نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۸، ص. ۵۰۰-۴۸۹

Journal of Water and Soil
Vol. 33, No. 3, Jul-Aug. 2019, p. 489-500

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

رحمت اله رنجبر[1*]- ابراهیم سپهر[2]- عباس صمدی[3]- میرحسن رسولی صدقیانی[4]- محسن برین[5]- بهنام دولتی[6]

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 بارلی۲۱ 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 کاملا 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

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 قابل‌جذب است (۱۴) و بقیه به شکل غیرقابل استفاده گیاه در ساختمان کانی‌های خاک واقع است. بنابراین به نظر می‌رسد تبدیل شکل غیرتبادلی 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 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 تاثیر بر رشد گیاه، مزایای اقتصادی و زیست‌محیطی نیز دارند (۱۶). باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار، علاوه بر آزادسازی پتاسیم، اسیدآمینه‌ها، 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

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

www.SID.ir

Archive of SID

اخیر، باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار (KSB[1]) در تولید کودهای بیولوژیک به کار می‌روند. در تحقیقی، ژانگ و کانگ، چهار جدایه GL7، JM3، 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 (*Aspergilus 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 ($۳/۲۳mg\ g^{-1}$) از محیط‌کشت 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 *Fomitopsis meliae* RCKF7 و *Aspergillus tubingensis* RCKF5، بیشترین توانایی را در انحلال فلدسپار و آزادسازی پتاسیم داشتند (۱۰). همچنین اخیرا، تلقیح قارچی خاک تأثیر قابل توجهی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌های سیلیکاتی و بهبود رشد گیاه ذرت داشته است (۲۱). بنابراین، حل کردن زیستی[2] عناصر معدنی خاک بخش مهمی از راه‌کارهای مدیریت تلفیقی عناصر غذایی[3] است (۱). مصرف کود پتاسیمی را می‌توان با تلقیح زیستی ریزجانداران حل کننده کانی‌های پتاسیم‌دار کاهش داد که علاوه بر کم‌هزینه بودن دوست‌دار اکوسیستم[4] 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 گیاه و حفظ پتاسیم خاک در سطح بالا مصرف می‌شود (۲۸ و ۳۲). در حالی‌که، 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 این‌که 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 ریزجاندارن 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 ایلایت 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 کاملا شستشو و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شدند و دو گرم از آن به هر لیتر محیط‌کشت جامد و مایع الکساندروف اضافه شد (۲).

1- Potassium solubilizing bacteria (KSB)
2- Biodissolution
3- Integrated nutrient management, INM
4- Eco-friendly

www.SID.ir

Archive of SID

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_2O_3	K_2O	Na_2O	Fe_2O_3	MgO	CaO	MnO	P_2O_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
Ilite	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)

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از ریزوسفر

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از نمونه‌های خاک پس از تهیه سری‌های رقت در محیط‌کشت اختصاصی جامد الکساندروف صورت گرفت (۹) که هر لیتر آن حاوی پنج گرم گلوکز، دو گرم کربنات‌کلسیم، 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 محیط‌کشت بود. از نمونه خاک‌ها با روش رقت‌سازی متوالی[1] 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 سوسپانسون به محیط کشت جامد الکساندورف 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 مذبور مجدد روی محیط کشت الکساندروف جامد به صورت نقطه‌ای و خطی بازکشت 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 محیط‌کشت نوترینت براث به داخل هر کدام از نه ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری (برابر با تعداد جدایه‌های خالص‌سازی شده) ریخته و استریل شد. محیط‌کشت 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 محیط‌کشت الکساندروف جامد (ارزیابی کیفی) و مایع (ارزیابی کمی) استفاده گردید (۹).

در ارزیابی کیفی، توانایی ۹ جدایه باکتری جداسازی شده روی محیط‌کشت الکساندروف جامد به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت. ۹ جدایه باکتری در محیط‌کشت 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[2] برای جدایه‌ها با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید (۷).

$$Solubility-index=\frac{Corona.diameter}{Colony.diameter} \qquad (۱)$$

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 محیط‌کشت نوترینت براث حاوی جدایه باکتری (کشت شبانه) به داخل ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت 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 محیط‌کشت 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 محیط‌کشت

