها سبب انحلال مستقیم کانی‌های پتاسیم‌دار از جمله میکاها، ایلایت و ارتوکلاز می‌شوند و یا با کلاته نمودن یون‌های سیلیکون، سبب آزاد شدن پتاسیم خاک می‌شوند (۱۳ و ۸). در نتیجه، فراهمی آن را برای جذب گیاهان بهبود می‌بخشند (۲۵ و ۱۷). برخی باکتری‌های ساپروفیتی از جمله *Pseudomonas* sp. و جدایه‌های قارچ از جمله *Aspergillus* spp. و *Aspergillus terreus* توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های خاک را دارند (۱۲ و ۱۶). این موجودات میکروبی علاوه بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌ها و تأثیر بر رشد گیاه، مزایای اقتصادی و زیست‌محیطی نیز دارند (۱۶). باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار، علاوه بر آزادسازی پتاسیم، اسیدآمینها، ویتامین‌ها و برخی مواد محرک رشد گیاه مانند ایندول استیک اسید و جیبرلین‌ها را تولید می‌کنند (۴ و ۱۸). تحقیقات زیادی در مورد نقش ریزجانداران در انحلال کانی‌ها و آزادسازی پتاسیم از آنها انجام شده است به طوری که در سال‌های

فراهمی مداوم پتاسیم برای گیاه به دلیل نقش آن در انواع واکنش‌های بیولوژیکی گیاه، اهمیت زیادی دارد (۳). خاک غنی از پتاسیم است اما تنها یک تا دو درصد آن برای گیاهان قابل جذب است (۱۴) و بقیه به شکل غیرقابل استفاده گیاه در ساختمان کانی‌های خاک واقع است. بنابراین به نظر می‌رسد تبدیل شکل غیرتبدالی و ساختمانی پتاسیم خاک به شکل قابل دسترس آن اقتصادی باشد تا گیاه بتواند از منبع بومی پتاسیم استفاده کند (۱۶). ریزجانداران خاک نقش اصلی را در چرخه عناصر فسفر و پتاسیم دارند و توانایی برخی از آنها در حل نمودن کانی‌های سیلیکاتی پتاسیم‌دار و آزادسازی پتاسیم

۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶- به ترتیب دانشجوی دکتری مهندسی علوم خاک، دانشیار، استادان و استادیاران گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*) نویسنده مسئول: Email: ranjbarrahim14@gmail.com
DOI: 10.22067/jsw.v0i0.78382

گیاه و حفظ پتاسیم خاک در سطح بالا مصرف می‌شود (۲۸ و ۳۲). در حالی که، هزینه کودهای شیمیایی و خطرات زیست‌محیطی آنها بالاتر بوده و راندمان مصرف آنها پایین می‌باشد. از طرفی، برگ توتون به عنوان محصول اقتصادی توتون بوده و مصرف بیش از حد آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی سبب کاهش کیفیت و پتانسیل صادرات آن می‌شود که ضرورت استفاده از راه‌های جایگزین از جمله استفاده از ریزجانداران حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار را ایجاب می‌کند. با توجه به این که اطلاعات کمی در مورد ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم در ریزوسفر توتون و سودمندی آن در افزایش قابلیت استفاده پتاسیم در خاک‌های زیرکشت توتون وجود دارد. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف جداسازی ریزجانداران از ریزوسفر توتون و بررسی توانایی آن‌ها در حل نمودن کانی‌های سیلیکاتی پتاسیم‌دار و افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک ریزوسفر

تعداد ۲۵ نمونه خاک از مزارع کشت توتون منطقه شمال غرب ایران واقع در محدوده جغرافیایی ۳۵/۵ درجه تا ۳۹ درجه عرض شمالی و ۴۵ درجه تا ۴۶ درجه طول شرقی تهیه شد. نمونه‌های خاک به گلدان‌های ۲۰ لیتری منتقل و سپس، بذور توتون هواخشک (واریته بارلی ۲۱) در هر گلدان کشت شد. در مرحله گلدهی گیاه توتون، نمونه‌های خاک از عمق ۶ تا ۲۵ میلی‌متری اطراف بوته با استفاده از اوگر تهیه شد. نمونه‌های خاک هر گلدان به مقدار لازم جهت جداسازی ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان اتمام جداسازی باکتری‌ها، در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

تهیه و آماده‌سازی کانی‌های میکایی

کانی‌های خالص میکای ایلات و فلدسپار از گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه و آسیاب شدند که ترکیب عنصری کانی‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. پودر کانی‌ها از الک ۶۰ میکرومتر (۲۳۰ مش) عبور داده شدند. مقدار پتاسیم قابل جذب موجود در پودر کانی‌ها با استفاده از عصاره‌گیر یک مولار کلریدکلسیم و اسیدکلریدریک ۰/۰۱ مولار استخراج شد (۲).

برای اطمینان از خروج کامل پتاسیم قابل استفاده، پتاسیم با استات آمونیوم یک مولار مولار استخراج و اندازه‌گیری شد و اسیدشویی تا حصول اطمینان از خروج پتاسیم قابل استفاده ادامه یافت. سپس کانی‌ها با آب کاملاً شستشو و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شدند و دو گرم از آن به هر لیتر محیط کشت جامد و مایع الکساندروف اضافه شد (۲).