1- Serial dilution

2- Solubility index

www.SID.ir

Archive of SID

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

ارزیابی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

تست هیدرولیز نشاسته: برای این کار محیط‌کشت نوترینت آگار حاوی ۰/۲ درصد نشاسته محلول در آب تهیه و استریل شد. جدایه‌های باکتری روی محیط‌کشت داخل پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محلول لوگول جهت نمایان نمودن نشاسته در محیط‌کشت 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 محیط‌کشت مجزا از مایع پپتون تهیه شد که یکی حاوی ۱٪ گلوکز و دیگری حاوی ۱٪ ساکارز بود. محیط‌کشت 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: محیط‌کشت 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم انتخاب شد. مایه تلقیح هر جدایه باکتری (حاوی 10^8 سلول در یک میلی‌لیتر 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 نمونه۳۰ گرمی خاک محاسبه شده و یک میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت‌براث 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 محیط‌کشت مایع و جامد الکساندروف و مقدار پتاسیم آزاد شده از خاک در قالب طرح کاملا 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 محیط‌کشت جامد الکساندورف، 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.

www.SID.ir

Archive of SID

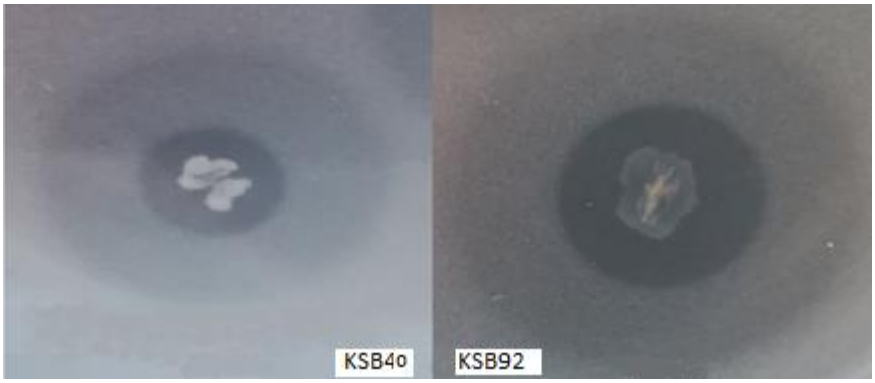
جدول ۲- خصوصیات کشت جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار

Table 2- The cultural properties of potassium-bearing mineral dissolving bacteria isolates

جدایه KSB[1] 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 حل کننده پتاسیم

1- KSB: potassium solubilizing bacterium



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

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

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

جدایه‌های باکتری به غیر از KSB22 و KSB4 و KSB2، توانایی ترشح آنزیم آلفا آمیلاز و هیدرولیز نشاسته را در محیط‌کشت 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 محیط‌کشت مایع پپتون داشتند. علاوه بر آن، جدایه باکتری KSB10 دارای خصوصیت فلورسنتی در محیط کشت King B بود (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

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[1] KSB isolate	Testتست				
	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 حل کننده پتاسیم

1- KSB: potassium solubilizing bacterium

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 ($P\leq 0.01$) 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 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 ($P\leq 0.01$) 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.

جدول ٤- 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

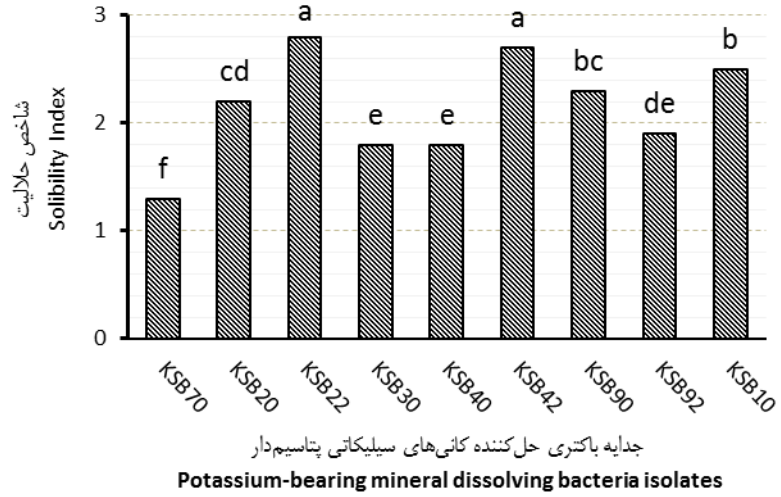
منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Mean of squares	
		پتاسیم قابل استفاده خاک ۹۰ روز بعد از تلقیح Soil available potassium after 90days of inoculation	پتاسیم آزاد شده به محیط‌کشت مایع Released K into liquid medium
تلقیح باکتری Bacteria inoculation	8	620.98**	12.356***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