اخیر، باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (KSB^۱) در تولید کودهای بیولوژیک به کار می‌روند. در تحقیقی، ژانگ و کانگ، چهار جدایه JM3، GL7، XF4 و XF11 به عنوان باکتری حل‌کننده پتاسیم جداسازی شدند که ماده خشک و جذب پتاسیم نشاء توتون در تلقیح آن با تمام جدایه‌ها بخصوص جدایه XF11 به طور معنی‌دار افزایش یافت (۳۴). در سال ۲۰۱۴، ساباشینی (۲۹) نشان داد که جدایه باکتری *Frateuria aurantia* قادر به افزایش کارایی جذب پتاسیم توسط گیاه توتون بوده و مقدار پتاسیم برگ توتون را حدود ۳۹ درصد افزایش داد. در مطالعه‌ای، تلقیح باکتریایی خاک سبب آزادسازی پتاسیم از کانی‌های سیلیکاتی و بهبود رشد گیاه ذرت شد (۱۹). اشرفی سعیدلو و رسولی صدقیانی نشان دادند که پتاسیم محلول خاک با تلقیح جدایه KSB1 باکتری (*Bacillus sp.*) و جدایه KSF3 قارچ (*Aspergillus niger*) حل‌کننده سیلیکات به ترتیب ۹۲/۳ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت و قارچ بیش‌ترین نقش را در کاهش pH داشت (۲). ساریخانی و همکاران (۲۲ و ۲۳) نشان دادند که جدایه باکتری S14-3 متعلق به جنس سودوموناس بیشترین تأثیر را در آزادسازی پتاسیم ($3/23 \text{ mg g}^{-1}$) از محیط کشت داشت. برخی از ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم (از جمله *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*) نقش مثبتی در رشد انواع گیاهان دارند (۳۳). در تحقیقی از بین پنج ریزجاندار حل‌کننده پتاسیم، دو جدایه قارچ *Aspergillus tubingensis* و *Fomitopsis meliae* RCKF7 بیشترین توانایی را در انحلال فلدسپار و آزادسازی پتاسیم داشتند (۱۰). همچنین اخیراً، تلقیح قارچی خاک تأثیر قابل توجهی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های سیلیکاتی و بهبود رشد گیاه ذرت داشته است (۲۱). بنابراین، حل کردن زیستی^۲ عناصر معدنی خاک بخش مهمی از راه‌کارهای مدیریت تلفیقی عناصر غذایی^۳ است (۱). مصرف کود پتاسیمی را می‌توان با تلقیح زیستی ریزجانداران حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار کاهش داد که علاوه بر کم‌هزینه بودن دوست‌دار اکوسیستم^۴ نیز است (۲۸).

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از محصولات مهم صنعتی و اقتصادی دنیا می‌باشد (۳۰). توتون بارلی به عنوان گیاه پرنیاز پتاسیم، این عنصر را بیش از سایر عناصر غذایی جذب می‌کند (۲۰). کیفیت و به‌سوزی برگ توتون در صنعت دخانیات مهمترین فاکتور کیفی است که وجود ۲/۵ تا ۴ درصد پتاسیم در وزن خشک برگ توتون در بهبود آنها نقش مهمی دارد به طوری که در کشورهای تولیدکننده عمده توتون، مقدار زیادی کود پتاسیمی در مزارع توتون با هدف تأمین نیاز

1- Potassium solubilizing bacteria (KSB)

2- Biodissolution

3- Integrated nutrient management, INM

4- Eco-friendly

جدول ۱- درصد اکسید عناصر اصلی تشکیل دهنده کانی‌های مورد مطالعه به روش XRF
Table 1- The percentage of chemical element oxides in studied clay minerals by XRF

نوع کانی Mineral name	SiO ₂	Al ₂ O ₃	K ₂ O	Na ₂ O	Fe ₂ O ₃	MgO	CaO	MnO	P ₂ O ₅	TiO ₂	LOI*	Total
Feldspar	64.50	17.44	13.67	2.76	0.35	0.01	0.11	0.01	-	0.01	0.42	99.28
Illite	47.32	34.24	10.74	0.62	1.82	0.08	0.09	0.11	0.03	0.06	4.44	99.26

*: کاهش وزن در دمای بالا (Loss on ignition)

محیط کشت نوترینت براث به داخل هر کدام از نه ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری (برابر با تعداد جدایه‌های خالص‌سازی شده) ریخته و استریل شد. محیط کشت داخل ارلن‌ها با هر کدام از جدایه‌های خالص‌سازی شده باکتریایی تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر دورانی تکان داده شدند. سپس برای غربالگری جدایه‌های برتر باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات، از محیط کشت الکساندروف جامد (ارزیابی کیفی) و مایع (ارزیابی کمی) استفاده گردید (۹).

در ارزیابی کیفی، توانایی ۹ جدایه باکتری جداسازی شده روی محیط کشت الکساندروف جامد به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت. ۹ جدایه باکتری در محیط کشت استریل الکساندروف در سه تکرار به صورت نقطه‌ای و مجزا کشت شدند و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز انکوباسیون شدند و طی این مدت و پایان دوره انکوباسیون، قطر کلونی و قطر هاله شفاف پیرامون آن اندازه‌گیری گردید. شاخص حلالیت^۲ برای جدایه‌ها با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید (۷).

$$\text{Solubility} - \text{index} = \frac{\text{Corona.diameter}}{\text{Colony.diameter}} \quad (1)$$

قطر کلونی و هاله شفاف بر حسب میلی‌متر می‌باشد. در ارزیابی کیفی، هشت جدایه باکتری از بین نه جدایه که توانایی انحلال بالایی در محیط جامد نشان داده بودند برای ارزیابی کمی انتخاب شدند و جدایه باکتری KSB70 به دلیل داشتن کمترین شاخص حلالیت (۱/۳)، مورد ارزیابی کمی قرار نگرفت. در ارزیابی کمی باکتری‌ها، یک میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت براث حاوی جدایه باکتری (کشت شبانه) به داخل ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع الکساندروف حاوی کانی‌های پتاسیم‌دار (دو گرم بر لیتر مخلوط کانی‌های رسی میکا و فلدسپار) در سه تکرار و به طور مجزا کشت شدند و هم‌زمان یک نمونه شاهد نیز در نظر گرفته شد و در آن یک میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث استریل استفاده شد. نمونه‌ها در ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر دورانی به مدت ۱۰ روز و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شدند. پس از پایان مدت ۱۰ روز، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از ریزوسفر

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از نمونه‌های خاک پس از تهیه سری‌های رقت در محیط کشت اختصاصی جامد الکساندروف صورت گرفت (۹) که هر لیتر آن حاوی پنج گرم گلوکز، دو گرم کربنات کلسیم، ۱۰ گرم آگار، ۰/۱ گرم کلرید آهن، دو گرم مخلوط رس‌های میکا و فلدسپار، ۰/۰۰۵ گرم سولفات منیزیم هفت آبه، دو گرم تری‌کلسیم فسفات و آب مقطر در هر لیتر محیط کشت بود. از نمونه خاک‌ها با روش رقت‌سازی متوالی^۱ سوسپانسیون تهیه شد. سوسپانسیون ۱:۱۰ خاک به آب داخل ارلن تهیه شد و داخل یک انکوباتور دارای شیکر دورانی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شدند. با انجام رقت‌سازی در لوله‌های آزمایش، سوسپانسیون‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ خاک به آب نیز تهیه شد. پس از رسوب ذرات ریز خاک در سوسپانسیون‌ها، پنج میکرولیتر از سوسپانسیون به محیط کشت جامد الکساندروف اضافه شد و به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شد. هاله شفاف اطراف کلونی باکتری‌ها روی محیط کشت جامد الکساندروف نشان‌دهنده توانایی باکتری در حل نمودن کانی‌های پتاسیمی موجود در محیط کشت است. کلونی‌های دارای هاله شفاف، جداسازی شده و برای خالص‌سازی، چند بار روی نوترینت آگار بصورت خطی کشت داده و بعد از بدست آوردن جدایه خالص، جدایه مذکور مجدد روی محیط کشت الکساندروف جامد به صورت نقطه‌ای و خطی باز کشت شدند و از طریق خالص‌سازی، نه جدایه باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار بدست آمد و در اسلنت کشت و پس از انکوباسیون، این کلونی‌ها جهت بررسی برخی ویژگی‌ها و ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌ها، در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌های باکتری

به‌منظور بررسی کیفی و کمی جدایه‌ها، ۲۵ میلی‌لیتر از

حاوی 10^8 سلول در یک میلی لیتر مایه تلقیح در جذب نور با طول موج ۶۰۰ نانومتر) به طور مجزا تهیه گردید. مقدار آب مورد نیاز برای تامین ۷۵ درصد رطوبت زراعی نمونه ۳۰ گرمی خاک محاسبه شده و یک میلی لیتر از مایه تلقیح جدایه باکتری به آب اضافه گردید و همراه با آب به نمونه خاک استریل اضافه شد و در شاهد نیز این کار با مصرف یک میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات انجام شد. نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۵ درصد ظرفیت زراعی خاک و به مدت ۹۰ روز انکوباسیون شدند. پس از ۹۰ روز انکوباسیون، مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک با استات آمونیوم یک مولار در $pH=7$ (۱۴) عصاره‌گیری و اندازه‌گیری شد (۲).

آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌های حاوی پتاسیم و شاخص حلالیت در محیط کشت مایع و جامد الکساندروف و مقدار پتاسیم آزاد شده از خاک در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۹ تیمار، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام یافت و برای مقایسه میانگین‌ها از تست مقایسه میانگین Student-Newman-Keuls (SNK) در نرم افزار SPSS 16.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی و ارزیابی کمی و کیفی جدایه‌های باکتری حل‌کننده پتاسیم

با تهیه رقت‌های مختلف سوسپانسیون از ۱۲ نمونه خاک ریزوسفر توتون با روش رقت‌سازی متوالی، تلقیح سوسپانسیون‌ها روی محیط کشت جامد الکساندروف، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها در محیط نوترینت آگار و با بازکشت نقطه‌ای بر محیط کشت الکساندروف، نه جدایه باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (ایلایت و فلدسپار) شامل KSB70، KSB20، KSB22، KSB30، KSB40، KSB42، KSB90، KSB92 و KSB10 جداسازی و خالص‌سازی شدند.

مشخصات جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار

جدایه‌های باکتری از نظر مورفولوژی و واکنش گرم مورد بررسی قرار گرفتند که در جدول ۲ نشان داده شده است. بسیاری از جدایه‌های باکتری گرم مثبت بوده و کلونی سفید رنگ داشتند.

برداشته شد و پس از سانتریفیوژ و صاف کردن، میزان پتاسیم آزاد شده در محیط کشت مایع با استفاده از دستگاه فلیم‌فتمتر اندازه‌گیری شد (۳۱). جدایه‌های با شاخص انحلال بالا و توانایی بالا در آزادسازی پتاسیم محیط کشت به عنوان جدایه‌های کارا انتخاب شدند (۹).

ارزیابی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

تست هیدرولیز نشاسته: برای این کار محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب تهیه و استریل شد. جدایه‌های باکتری روی محیط کشت داخل پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محلول لوگول جهت نمایان نمودن نشاسته در محیط کشت داخل پلیت‌ها، اضافه گردید که وجود هاله زرد در زمینه آبی نشان دهنده فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز باکتری است (۲۴ و ۱۱).

تست قندها (گلوکز و ساکارز): دو محیط کشت مجزا از مایع پپتون تهیه شد که یکی حاوی ۱٪ گلوکز و دیگری حاوی ۱٪ ساکارز بود. محیط کشت پپتون داخل لوله‌های آزمایش پس از استریل با جدایه باکتری معین تلقیح گردید و پس سه روز انکوباسیون، در صورت مصرف قند مورد نظر توسط باکتری، محیط کشت اسیدی شده و در نتیجه به رنگ زرد نمایان می‌شود (۲۴ و ۱۱).

تست فلورسنتی: محیط کشت King B استریل شده داخل پلیت‌ها با جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت، خاصیت فلورسنتی باکتری‌ها در زیر نور فرابنفش با مشاهده نور رنگ سبز-آبی مشخص گردید (۲۴ و ۱۱).

تست رنگ‌آمیزی: گسترده مناسبی از باکتری روی لام ایجاد و تثبیت گردید. لام دارای باکتری ابتدا با محلول کریستال ویوله و سپس با محلول ید به مدت یک دقیقه پوشانده شد. گسترده باکتری روی لام به آرامی با الکل شستشو داده شد و سپس با سافرانین به مدت ۴۵ ثانیه پوشانده شده و پس از هر مرحله با آب شستشو گردید. لام‌ها بعد از هواخشک شدن، برای بررسی میکروسکوپی آماده شد (۶ و ۱۱).

آزمایش انکوباسیون برای ارزیابی توانایی جدایه‌های

باکتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک

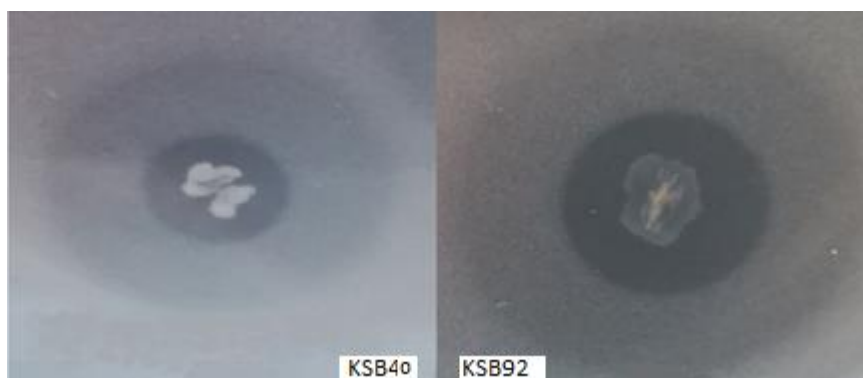
برای ارزیابی توانایی و کارایی جدایه‌های کارآمد باکتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک، هشت جدایه باکتری همراه با شاهد (بدون تلقیح KSB) مورد مقایسه قرار گرفتند. برای این منظور، یک نمونه خاک رسی (رس ۳۹ درصد) با مقدار پتاسیم قابل جذب ۱۵۸ میلی گرم بر کیلوگرم انتخاب شد. مایه تلقیح هر جدایه باکتری

جدول ۲- خصوصیات کشت جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار
Table 2- The cultural properties of potassium-bearing mineral dissolving bacteria isolates

جدایه KSB ^۱ KSB isolate	مورفولوژی کلونی Colony morphology	واکنش گرم Gram reaction	قطر کلونی Colony diameter (mm)	قطر هاله شفاف Clearance zone diameter (mm)
KSB20	سفید، حاشیه منظم، لزج (White, regular margin, slimy surface)	w	5.1	11.1
KSB22	سفید، حاشیه منظم، لزج (White, regular margin, slimy surface)	+	5.0	13.3
KSB30	کرمی، حاشیه منظم، لزج (Creamish, regular margin, slimy surface)	+	5.3	9.9
KSB40	کرمی سفید، حاشیه نامنظم (Creamish white, irregular margin)	+	5.4	9.9
KSB42	سفید، حاشیه منظم، لزج (White, regular margin, slimy surface)	+	3.7	10.2
KSB90	سفید، حاشیه نامنظم، لزج (White, irregular margin, slimy surface)	+	4.3	9.7
KSB92	کرمی، حاشیه منظم (Creamish, regular margin)	+	6.2	12.3
KSB10	روشن، حاشیه منظم (Bright, regular margin)	-	4.3	10.7

۱-KSB: باکتری حل‌کننده پتاسیم

1- KSB: potassium solubilizing bacterium



شکل ۱- جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار همراه با ناحیه شفاف اطراف آن در محیط کشت الکساندروف جامد

Figure 1- Potassium-bearing mineral dissolving isolates with well-demarcated clearing zones in Aleksanderov agar media

جدایه‌های باکتری به غیر از KSB22 و KSB4 و KSB2، توانایی ترشح آنزیم آلفا آمیلاز و هیدرولیز نشاسته را در محیط کشت نوترینت آگار (حاوی ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب) داشتند. جدایه‌های باکتری KSB2، KSB3، KSB42 و KSB10 به مقدار بیشتر توانایی هضم ساکارز و گلوکز و ایجاد رنگ زرد را در محیط کشت مایع پپتون داشتند. علاوه بر آن، جدایه باکتری KSB10 دارای خصوصیت فلورسنسی در محیط کشت King B بود (جدول ۳).

هاله شفاف طی ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون ظاهر شد. هاله شفاف اطراف کلونی جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیمی در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از ارزیابی کیفی، جدایه‌های باکتری به غیر از KSB70 مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند و برخی ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی آنها تعیین گردید.

خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

جدول ۳- برخی از خصوصیات بیوشیمیایی جدایه باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار
Table 3- Some of biochemical properties of potassium-bearing dissolving bacteria isolates

جدایه KSB KSB isolate	تست Test				
	تست گرم Gram Test	تست فلورسنتی Florescent Test	تست ساکارز Sucrose Test	تست گلوکز Glucose Test	تست هیدرولیز نشاسته Starch Hydrolysis Test
KSB20	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)
KSB22	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)
KSB30	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)
KSB40	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)
KSB42	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)
KSB90	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)
KSB92	مثبت (+, Positive)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)
KSB10	منفی (-, Negative)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)	مثبت (+, Positive)

۱- KSB: باکتری حل‌کننده پتاسیم

1- KSB: potassium solubilizing bacterium

KSB92 نیز کمتر از دو (به ترتیب ۱/۸، ۱/۸ و ۱/۹) بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی کمی ۸ جدایه باکتری مورد تحقیق نشان داد که جدایه‌های باکتری از لحاظ توانایی حل کردن کانی‌های پتاسیمی و مقدار آزادسازی پتاسیم از کانی‌های میکا و فلدسپار در محیط‌کشت مایع الکساندروف تفاوت معنی‌داری (P ≤ 0.01) با هم دارند (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین مقدار پتاسیم آزاد شده از کانی‌های پتاسیمی (میکا و فلدسپار) توسط جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار در شکل ۳ نشان داده شده است. همه ۸ جدایه باکتری مورد تحقیق توانایی حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار را داشتند و سبب افزایش معنی‌دار و حداقل ۲/۷ برابری غلظت پتاسیم در محیط‌کشت مایع الکساندروف نسبت به محیط‌کشت بدون تلقیح باکتریایی (شاهد) شدند.

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی کیفی ۹ جدایه باکتری مورد تحقیق، جدایه‌های باکتری از لحاظ توان حل کردن کانی‌های پتاسیمی و ایجاد هاله شفاف روی محیط‌کشت جامد الکساندروف (شاخص حلالیت) تفاوت معنی‌داری (P ≤ 0.01) با هم داشتند (جدول ۴).

نتایج مقایسه میانگین شاخص حلالیت حاصل از حل شدن کانی‌های پتاسیمی (میکا و فلدسپار) در محیط‌کشت جامد الکساندروف توسط جدایه‌های باکتری مورد تحقیق در شکل ۲ نشان داده شده است. شاخص حلالیت در اثر فعالیت جدایه باکتری‌های KSB22، KSB42 و KSB10 در محیط‌کشت الکساندروف جامد حداکثر (به ترتیب ۲/۸، ۲/۷ و ۲/۵) و در اثر فعالیت جدایه باکتری KSB70 حداقل (۱/۳) بود. مقدار شاخص حلالیت KSB30، KSB40 و

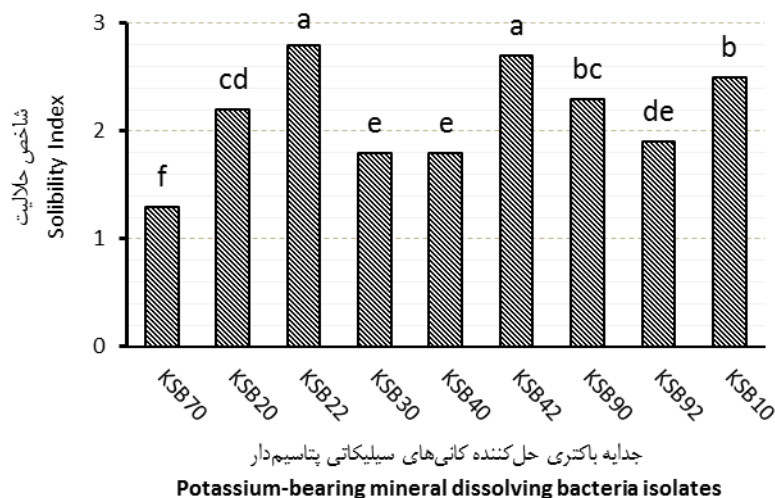
جدول ۴- تجزیه واریانس شاخص حلالیت، پتاسیم آزاد شده در محیط‌کشت و پتاسیم قابل‌استفاده خاک بعد از تلقیح باکتریایی

Table 4- Variance analysis of solubility index, released potassium in medium and soil available potassium after bacterial inoculation

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Mean of squares	
		پتاسیم قابل استفاده خاک ۹۰ روز بعد از تلقیح Soil available potassium after 90days of inoculation	پتاسیم آزاد شده به محیط‌کشت مایع Released K into liquid medium
تلقیح باکتری Bacteria inoculation	8	620.98**	12.356***
خطای آزمایشی Error	18	13.96	0.139

*** نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد است.

*** indicate significant differences at 0.1% probability level.



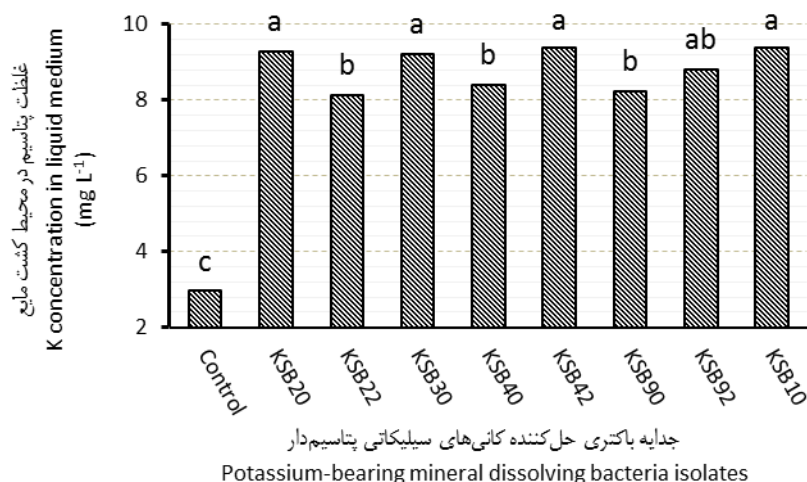
شکل ۲- تأثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر شاخص حلالیت در محیط‌کشت جامد الکساندروف
 Figure 2- Effect of potassium-bearing minerals dissolving isolates on the mean of solubility index on solid Aleksandrov medium

پتاسیم‌دار در افزایش غلظت پتاسیم محیط‌کشت، چهار جدایه باکتری KSB10 و KSB42، KSB22، KSB20 به عنوان جدایه‌های کارآمد باکتری در حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار انتخاب شدند. باکتری‌ها ممکن است مواد اسیدی و قلیایی باکتریایی و یا کلات تولید کنند که آزادسازی پتاسیم را از کانی‌های پتاسیم‌دار در خاک افزایش می‌دهند (۳۱).

آزادسازی پتاسیم در محیط‌کشت توسط جدایه‌های تلقیح شده باکتری دلیل لازم برای امکان استفاده از این باکتری‌ها در بهبود قابلیت دسترسی به پتاسیم است. در تحقیق سینگ و همکاران

به طوری که، غلظت پتاسیم در محیط‌کشت بدون تلقیح باکتریایی (شاهد) ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر بود در حالی که، غلظت آن در محیط‌کشت تلقیح شده با جدایه‌های باکتری KSB10 و KSB42 به ۹/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت (شکل ۳). ریزجانداران با ترشح اسیدهای آلی سبب رهاسازی پتاسیم و سایر عناصر غذایی از کانی‌ها می‌شوند که مقدار پتاسیم رها شده از کانی‌ها به pH، اکسیژن و نوع جدایه باکتری حل‌کننده کانی و نوع کانی پتاسیم‌دار بستگی دارد (۲۶).

پس از ارزیابی کمی جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های

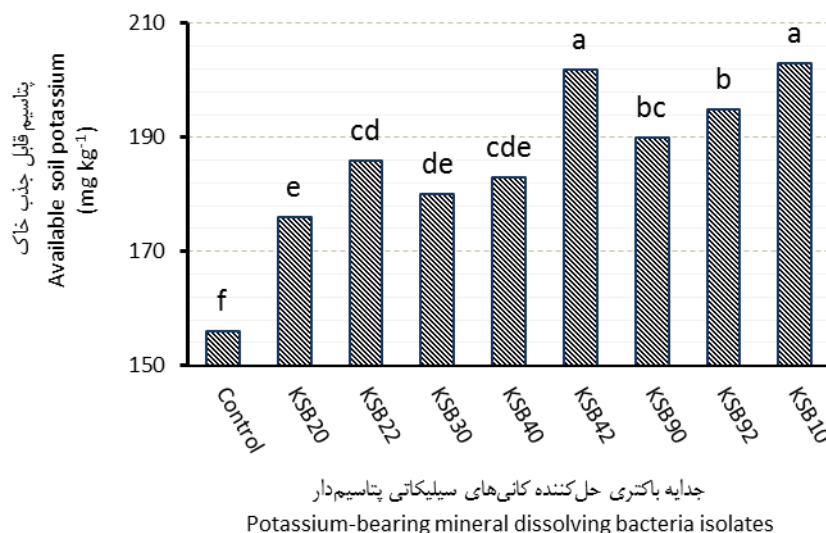


شکل ۳- تأثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر غلظت پتاسیم در محیط‌کشت مایع الکساندروف
 Figure 3- Effect of potassium-bearing minerals dissolving isolates on the mean of potassium concentration in liquid Aleksandrov medium

جدول ۵- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 5- The physico-chemical properties of studied soil

pH	کربنات کلسیم معادل CCE(%)	ظرفیت تبادل کاتیونی CEC (meq/100g)	کربن آلی Organic carbon(%)	پتاسیم K (mg/Kg)	%		
					شن Sand	سیلت Silt	رس Clay
6.79	0.25	19.2	0.52	158	23.4	37.4	39.2



شکل ۴- تأثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر میانگین پتاسیم قابل استفاده خاک
Figure 4- Effect of K-bearing minerals dissolving bacteria isolates on the mean of soil available potassium

قابل استفاده خاک

خصوصیات خاک مورد مطالعه در این بخش از آزمایش در جدول ۵ آمده است. طبق نتایج تجزیه واریانس، تأثیر باکتری‌های مورد مطالعه بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک معنی‌دار ($P < 0.01$) بود و جدایه‌های مورد مطالعه باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از لحاظ تأثیر بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک (۹۰ روز بعد از تلقیح باکتریایی خاک و انکوباسیون) تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۴). مقدار پتاسیم آزاد شده توسط باکتری‌های جدایه شده KSB30، KSB20، KSB42 و KSB10 به محیط‌کشت الکساندورف مایع حداکثر بود ولی جدایه‌های باکتری KSB20 و KSB30 علی‌رغم توانایی بالا در حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار در محیط‌کشت مایع، توانایی کمتری در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک داشته‌اند.

نتیجه‌گیری

در بین جدایه‌های باکتری خالص‌سازی شده از ریزوسفر توتون، حل نمودن کانی‌های پتاسیم‌دار و افزایش مقدار پتاسیم قابل استفاده

(۲۰۱۰)، تلقیح گیاهان ذرت و گندم با انواع ریزجاندارن حل‌کننده پتاسیم سبب تحرک زیاد پتاسیم در خاک شد (۲۷). لذا غربالگری این جدایه‌های مؤثر و بومی، امکان استفاده از این باکتری‌ها را در تلقیح زیستی توتون به تنهایی یا همراه با مقدار کمی کود پتاسیمی فراهم می‌کند.

تأثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده پتاسیم بر مقدار پتاسیم

نتایج بررسی توانایی باکتری‌های جدایه شده در افزایش مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک در شکل ۴ نشان داد که میزان پتاسیم قابل استفاده خاک در تلقیح با جدایه‌های KSB42 و KSB10 حداکثر (به ترتیب ۲۰۰ و ۲۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود که در مقایسه با شاهد (خاک بدون تلقیح KSB)، به ترتیب به مقدار ۴۴ و ۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک افزایش یافت. تأثیر جدایه باکتری KSB30 و KSB40 در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک کمتر (۲۰ تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد) بود.

نتیجه می‌توان از این جدایه‌ها (KSB10 و KSB42) به عنوان یک کود زیستی در راستای کاهش مصرف کودهای پتاسیمی و افزایش کیفیت توتون پس از آزمایشات مزرعه‌ای استفاده کرد.

خاک در جدایه‌های KSB42 و KSB10 در مقایسه با سایر جدایه‌ها به طور معنی‌دار بیشتر بود به طوری که این باکتری‌ها غلظت پتاسیم محیط‌کشت مایع الکساندروف را بیش از سه برابر و مقدار پتاسیم قابل جذب خاک را حدود ۳۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش دادند. در

منابع

- 1- Adesemoye A.O., Torbert H.A., and Kloepper J.W. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology* 54(10): 876-86.
- 2- Ashrafi Saeidloo S., and Rasouli Sadaghiani M.H. 2017. The role of silicate-solubilizing microorganisms on potassium release kinetics from K-bearing minerals. *Iranian Journal of Soil and Water Research* 48(3): 639-649. (In Persian)
- 3- Bagyalakshmi B., Ponmurugan P., and Marimuthu S. 2012. Influence of potassium solubilizing bacteria on crop productivity and quality of tobacco (*Camellia sinensis*). *African Journal of Agricultural Research* 7(30): 4250-4259.
- 4- Bhattacharyya P.N., Dutta P., Mausomi Madhab P., Phukan I.K., Sarmah S.R., and Pathak S.K. 2016. Isolation of potash mobilizing microorganisms in tobacco soil and evaluation of their efficiency in potash nutrition in tobacco: a novel approach. *Two and a Bud* 63(1): 8-12.
- 5- Bozhinova R. 2012. Effect of long-term potassium fertilization on the chemical composition of oriental tobacco. *Journal of Central European Agriculture* 13(3): 510-518.
- 6- Deaker R., Kecskes M.L., Rose M.T., Amprayn K., Ganisan K., Tran T.K.C., Vu T.N., Phan T.C, Hien N.T., and Kennedy I.R. 2011. Practical methods for the quality control of inoculant bio-fertilizers. *ACIAR Monograph Series No.147*, Australian Center for International Agricultural Research: Canberra.
- 7- Ebrahimi Karim-Abad R., Rasouli-Sadaghiani M.H., and Barin M. 2016. Isolation of phosphate-solubilizing microorganisms from wheat rhizosphere and evaluation of their solubilizing potential in presence of two insoluble phosphate sources. *Soil Applied Research* 3(2): 29-41. (In Persian with English abstract)
- 8- Friedrich S., Platonova N.P., Karavaiko G.I., Stichel E., and Glombitza F. 2004. Chemical and microbiological solubilization of silicates. *Acta Biotechnology* 1: 187-196.
- 9- Hu X.F., Chen J., and Guo J.F. 2006. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 983-990.
- 10- Kasana R.C., Panwar N.R., Burman U, Pandey C.B., and Kumar P. 2017. Isolation and identification of two potassium solubilizing fungi from arid soil. *International Journal of Current Microbiological and Applied Science* 6(3): 1752-1762.
- 11- Khoshrou B., Sarikhani M.R., and Aliasgharzag N. 2013. Molecular and biochemical identification of the bacterial isolates used in common biofertilizers in Iran. *Water and Soil Science* 25 (4/2): 13-26.
- 12- 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.
- 13- Liu W., Xu X., Wu X., Yang Q., Luo Y., and Christie P. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environmental Geochemistry and Health* 28: 133-140.
- 14- Malinovskaya I.M., Kosenko L.V., Votselko S.K., and Podgorskii V.S. 1990. Role of *Bacillus mucilaginosus* polysaccharide in degradation of silicate minerals. *Microbiology* 59: 49-55.
- 15- McLean E.O., and Watson M.E. 1985. Soil measurement of plant- available potassium. P. 277-308. In R.D. Munson (ed.) *Potassium in agriculture*. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI.
- 16- Nihala J.P.P. 2017. Solubilization of Insoluble Potassium by Different Microbial Isolates in vitro Condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 3600-3607.
- 17- Parmar P., and Sindhu S.S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiological Research* 3(1): 25-31.
- 18- Ponmurugan P., and Gopi C. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphate activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology* 5: 348-350.
- 19- Rasouli Sadaghiani M, Sadeghi S, Barin M, Sepehr E, and Dovlati B. 2017. The effect of silicate solubilizing bacteria on potassium release from mica minerals and its uptake by corn plants. *Journal of Water and Soil Science* 20(78): 89-102. (In Persian with English abstract)
- 20- Richmond M.D., Pearce R.C., and Bailey W.A. 2016. Dark fire- cured tobacco response to potassium and application method. *Tobacco Science* 53: 12-15.
- 21- Sadeghi Azad S., Rasouli-Sadaghiani M.H., Barin B., Sepehr M., Dovlti D., and Vahedi R. 2018. Influence of K-Solubilizing Fungi on Potassium Release from Silicate Minerals and some Growth Indices of Corn (*Zea mays* L.).

- Applied Soil Research 6(3): 96-108. (In Persian with English abstract)
- 22- Sarikhani M.R., Madani O., and Oustan Sh. 2017. Study on potassium release from mica minerals and its alteration as influenced by microbial inoculation. Journal of Water and Soil 30(3): 900-914. (In Persian with English abstract)
 - 23- Sarikhani M.R., Khoshru B., and Oustan Sh. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in vitro conditions. Geomicrobiology Journal 33 (9): 832-838.
 - 24- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory guide for identification for plant pathogenic bacteria. 3rd ed. The American Phytopathological society, Minnesota USA.
 - 25- Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K., and Puschenreiter M. 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phyto-extraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 60: 182-194.
 - 26- Sheng X.F., and Huang W.E. 2002. Mechanism of potassium release from feldspar affected by the strain NBT of silicate bacterium. Acta Pedologica Sinica 39 (6): 863-871.
 - 27- Singh G., Biswas D.R., and Marwaha T.S. 2010. Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum* L.): a hydroponics study under phytotron growth chamber. Journal of Plant Nutrition 33(8): 1236-1251.
 - 28- Subhashini D.V. 2013. Effect of bio-inoculation of AM fungi and PGPR on the growth, yield and quality of FCV tobacco (*Nicotiana tabacum*) in vertisols. Indian Journal of Agricultural Science 83(6): 667-672.
 - 29- Subhashini D.V. 2014. Growth promotion and increased potassium uptake of tobacco by potassium-mobilizing bacterium *frateuria aurantia* grown at different potassium levels in vertisols. Communication in Soil Science and Plant Analysis 46(2): 210-220.
 - 30- Subhashini D.V., Anuradha M., Reddy D., and Vasanthi J. 2016. Development of bioconsortia for optimizing nutrient supplementation through microbes for sustainable tobacco production, International Journal of Plant Production 10 (4): 479-490.
 - 31- Sugumaran P., and Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Sciences, 3: 350-355.
 - 32- Vann M.C., Fisher L.R., Jordan D.L., Hardy D.H., Smith W.D., and Stewart A.M. 2012. The effect of potassium rate on the yield and quality of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L). Tobacco Science 49: 14-20.
 - 33- Velazquez E., Silva R.L., Ramirez-Bahena M.H., and Piex A. 2016. Diversity of potassium solubilizing microorganisms and their interactions with plants. P. 99-110. In V.S. Meena, B.R. Maurya, J.P. Verma, R.S. Meena (eds) Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. Springer, New Delhi.
 - 34- 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.

Isolation of Silicate Minerals-Solubilizing Bacteria from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Rhizosphere and Evaluation of their Efficiency on Soil Potassium Release

R. Ranjbar^{1*} - E. Sepehr² - A. Samadi³ - M.H. Rasouli Sadagiani⁴ - M. Barin⁵ - B. Dovlati⁶

Received: 14-01-2019

Accepted: 11-06-2019

Introduction: Potassium (K) is one of the major essential macronutrients for plant growth. Soil has rich reserves of K, among which only 1–2% can be directly absorbed by plants. It may be more economically viable to transform the fixed slow-release K into available K that can be absorbed by plants. The ability of some microorganisms to dissolve soil K-bearing minerals, such as micas is an important feature for increasing the yield of high-K-demand crops such as tobacco. Also, these microorganisms have both economic and environmental advantage. A large number of saprophytic bacteria such as *Bacillus mucilaginosus* and fungal strains such as *Aspergillus* spp. are known for their potential in releasing insoluble native K-source in soil into a plant available nutrient pool. Tobacco (*Nicotiana* spp.) is one of the most important industrial crops. K plays a vital role in increasing the tobacco yield and controlling quality parameters such as leaf combustibility that is one of the key criteria taken into account by the tobacco industry for assessing quality. Thus, high ranges of K fertilizers are applied in tobacco fields based on plant K requirement to build up soil K in tobacco producing countries. Increasing cost of the fertilizers and environmental risks necessitates alternate means to fertilizers such as application of microorganisms. The use of chemical K fertilizers can be reduced by exploiting the potential of bio-inoculants which are inexpensive and eco-friendly. Information related to K-solubilizing microorganisms in tobacco rhizosphere and their suitability in increasing the available K in tobacco-cultivated soils is not well-documented. Hence, the present study was conducted to screen the KSB isolates from tobacco-cultivated soils and evaluate their potential in dissolving K bearing silicate minerals and increasing soil available potassium.

Materials and Methods: Soil samples were randomly collected from the rhizosphere of tobacco from 25 different locations in northwest of Iran. The serial dilutions of the soil samples were made up to 10^{-4} and 5 μ l of diluted soil suspension plated on Aleksandrov medium plates (on the agar-based culture medium). Aleksandrov medium contained 5.0 g Glucose, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g $CaCO_3$, 0.006 g $FeCl_3$, 2.0 g Ca_3PO_4 , 2.0 g insoluble mica powder as potassium source and 20.0 g agar in 1 liter of deionized water. The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ C$ in incubator for 10 days. Finally, nine isolates of potassium silicate solubilizing bacteria were isolated and purified. Solid and liquid Aleksandrov media were applied for qualitative (Solubility Index = Diameter of zone of clearance/ Diameter of growth) and quantitative (K content) evaluation, respectively, based on the completely randomized design (CRD) with three replication. Liquid Aleksandrov medium containing 2 g L^{-1} of mica and feldspar mixture, was inoculated with bacterial isolates. Bacterial isolates creating high solubility index and releasing more K from K-bearing minerals into liquid medium, were selected as effective isolates. In order to evaluate the efficiency of the potent bacterial isolates for increasing soil available K, an experiment was conducted with three replication and eight potent bacterial isolates along with a control (non-inoculated soil). Sterilized soil samples were inoculated with bacterial isolates separately and incubated at $25^\circ C$, with 75% field capacity moisture levels for 90 days. After incubation, available K in soil samples were extracted with Ammonium Acetate 1M. Variance of solubility index, K concentration into liquid Aleksandrov medium and soil available K were analyzed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Student-Newman-Keuls (SNK) test comparisons were also used to compare available soil K using SPSS 16.0.

Results and Discussion: Eight KSBs isolates, including KSB20, KSB30, KSB40, KSB22, KSB42, KSB90, KSB92 and KSB10, were isolated and purified as effective isolates for dissolving mica and feldspar minerals. Most isolates were gram-positive, rod-shaped, and white in appearance. The studied isolates, except KSB22, KSB40 and KSB20, had α -amylase enzyme activity. Bacterial isolates, including KSB20, KSB30, KSB42 and KSB10, were significantly superior in sucrose and glucose hydrolysis. The isolate of KSB10 also had fluorescence properties. The highest solubility index (2.8, 2.7 and 2.5) was obtained from the activity of KSB22,

1, 2, 3, 4, 5 and 6- Ph.D. Student, Associate Professor, Professors and Assistant Professors Department of Soil Science, Agricultural Faculty, Urmia University, respectively.

(* - Corresponding Author Email: ranjbarrahim14@gmail.com)

KSB42 and KSB10 isolates in solid Aleksandrov medium, respectively. The highest concentration of potassium into liquid Aleksandrov medium was found for the KSB42 and KSB10 isolates (9.40 mg L^{-1}). The KSB42 and KSB10 isolates increased medium K concentration approximately three times more than non-inoculated medium. In addition, KSB42 and KSB10 isolates were more effective in releasing potassium from soil potassium-bearing minerals. The amount of available potassium in soil incubated with KSB42 and KSB10 isolates increased by 44 and 46 mg kg^{-1} compared to the control, respectively.

Conclusion: Among bacterial isolates purified from the tobacco rhizosphere, the KSB42 and KSB10 isolates increased more significantly the solubility of potassium minerals and potassium availability in soil compared to other isolates. These bacteria isolates increased potassium concentration into Aleksandrov liquid medium by more than three times and also increased soil available potassium by about 44 to 46 mg kg^{-1} compared with the control. As a result, these isolates (KSB42 and KSB10) can be used as a bio-fertilizer to reduce potassium fertilizer application and increase the quality of tobacco after field experiments.

Keywords: Potassium, Potassium solubilizing bacterium, Silicates minerals, Tobacco rhizosphere