www.SID.ir

Archive of SID



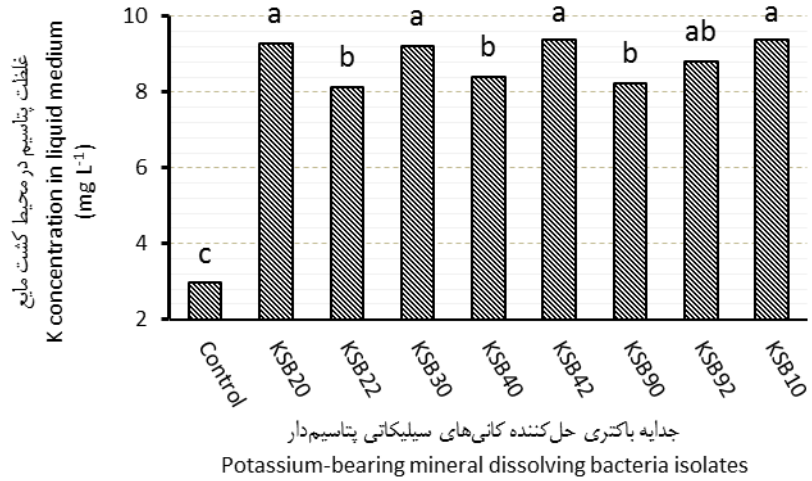
شکل ۲- تأثیر جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم دار بر شاخص حلالیت در محیط‌کشت جامد الکساندروف

Figure 2- Effect of potassium-bearing minerals dissolving isolates on the mean of solubility index on solid Aleksandrov medium

به طوری‌که، غلظت پتاسیم در محیط‌کشت بدون تلقیح باکتریایی (شاهد) ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر بود در حالی‌که، غلظت آن در محیط‌کشت تلقیح شده با جدایه‌های باکتری KSB42 و KSB10 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 حل کننده کانی و نوع کانی پتاسیم‌دار بستگی دارد (۲۶).

پس از ارزیابی کمی جدایه‌های باکتری حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار در افزایش غلظت پتاسیم محیط‌کشت، چهار جدایه باکتری KSB20، KSB22، KSB42 و KSB10 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



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

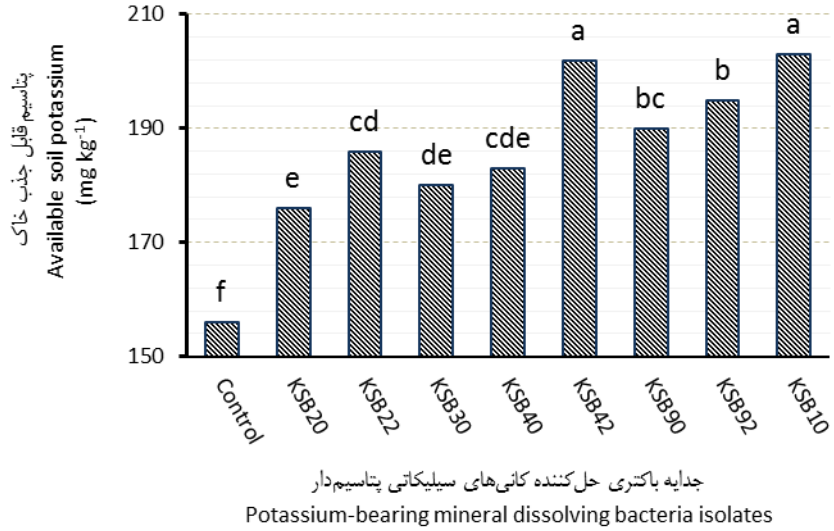
www.SID.ir

Archive of SID

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 ٤- 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

(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. تاثیر جدایه باکتری KSB30 و KSB40 و KSB20 در افزایش پتاسیم قابل استفاده خاک کمتر (۲۰ تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد) بود.

قابل استفاده خاک

خصوصیات خاک مورد مطالعه در این بخش از آزمایش در جدول ۵ آمده است. طبق نتایج تجزیه واریانس، تاثیر باکتری‌های مورد مطالعه بر مقدار پتاسیم قابل استفاده خاک معنی‌دار ($P < 0.01$) بود و جدایه‌های مورد مطالعه باکتری‌های حل‌کننده کانی‌های پتاسیم‌دار از لحاظ تاثیر 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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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 Aliasgharzad 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.).

www.SID.ir

Archive of SID

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. 3nd 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 relase 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.

www.SID.ir

Journal of Water and Soil
Vol. 33, No. 3, Jul-Aug. 2019, p. 489-500

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۸، ص. ۵۰۰-۴۸۹

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. Sepehr[2]- A. Samadi[3]- M.H. Rasouli Sadagiani[4]- M. Barin[5]- B. Dovlati[6]

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 µl 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 MgSO4.7H2O, 0.1g CaCO3, 0.006 g FeCl3, 2.0 g Ca3PO4, 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±2°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°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)

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir