

بهینه‌سازی انحلال پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* با استفاده از طرح پلاکت-برمن و روش سطح پاسخ (RSM)

ساناز اشرفی سعیدلو^۱ - عباس صمدی^۲ - میرحسن رسولی صدقیانی^{۳*} - محسن برین^۳ - ابراهیم سپهر^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹

چکیده

انحلال پتاسیم موجود در ساختار کانی‌ها توسط ریزجانداران منجر به افزایش رشد و عملکرد گیاهان شده و علاوه بر صرفه‌ی اقتصادی، دوستدار محیط زیست است، لذا شناسایی گونه‌های کارا در انحلال پتاسیم و تعیین شرایط بهینه برای حداکثر فعالیت این گونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف متغیرهای منبع کربن، زمان انکوباسیون و pH بر میزان انحلال و آزادسازی پتاسیم از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* انجام گرفت. برای این منظور در مرحله نخست بر مبنای طرح پلاکت-برمن، تعداد ۱۲ آزمایش تعریف شد و تأثیر منابع مختلف کربن شامل گلوکز، ساکاروز و فروکتوز بر انحلال هر یک از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت بررسی شد. در ادامه بر اساس تحلیل نتایج مربوط به انحلال پتاسیم در مرحله اول، منبع کربن مهم و تأثیرگذار شناسایی و دامنه‌های متفاوتی از متغیرهای pH (۱۰-۳)، زمان انکوباسیون (۱۸-۱ روز) و مقدار منبع کربن (۱۲-۰/۶ گرم در لیتر) در نظر گرفته شده و طرح مرکب مرکزی با ۲۰ آزمایش و بر اساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل طراحی گردید. نتایج نشان داد که مدل طرح مرکب مرکزی قابلیت مطلوبی ($R^2=0/944$ و $R=1/47$ - $RMSE=0/82$) در پیش‌بینی مقدار آزادسازی پتاسیم از فلدسپار و فلوگوپیت دارد. تحلیل حساسیت مدل طرح مرکب مرکزی نشان داد که از بین سه متغیر مورد بررسی، pH بیشترین تأثیر را بر آزادسازی پتاسیم دارد. حداکثر غلظت پتاسیم محلول در حضور فلوگوپیت و فلدسپار به ترتیب برابر با ۱۲۱/۱۶ و ۸۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر، مربوط به $pH=10/36$ ، مقدار ساکاروز ۶/۵ گرم در لیتر و زمان ۱۰ روز بود. زمان انکوباسیون نیز بر آزادسازی پتاسیم تأثیر داشت. روند آزادسازی پتاسیم در مراحل اولیه انکوباسیون افزایشی، در مراحل میانی کاهشی و در ادامه افزایشی بود. بطور کلی بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی، pHهای ۱۰/۳۶ و ۱۰/۳۴، و مقادیر ۲/۲۶ و ۶/۹۲ گرم در لیتر از ساکاروز و زمان‌های ۱۸ و ۲ روز به ترتیب به‌عنوان شرایط بهینه برای دستیابی به بیشینه آزادسازی پتاسیم از فلدسپار و فلوگوپیت در محیط کشت پیش‌بینی شدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم، طرح مرکب مرکزی، کانی‌های پتاسیم‌دار، محیط الکساندروف

مقدمه

وسعی از ۰/۰۴ تا ۳ درصد متغیر است (۲). سه شکل از پتاسیم در خاک‌ها یافت می‌شود که عبارتند از پتاسیم ساختمانی موجود در ساختار کانی‌های خاک، پتاسیم غیرتبادلی و اشکال قابل‌دسترس محلول و تبادل (۶ و ۱۶). کانی‌های خاک شامل فلدسپارها، میکاها و سیلیکات‌های رسی شبه میکایی، بیش از ۹۰ تا ۹۸ درصد از پتاسیم خاک را تشکیل می‌دهند. این کانی‌ها منشأ اصلی تأمین پتاسیم در خاک‌ها محسوب می‌شوند (۳۶). این شکل از پتاسیم با پیوند قوی در ساختار کانی قرار گرفته و اغلب برای گیاه غیرقابل‌دسترس است. پتاسیم غیرتبادلی که به‌عنوان منبع ذخیره‌ای عمل نموده و پتاسیم جذب شده و یا از دست رفته از محلول خاک را تجدید می‌نماید، حدود ۱ الی ۱۰ درصد از پتاسیم خاک را تشکیل می‌دهد. نوع قابل‌دسترس نیز که ۱ الی ۲ درصد از پتاسیم خاک را شکل می‌دهد، یا در محلول خاک و یا به‌صورت بخشی از کاتیون قابل‌تبادل در کانی‌های رسی

پتاسیم نقش مهمی در رشد و توسعه گیاهان ایفا می‌کند و در فعال‌سازی آنزیم‌ها، حفظ تورم سلولی، تنظیم فشار اسمزی، افزایش فتوسنتز، کاهش تنفس، انتقال قندها و نشاسته، بهبود جذب نیتروژن و سنتز پروتئین اهمیت به‌سزائی دارد (۱۲). این عنصر از نظر فراوانی چهارمین عنصری است که ۲/۵ درصد از لیتوسفر را تشکیل می‌دهد. با این حال، غلظت‌های واقعی این عنصر در خاک در محدوده‌ی

۱، ۲، ۳ - ۴ به ترتیب دانشجوی دکتری علوم خاک، استاد، استادیار و دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
* نویسنده مسئول: (Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)

داده شده و عوامل دیگر ثابت نگه داشته می‌شوند که این امر علاوه بر زمان بر بودن، پرهزینه بوده و از سوی دیگر تضمینی برای تشخیص شرایط کاملاً بهینه برای فعالیت متابولیکی باکتری ارائه نمی‌دهد (۳ و ۲۶). در این ارتباط روش‌های آماری نظیر طرح پلاکت-برمن و روش سطح پاسخ^۱ می‌تواند ابزارهای مفیدی برای مدل‌سازی کمی اثر توأم تعدادی متغیر برای رهاسازی پتاسیم توسط باکتری‌ها به منظور نیل به حداکثر کارایی این ریزجانداران در انجام فعالیت‌های زیستی محسوب شوند (۳۵). روش سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری مفید برای طراحی آزمایشات، ایجاد مدل‌ها و آنالیز تأثیرات چندین فاکتور مستقل است (۱۵). مزیت اصلی RSM، کاهش تعداد آزمایشاتی است که برای ارزیابی فاکتورهای چندگانه و برهمکنش‌های آن‌ها مورد نیاز است. علاوه بر این، مطالعه‌ی تأثیرات مستقل و متقابل این فاکتورها برای تعیین مقدار پارامتر مورد نظر مفید است. بنابراین، در صورتی که فاکتورها و برهمکنش‌های موجود در آزمایش زیاد باشند، RSM ابزار کارآمدی را برای بررسی جنبه‌های مؤثر بر پاسخ موردنظر فراهم می‌نماید. در بهینه‌سازی یک فرآیند، برای تعیین معادله‌ی چندجمله‌ای جهت تفسیر سطح پاسخ می‌توان از RSM استفاده نمود (۲۳).

اگرچه کمبود پتاسیم به‌اندازه‌ی کمبود نیتروژن و فسفر شایع نیست، بسیاری از خاک‌های غنی از پتاسیم به‌دلیل جذب بالا توسط گیاهان، عدم کاربرد مقادیر کافی کودهای پتاسیمی، رواناب، آبشویی و فرسایش خاک دچار کمبود شده‌اند (۲۸ و ۳۱). بنابراین آزادسازی و انحلال پتاسیم از ساختار کانی‌های موجود در خاک به‌منظور افزایش قابلیت فراهمی پتاسیم برای گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۳ و ۲۸). با توجه به این که انحلال پتاسیم موجود در ساختار کانی‌ها توسط ریزجانداران منجر به افزایش رشد و عملکرد گیاهان شده و علاوه بر صرفه‌ی اقتصادی، از نظر زیست‌محیطی خطری ندارد، شناسایی گونه‌های کارا در انحلال پتاسیم و تعیین شرایط بهینه برای ماکزیمم فعالیت این گونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. به این منظور این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف متغیرهای منبع کربن، زمان انکوباسیون و pH بر میزان انحلال و آزادسازی پتاسیم از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح و اندازه‌گیری پتاسیم

باکتری *سودوموناس فلورسنس* در محیط کشت نوترینت آگار

یافت می‌شود (۲). بین اشکال مختلف پتاسیم رابطه تعادلی وجود دارد که این روابط تعادلی از نظر تغذیه گیاه دارای اهمیت بالایی هستند (۳۳).

ریزجانداران نقش مهمی در چرخه طبیعی پتاسیم ایفا می‌کنند. برخی از ریزجانداران نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گل‌سنگ‌ها قادرند سیلیکات‌ها را تجزیه و عناصری نظیر پتاسیم، آهن، روی، سیلیس و فسفر را آزاد نمایند که در این میان باکتری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۱). در ارتباط با نقش باکتری‌ها در رهاسازی از طریق تخریب کانی‌های سیلیکاتی، مطالعات زیادی صورت گرفته است (۷ و ۱۰). جمعیت قابل توجهی از باکتری‌های حل‌کننده‌ی پتاسیم در خاک و ریزوسفر وجود دارند (۲). از این باکتری‌ها که به باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات معروفند، کود زیستی بنام کود زیستی پتاسیمی (*Biological Potassium Fertilizer*) تهیه می‌گردد. باکتری‌های موجود در کود زیستی از کانی‌هایی نظیر بیوتیت، فلوگوپیت، مسکویت، ارتوکلاز و میکروکلین عناصر مختلف از جمله پتاسیم را آزاد می‌کنند (۱۳). انحلال کانی‌های پتاسیمی توسط باکتری‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی و معدنی صورت می‌گیرد (۳۷). گونه‌های *باسیلوس*، *سودوموناس*، *آرتروباکتر*، *تیوباسیلوس*، *اگروباکتریوم*، *ریزوبیوم*، *فلاوباکتریوم*، *فراکتوریا*، *پائتی‌باسیلوس*، *B. ادافیکوس*، *B. موسیلاژینوز* و *A. فروکسیدانس* مهم‌ترین باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم می‌باشند (۳، ۴، ۵، ۲۱ و ۲۴).

اشرفی و همکاران (۵) اثر ریزجانداران حل‌کننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار را بررسی کرده و گزارش نمودند که تلقیح میکروبی منجر به افزایش رهاسازی پتاسیم شد و پتاسیم محلول در نمونه‌های تلقیح‌یافته با *Bacillus sp.* و *Aspergillus niger* به ترتیب ۹۲/۳ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه های شاهد افزایش یافت. در مطالعه‌ی دیگری تلقیح گیاهان ذرت و گندم با *B. موسیلاژینوز*، *A. کروکوکوم* و *ریزوبیوم*، منجر به آزادسازی مقادیر بالایی از پتاسیم میکا گردید که به‌نوبه‌ی خود به‌عنوان منبعی از پتاسیم برای رشد گیاه عمل نمود (۳۲). مطالعات درباره‌ی مکانیسم‌های انحلال پتاسیم نیز، حاکی از کاهش قابل‌توجه pH و افزایش رهاسازی پتاسیم از منابع موسکویت و بیوتیت توسط باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم بود (۲۴).

فعالیت‌های متابولیکی ریزجانداران و در نتیجه توانایی آزادسازی پتاسیم توسط آن‌ها تحت تأثیر متغیرهای فیزیکی و شیمیایی گوناگونی نظیر منابع کربن و نیتروژن، دما، طول دوره انکوباسیون، pH، شرایط تهویه، نوع و مقدار کانی است (۳۸). ترکیب سطوح مختلف عوامل مؤثر بر رشد و فعالیت باکتری‌ها از روش‌های معمول برای تشخیص شرایط مناسب رهاسازی پتاسیم توسط آن‌ها است. در روش‌های معمول برای بررسی اثر عوامل مختلف بر شرایط رشد و قابلیت انحلال و آزادسازی پتاسیم توسط باکتری‌ها، یک عامل تغییر

1- Response Surface Methodology (RSM)

منبع کربن مهم و تأثیرگذار شناسایی گردید. در مرحله دوم، به‌منظور مدل‌سازی قابلیت انحلال پتاسیم و تعیین شرایط بهینه محیط‌کشت برای انحلال از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. لذا دامنه‌های متفاوتی از متغیرهای مستقل شامل pH، منبع کربن و زمان انکوباسیون در نظر گرفته شده و بر اساس مقادیر کدبندی شده متغیرهای مستقل، طراحی آزمایش صورت پذیرفت (جدول ۲). کدبندی مقادیر واقعی متغیرها با استفاده از معادله‌ی زیر انجام شد.

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (1)$$

در این رابطه x_0 و x_i ، X_i به ترتیب نشان‌دهنده‌ی مقدار کدشده‌ی متغیر، مقدار واقعی هر متغیر و میانگین دامنه‌ی هر متغیر است. Δx نیز مقدار تغییر گام (Step Change) هر پارامتر است. تجزیه تحلیل‌های مربوط به مدل‌سازی طرح پلاکت-برمن و طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 10 صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر منابع مختلف کربن بر رهاسازی پتاسیم از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس*، با استفاده از طرح پلاکت-برمن بررسی گردید. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۳، تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف کربن وجود نداشته و هر کدام از آن‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزین یکدیگر در محیط‌کشت استفاده شوند (۳). با توجه به این که مقدار آماره P برای ساکاروز کمتر بود لذا برای بهینه‌سازی سطوح مختلف منبع کربن محیط‌کشت در آزمایش‌های مرحله دوم ساکاروز به‌عنوان منبع کربن انتخاب گردید.

(Nutrient Agar) کشت گردید. سپس محیط‌کشت نوترینت برات (Nutrient Broth) تهیه و باکتری رشد یافته در آن تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر (دور rpm ۱۲۰) در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایه تلقیح (با جمعیت حدود $10^8 \times 2/49$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر از محلول در جذب نور (۱/۵۶) با طول موج ۶۰۰ نانومتر) داخل ارلن‌های حاوی محیط‌های کشت الکساندروف (محیط کشت اختصاصی پتاسیم که شامل ۵ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم $CaCO_3$ ، ۰/۰۰۶ گرم $FeCl_3$ ، ۲ گرم Ca_3PO_4 و ۳ گرم پودر میکا به‌عنوان منبع پتاسیم می‌باشد) (در مراحل اول و دوم آزمایش) افزوده شد (۵). سپس ارلن‌ها در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۰ شیک گردیدند. در زمان‌های مختلف تعیین شده، محتویات ارلن‌ها پس از سانتریفیوژ با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ۴۱) صاف شده و در عصاره‌های بدست آمده مقدار پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر مدل Corning 480 قرائت شد (۹).

مدل‌سازی انحلال پتاسیم

به‌منظور مدل‌سازی فرآیند انحلال و رهاسازی پتاسیم توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* از طرح پلاکت-برمن و روش سطح پاسخ بر مبنای طرح مرکب مرکزی استفاده شد و آزمایشاتی در دو مرحله طراحی و اجرا گردیدند. در مرحله نخست بر مبنای طرح پلاکت-برمن، تعداد ۱۲ آزمایش تعریف شده و تأثیر منابع مختلف کربن شامل گلوکز، ساکاروز و فروکتوز بر انحلال هر یک از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت بررسی شد (جدول ۱). بر اساس تحلیل نتایج مربوط به انحلال پتاسیم در مرحله اول،

جدول ۱- دامنه متغیرهای مدل پلاکت-برمن

Table 1- Range of Placket –Burman's model variables

شماره آزمایش Number of experiment	منبع کربن Source of Carbon		
	گلوکز Glucose	ساکاروز Sucrose	فروکتوز Fructose
1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	-1	-1	+1
5	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1
7	-1	+1	+1
8	-1	+1	+1
9	-1	-1	-1
10	+1	+1	-1
11	+1	-1	-1
12	+1	-1	+1

+1 و -1 به ترتیب نشان‌دهنده ۱۰ و ۵ گرم بر لیتر منابع کربن می‌باشند.

+1 and -1 show 10 and 5 g.l⁻¹ of carbon sources.

جدول ۲- دامنه مقادیر متغیرهای مورد مطالعه در مدل سازی
Table 2- Range of studied variables amounts in modeling

متغیر مستقل Independent variable	مقدار کد شده‌ی متغیر Coded amount of variable	دامنه و مقادیر Range and amounts					
		X_i	$+\alpha$	+1	0	-1	$-\alpha$
منبع کربن (گرم در لیتر) (Carbon source (g.l ⁻¹))	X_1		12.386	10	6.5	3	0.613
اسیدیته pH	X_2		10.36	9	7	5	3.63
زمان انکوباسیون (روز) (Incubation time (day))	X_3		18.40	15	10	5	1.59

نشان دهنده‌ی برهمکنش نسبتاً زیاد اما غیرمعنی دار است. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۵ برای معنی‌داری هر یک از ضرایب تابع چند جمله‌ی طرح مرکب مرکزی و با در نظر گرفتن ضرایب دارای اثر معنی‌دار تابع پیش‌بینی‌کننده مقدار پتاسیم رها شده در حضور فلدسپار و فلوگوپیت به ترتیب به صورت معادلات ۲ و ۳ قابل ارائه خواهد بود. در این معادلات X_1 ، X_2 و X_3 به ترتیب مربوط به مقادیر کد شده زمان، pH و ساکاروز می‌باشند. معادلات ۲ و ۳ که بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی خلاصه شده است به روشنی بیان‌گر اثر مثبت و افزایشدهنده pH (X_2) بر افزایش رهاسازی پتاسیم محلول هستند.

طرح آزمایشی مربوط به بررسی تأثیرات متغیرهای زمان، pH و منبع کربن و مقادیر پتاسیم رها شده از کانی‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

بر مبنای طرح مرکب مرکزی و بر اساس متغیرهای مستقل و متغیر پاسخ، ضرایب تابع چندجمله‌ای به همراه سطح معنی‌داری در جدول ۵ نشان داده شده‌اند (جدول ۵). در بخش خطی و درجه دوم، اثر pH ($P < 0.0001$) بر مقدار رهاسازی پتاسیم از کانی‌ها، معنی‌دار بود. علی‌رغم این که برهم‌کنش متغیرهای مورد بررسی بر رهاسازی پتاسیم معنی‌دار نیست، با توجه به کمتر بودن آماره P برای برهم‌کنش زمان و منبع کربن در فلدسپار ($P < 0.3666$) و برهم‌کنش زمان با pH در فلوگوپیت ($P < 0.2585$) نسبت به اثر متقابل سایر پارامترها

جدول ۳- ضرایب رگرسیونی مربوط به داده‌های آزمایشی مدل پلاکت-برمن
Table 3- Regression coefficients of Plackett-Burman model data

کانی Mineral	پارامتر Parameter	ضریب Coefficient	آماره T T-Value	آماره P P-Value
	ثابت معادله Equation constant	5.5560	78.31	0.000
فلدسپار Feldspar	گلوکز Glucose	-0.0614	-0.87	0.412
	ساکاروز Sucrose	-0.1024	-1.44	0.187
	فروکتوز Fructose	-0.1024	-1.44	0.187
	ثابت معادله Equation constant	10.96	61.00	0.000
فلوگوپیت Phlogopite	گلوکز Glucose	-0.0614	-0.34	0.741
	ساکاروز Sucrose	-0.2662	-1.48	0.177
	فروکتوز Fructose	-0.0614	-0.34	0.741

جدول ۴- ماتریس مقادیر متغیرهای کد شده در مدل‌سازی روش طرح مرکب مرکزی
Table 4- Matrix of coded variables amounts in central composite design modeling

شماره آزمایش Experiment Number	مقادیر کدشده‌ی متغیرها Amounts of coded variables			پتاسیم رها شده (mg.l ⁻¹)	
	زمان Time	pH	منبع کربن Carbon source	فلدسپار	فلوگوپیت
				Feldspar	Phlogopite
1	1	1	-1	36.49	55.27
2	1	-1	1	3.48	7.44
3	0	0	0	8.55	24.08
4	-1	-1	1	2.05	5.48
5	0	0	0	8.93	12.62
6	-1	1	-1	26.63	53.9
7	0	0	0	2.43	15.68
8	0	1.68	0	82.96	121.16
9	0	0	0	9.31	32.01
10	0	0	1.68	5.74	8.04
11	0	-1.68	0	4.22	8.43
12	1.68	0	0	9.63	18.17
13	1	1	1	28.05	31.43
14	-1	-1	-1	2.05	3.4
15	1	-1	-1	2.21	9.63
16	0	0	-1.68	3.71	29.47
17	-1	1	1	30.69	62.56
18	-1.68	0	0	7.07	23.52
19	0	0	0	3.96	6.9
20	0	0	0	7.41	7.78

جدول ۵- ضرایب تابع چندجمله‌ای طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی غلظت پتاسیم رها شده

Table 5- Coefficients of central composite design multi variable function for predicting released potassium

بخش مدل Part of model	پارامترهای مدل Model parameters	فلدسپار (Feldspar)			فلوگوپیت (Phlogopite)		
		ضریب Coefficient	آماره T T-Value	آماره P P-Value	ضریب Coefficient	آماره T T-Value	آماره P P-Value
		ثابت مدل Constant of model		7.74	17.44	<0.0001	16.74
خطی Linear	Time	1.40	0.64	0.4408	2.24	0.55	0.4770
	pH	17.49	100.65	<0.0001	26.89	78.73	<0.0001
	C- Source	-0.52	0.087	0.7737	-3.84	1.56	0.2401
درجه دو Second order	Time × Time	-0.22	0.017	0.9001	0.021	4.89E-005	0.9946
	pH × pH	12.24	52.19	<0.0001	15.56	27.94	0.0004
	C- Source × C- Source	-1.68	0.89	0.3675	-0.83	0.071	0.7946
برهمکنش Interaction	Time × pH	-0.046	4.12E-004	0.9842	-4.74	1.44	0.2585
	Time × C- Source	-2.15	0.89	0.3666	-4.60	1.35	0.2727
	pH × C- Source	0.044	3.69E-004	0.9851	-1.88	0.23	0.6445

تیین است.

$$\text{Released K from Feldspar (mg.l}^{-1}\text{)} = 7.74 + 17.49x_2 + 12.24x_2^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 94\% \quad R_{adj}^2 = 88.6\%$$

$$\text{Released K from Phlogopite (mg.l}^{-1}\text{)} = 16.74 + 26.89x_2 + 15.56x_2^2 \quad (3)$$

$$R^2 = 91.8\% \quad R_{adj}^2 = 84.4\%$$

اثر ترکیبی متغیرها بر رهاسازی پتاسیم از کانی‌های فلدسپار و فلوگوپیت با استفاده از نمودارهای سه‌بعدی به‌صورت دو به دو و بر

در شکل ۱ نیز مقدار پتاسیم اندازه‌گیری شده در آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی در مقابل میزان پتاسیم پیش‌بینی شده با مدل طرح مرکب مرکزی معادلات ۱ و ۲ ترسیم شده‌اند. این شکل به‌روشنی نشان می‌دهد که مدل طرح مرکب مرکزی به‌طور مطلوبی مقدار پتاسیم را برآورد نموده است. بر اساس مقدار ضریب تیبن مدل طرح مرکب مرکزی، می‌توان گفت که به‌ترتیب ۹۴/۴ و ۹۱/۸ درصد از تغییرات پتاسیم محلول فلدسپار و فلوگوپیت توسط این مدل قابل

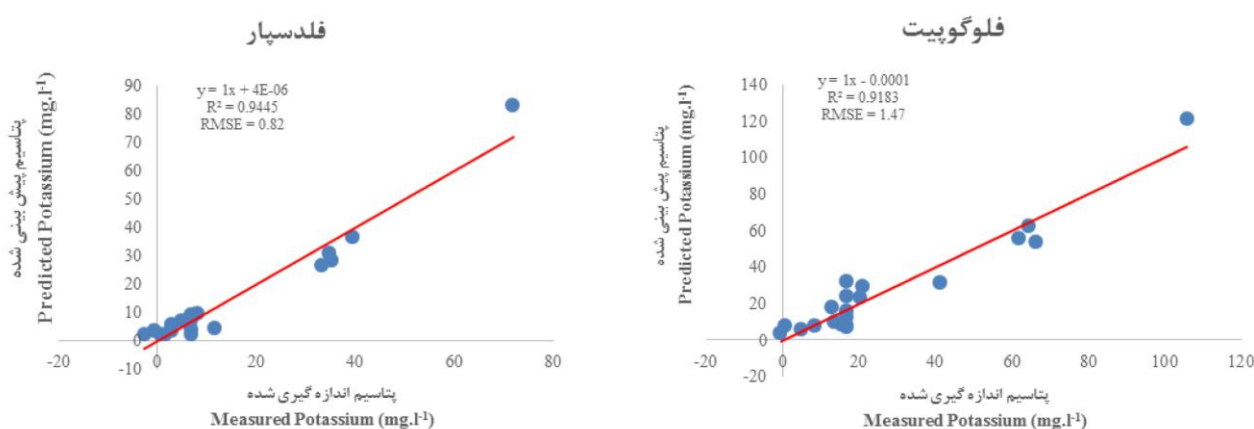
است از طرفی با توجه به اینکه پتاسیم در میکاها توسط نیروهای الکترواستاتیک نگهداری می‌شود لذا آنیون حاصل از اسیدهای آلی تولید شده قادر به انحلال آلومینیوم ورقه اکتاهدرال بوده و می‌تواند پتاسیم بین‌لایه‌ای را آزاد نماید. این درحالیست که در فلدسپارها پتاسیم به‌وسیله پیوند کووالانسی نگهداری می‌شود و رهاسازی از آن به عوامل مختلفی نظیر خصوصیات ساختمانی، ترکیب شیمیایی، اندازه ذرات و خروج فرآورده‌های هوازدگی بستگی دارد.

در طی هوازدگی فلدسپار جایگزینی پتاسیم با یون هیدرونیوم ساختمان فلدسپار را تضعیف کرده و در نتیجه انبساط فلدسپار رخ می‌دهد. یون‌های هیدرونیوم جذب سطحی شده، می‌توانند باعث شکستن پیوندهای Al-O شود و عدد هم‌آرایی آلومینیوم را از ۴ به ۶ رسانده و در نتیجه از ساختمان فلدسپار بیرون رانده شود (۶، ۲۲ و ۲۵).

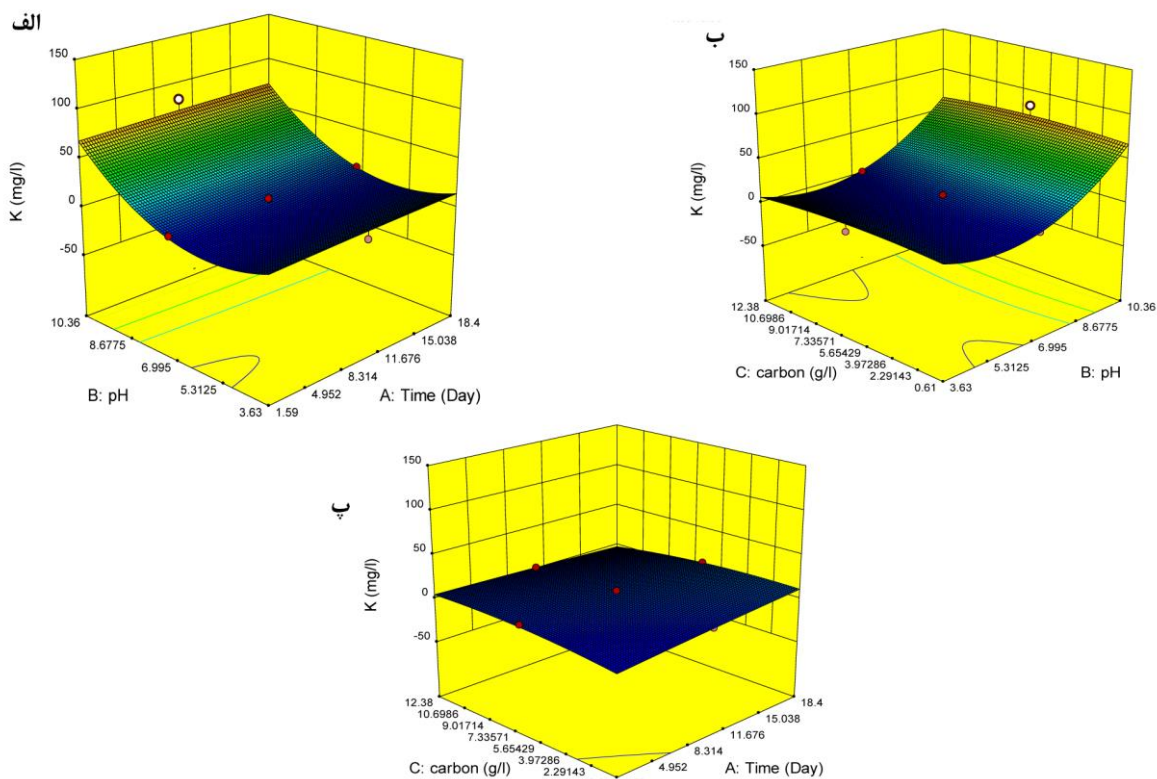
مطالعات نشان دادند که باکتری‌ها و قارچ‌ها با تجزیه کانی‌های حاوی پتاسیم، فسفر و آهن نظیر میکا و فلدسپار می‌توانند منجر به آزادسازی این عناصر شوند (۳۴). تجزیه کانی‌ها در اثر کاهش pH محیط کشت (به دلیل تولید اسیدهای آلی)، تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی (به واسطه اسیدهای آلی و سیدروفور تولید شده) و پلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌ها که به طور غیرمستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارند از مکانیسم‌های اصلی باکتری‌ها در رهاسازی پتاسیم محسوب می‌شوند. پلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی و سیدروفورها را به شدت جذب کرده و منجر به تشکیل غلظت بالایی از اسیدهای آلی و سیدروفورها در نزدیکی سطح کانی شده و با اکسید سیلیسیم موجود در سطح کانی کمپلکس ایجاد می‌نمایند، به این ترتیب عناصر از سطح کانی آزاد شده و وارد محیط کشت محلول می‌شوند، از طرفی پلی‌ساکاریدهای موجود در محیط کشت با جذب سیلیسیم باعث به هم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع می‌شوند و از این طریق منجر به آزاد شدن عناصری نظیر پتاسیم و آهن می‌گردند (۱۹ و ۲۰).

اساس مدل طرح مرکب مرکزی ترسیم شده و به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ ارائه گردیده است. در این شکل در هنگام بررسی اثر دو متغیر، متغیر سوم در مقدار متوسط خود ثابت نگه داشته شده است. برای نمونه شکل ۲ (الف) نشان‌دهنده اثر ترکیبی pH و زمان انکوباسیون بر مقدار رهاسازی پتاسیم در حضور ۶/۵ گرم در لیتر ساکاروز (کد مساوی صفر) است. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود افزایش pH و افزایش زمان انکوباسیون منجر به افزایش میزان انحلال پتاسیم از فلدسپار و فلوگوپیت شده است (شکل‌های ۲ و ۳ الف). با افزایش مقدار ساکاروز میزان رهاسازی پتاسیم در حضور هر دو کانی افزایش یافت اما شیب افزایش رهاسازی در فلدسپار کمتر از فلوگوپیت بود (شکل‌های ۲ و ۳ ب). با توجه به اینکه کربن یکی از منابع غذایی اولیه برای رشد و فعالیت متابولیکی ریزجانداران تلقیح شده می‌باشد و وجود آن برای تولید اسیدهای آلی ضروری است لذا تعیین منبع کربنی مناسب برای باکتری‌های حل‌کننده حائز اهمیت می‌باشد (۱۴، ۲۷ و ۳۰). در مطالعه‌ای که توسط شهاب و احمد (۲۹) صورت گرفت تمام سویه‌های باکتریایی مورد بررسی در حضور ساکاروز به عنوان منبع کربن از توانایی رشد و انحلال برخوردار بودند. اگرچه افزایش غلظت قند (منبع کربن) می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیک و کربوکسیلیک باعث افزایش تولید اسید شود اما این امر در مورد تمام ریزجانداران صادق نمی‌باشد (۱۱). در توضیح علت این امر باید بیان نمود که وجود کمتر از حد مطلوب منابع کربنه برای تولید متابولیت‌های ثانویه ضروری است (۱۷). بر این اساس ممکن است کاهش میزان پتاسیم محلول در غلظت‌های بالای ساکاروز ناشی از کاهش تولید اسیدهای آلی توسط باکتری سودوموناس فلورسنس باشد.

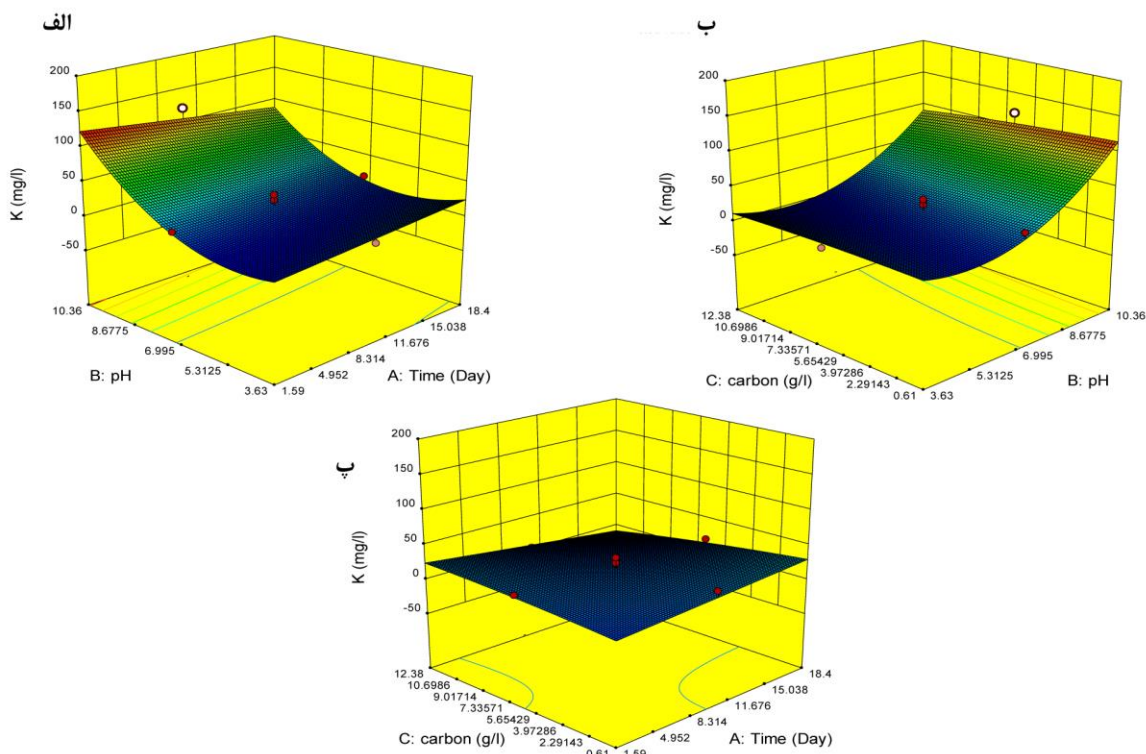
در سطوح مرکزی متغیرهای مستقل، میزان رهاسازی پتاسیم در حضور فلوگوپیت ۲/۴۴ برابر بیشتر از فلدسپار بود (شکل‌های ۲ و ۳). فلوگوپیت بعنوان میکای تری‌اکتاهدرال از ساختمان ضعیفی برخوردار



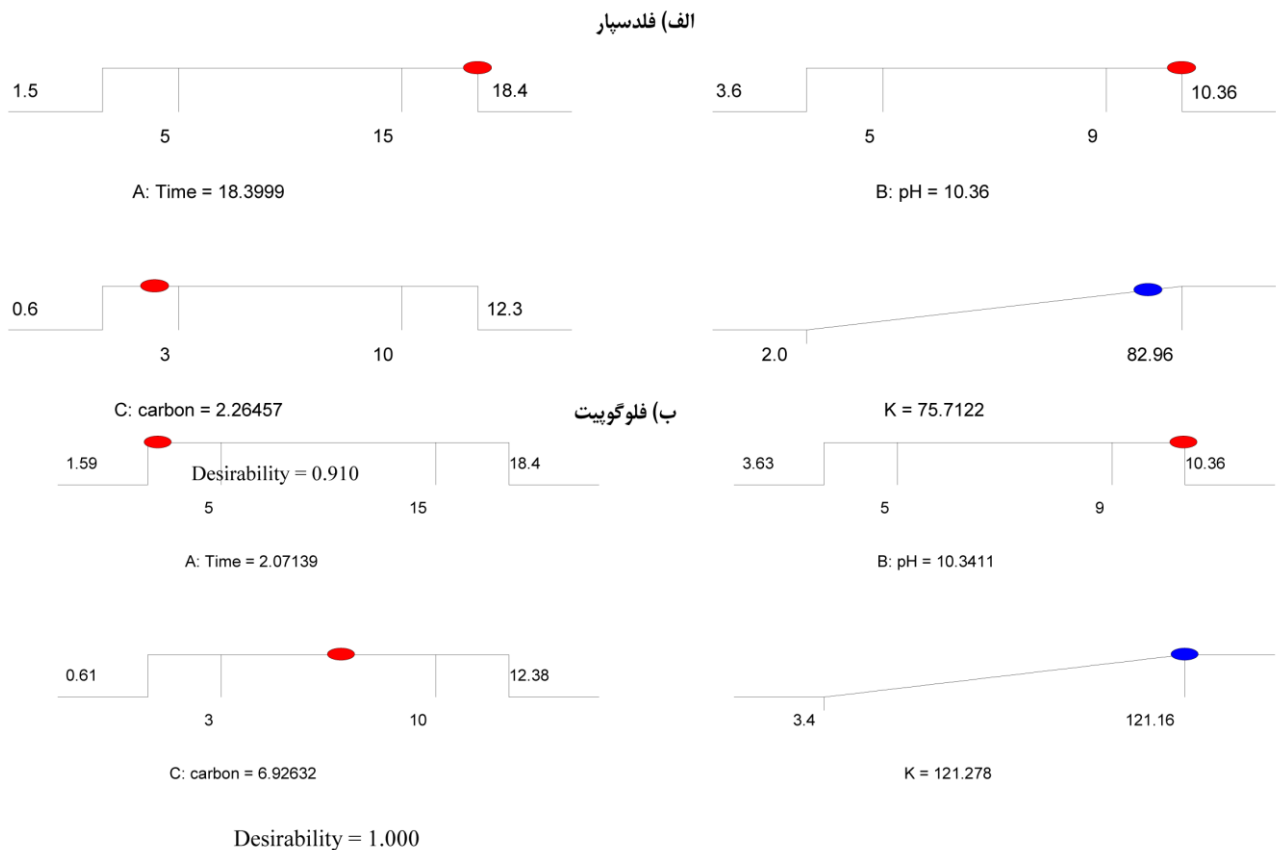
شکل ۱- غلظت‌های اندازه‌گیری شده و پیش‌بینی شده پتاسیم آزادشده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی
Figure 1- Measured and predicted concentration of released potassium by central composite design model



شکل ۲- نمایش سه بعدی تغییرات مقدار پتاسیم رها شده در حضور فلدسپار در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی
Figure 2- 3 dimensional present of released K in presence of feldspar against central composite design variables



شکل ۳- نمایش سه بعدی تغییرات مقدار پتاسیم رها شده در حضور فلوگوپیت در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی
Figure 3- 3 dimension present of released K in presence of phlogopite against central composite design variables



شکل ۴- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل برای کسب بیشینه غلظت پتاسیم محلول

Figure 4- Optimization of input parameters of the model for obtaining maximum soluble potassium concentration

به ترتیب به عنوان شرایط بهینه برای دست‌یابی به بیشینه آزادسازی پتاسیم از فلدسپار و فلوگوپیت در محیط کشت پیش‌بینی شد (شکل ۴).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش شرایط محیط کشت باکتری سودوموناس فلورسنتس از نظر pH، منبع کربن و مدت زمان انکوباسیون، برای نیل به بیشینه انحلال پتاسیم از منابع فلدسپار و فلوگوپیت توسط *Pseudomonas fluorescens* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحلیل حساسیت مدل طرح مرکب مرکزی بیانگر اهمیت بیشتر pH محیط بر انحلال پتاسیم بود. به‌طور کلی افزایش pH محیط و افزایش مقدار ساکاروز سبب افزایش پتاسیم محلول در محیط شد. در رابطه با اثر زمان انکوباسیون نیز نتایج نشان داد که هر چند در زمان‌های میانی از میزان پتاسیم محلول کاسته می‌شود اما با گذشت مدت زمان بیشتر و در زمان‌های بیش از ۱۰ روز مجدداً مقدار پتاسیم محلول افزایش می‌یابد. در این پژوهش حداکثر مقدار آزادسازی پتاسیم در $pH=10/36$ و زمان برابر با ۱۰ روز و مقدار ساکاروز معادل با ۶/۵ گرم در لیتر در

نتایج پژوهش بین (۸) نشان داد که میزان پتاسیم آزاد شده از فلدسپار و ایالات در اثر تلقیح باکتری در محیط کشت به ترتیب ۸ و ۱۶ درصد افزایش یافت. احتمال داده می‌شود واکنش‌هایی نظیر تولید اسید، تشکیل کمپلکس توسط پلی‌ساکاریدهای برون‌سولی و تغییر و تبدیلات آنزیمی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌ها دخیل باشند. برای مثال در مطالعه رهاسازی پتاسیم از فلدسپار و ایالات توسط باکتری-های حل‌کننده سیلیکات، لیان و همکاران (۱۸) یک مدل چند مرحله-ای پیشنهاد دادند که در مرحله اول کمپلکس باکتری-کانی به کمک پلی‌ساکاریدهای برون‌سولی تشکیل می‌شود در ادامه انحلال کانی و رهاسازی پتاسیم در محیط میکرو^۱ حاوی لیگاندهای آلی صورت می‌گیرد. تشکیل کمپلکس باکتری-کانی ممکن است با تسهیل اتصال سلول‌های میکروبی و کریستال‌های کانی منجر به افزایش گستره و زمان واکنش شود.

بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی pHهای ۱۰/۳۶ و ۱۰/۳۴، مقادیر ۲/۲۶ و ۶/۹۲ گرم در لیتر از ساکاروز و زمان‌های ۱۸ و ۲ روز

1- Microenvironment

اما توانایی این سویه‌ها در شرایط مزرعه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا، پیشنهاد می‌شود توانایی این باکتری‌ها، با در نظر گرفتن نوع خاک، نوع گیاه و فاکتورهای محیطی در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گیرد.

حضور فلوگوپیت مشاهده شد. کاربرد کانی‌های پتاسیمی موجود در خاک همراه با سویه‌های باکتریایی کارآمد به‌عنوان کود زیستی، برای جایگزینی کودهای شیمیایی و نیز کاهش هزینه‌های تولید محصول ضروری است. سویه‌های باکتریایی زیادی با قابلیت انحلال کانی‌ها و بهبود رشد گیاهان در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای یافت شده‌اند.

منابع

- 1- Aleksandrov V.G., Blagodyr R.N., and Ilev I.P. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiolohichnyĭ zhurnal* 29: 111-114.
- 2- Archana D.S. 2007. Studies on potassium solubilizing bacteria. Doctoral dissertation, UAS, Dharwad.
- 3- Ashrafi-Saeidlou S., Rasouli-Sadaghiani M.H., Asadzadeh F., and Barin M. 2016. Modeling Phosphate Solubilization by *Pseudomonas fluorescens* Using Response Surface Methodology. *Water and Soil Science* 4.2: 299-324. (In Persian with English abstract)
- 4- Ashrafi-Saeidlou S., Rasouli-Sadaghiani M.H., Asadzadeh F., and Barin M. 2017a. Quantitative Modeling of the Potassium Release from Feldspar by *Bacillus* sp. *Iranian Journal of Soil and Water Research* 1: 95-103. (In Persian with English abstract)
- 5- Ashrafi-Saeidlou S., and Rasouli-Sadaghiani M.H. 2017b. Potassium release kinetics from K-bearing minerals in presence of silicate-solubilizing microorganisms. *Iranian Journal of Soil and Water Research* 3: 639-649. (In Persian with English abstract)
- 6- Ashrafi-Saeidlou S., Rasouli-Sadaghiani M.H., Samadi A., Barin M., and Sepehr E. 2018. Evaluation of non-exchangeable potassium release from K-bearing minerals by different extractants. *Journal of Water and Soil* 31(6): 1740-1754. (In Persian with English abstract)
- 7- Avakyan Z.A., Belkanova N.P., Karavaiko G.I., and Piskunov V.P. 1985. Silicon compounds in solution bacteria quartz degradation. *Microbiology* 54(2): 250-256.
- 8- Bin L. 1998. A study on how silicate bacteria GY92 dissolves potassium from illite. *Acta Mineralogica Sinica* 2: 018.
- 9- Chapman H.D., and Pratt P.F. 1978. Methods of analysis for soils, plants and waters. p. 30-43. Division of Agricultural Sciences. University of California, Berkeley, USA.
- 10- Chen H., and Chen T. 1960. Characteristics of morphology and physiology and ability to weather mineral bearing phosphorus and potassium of silicate bacteria. *Microorganism* 3: 104-112.
- 11- Cunningham J.E., and Kuyack C. 1992. Production of citric acid and oxalic acid and solubilization calcium phosphate by *penicillium billai*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1451-1458.
- 12- Dordipour E., Farshadi-Raad A., and Arzanesh M. 2010. Effect of *Azotobacter chroococum* and *Azospirillum lipoferum* on the release of soil potassium in pot culture of soybean (*Glycine max* var. Williams) *Journal of Agroecology* 2: 593-599. (In Persian with English abstract)
- 13- Friedrich S., Platonova N.P., Karavaiko G.I., Stichel E., and Glombitza F. 1991. Chemical and microbiological solubilization of silicates. *Acta Biotechnologica* 11(3): 187-196.
- 14- Gangoliya S.S., Kishor G., and Singh N.D. 2015. Phytase production through response surface methodology and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* NF191. *Indian Journal of Experimental Biology* 53: 350-355.
- 15- Garrido-Vidal D., Pizarro C., and González-Sáiz J.M. 2003. Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology progress* 19(5): 1468-1479.
- 16- Hosseinpur A.R. 2004. Application of Kinetic Models in Describing Non-exchangeable Potassium Release in Some Soils of Hamadan. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8: 3.85-94. (In Persian)
- 17- Illmer P., and Schinner F. 1992. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 389-395.
- 18- Lian B., Fu P.Q., Mo D.M., and Liu C.Q. 2002. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica* 22(2): 179-183.
- 19- Lian B., Wang B., Pan M., Liu C., and Teng H.H. 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72(1): 87-98.
- 20- 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(1-2): 133-140.
- 21- 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.
- 22- Malakouti M.J., Shahabi A., and Bazargan K. 2006. Potassium in Iran agriculture. Sana publication, Tehran, Iran.

(In Persian)

- 23- Mao J., Kwak I., Sathishkumar M., Sneha K., and Yun Y.S. 2011. Preparation of PEI-coated bacterial biosorbent in water solution: optimization of manufacturing conditions using response surface methodology. *Bioresource Technology* 102: 1462–1467.
- 24- Meena V.S., Maurya B.R., Verma J.P., Aeron A., Kumar A., Kim K., and Bajpai V.K. 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering* 81: 340-347.
- 25- Mousavi A., Khiamim F., and Shariatmadari H. 2015. The kinetics of potassium release from K-feldspar, compared with muscovite under the influence of different extractants. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources* 67: 229-240. (In Persian with English abstract)
- 26- Padmavathi T. 2015. Optimization of phosphate solubilization by *Aspergillus niger* using plackett-burman and response surface methodology. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(3): 781-793.
- 27- Prasad M.P. 2014. Optimization of fermentation conditions of phosphate solubilizing bacteria- a potential bio fertilizer. *Merit Research Journal of Microbiology and Biological Sciences* 2(2): 031-035.
- 28- Sarikhani M.R., Oustan S., Ebrahimi M., and Aliasgharzad N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. *European Journal of Soil Science* 69: 1078–1086.
- 29- Shahab S., and Ahmed N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. *African Journal of Biotechnology* 7 (10): 1543-1549.
- 30- Sharmila M., Ramanand K., and Sethunathan N. 1989. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 1105-1110.
- 31- Sheng X.F., and Huang W.Y. 2002. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria. *Scientia Agricola* 35: 673-677.
- 32- 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.
- 33- Sparks D. L. 1989. *Kinetics of Soil Chemical Processes*. Academic Press, Sandiego, CA.
- 34- Štyriaková I., Štyriak I., Nandakumar M.P., and Mattiasson B. 2003. Bacterial destruction of mica during bioleaching of kaolin and quartz sands by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6): 583-590.
- 35- Swetha S., Varma A., and Padmavathi T. 2014. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, α-amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. *Biotechnology* 4: 439–445.
- 36- Tisdale S.L., Nelson W.L., Beaton J.D., and Havlin J.L. 2003. *Soil Fertility and Fertilizers*. Prentice-Hall of India, New Delhi, India.
- 37- Ullman W.J. Kirchman D.L. Welch S.A., and Vandevivere P. 1996. Laboratory evidence for microbioally mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* 132(1): 11-17.
- 38- Whitelaw M.A. 2007. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: 99-151.

Optimization of Potassium Dissolution by *Pseudomonas fluorescens* Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology

S. Ashrafi-Saeidlou¹ - A. Samadi² - MH. Rasouli-Sadaghiani^{3*} - M. Barin⁴ - E. Sepehr⁵

Received: 20-04-2019

Accepted: 10-07-2019

Introduction: Among the elements, potassium (K) is the third important macronutrient for plant nutrition that plays a significant role in plant growth and development. The development of intensively managed agriculture has led to the consumption of increasing amounts of K, low K supply has therefore become an important yield-limiting factor in agriculture. However, more than 98% of potassium in the soil exists in the form of silicate minerals such as illite and lattice K in K-feldspars which K cannot be directly absorbed by plants. Potassium and other minerals can be released when these minerals are weathered. Some microorganisms can play a role in releasing K from minerals. They solubilize K-bearing minerals through different mechanisms including chelation, acidolysis, pH reduction, exchange reaction, complexation, biofilm formation and secretion of organic acid and polysaccharides. Since the use of potassium solubilizing microorganisms (KSMs) as K-biofertilizers reduces the agrochemicals application and supports eco-friendly agriculture, so it is imperative to isolate the KSMs and optimize various growth parameters so as to improve their activity.

Materials and Methods: The present study was an attempt to model and evaluate the effects of pH, incubation time and different amounts of carbon source on K release by *Pseudomonas fluorescens* using Plackett-Burman design and response surface methodology with a central composite design. At the first step, 12 experiments based on Plackett-Burman design were carried out to screen and identify the effective carbon source in potassium release. According to the results of the first step, response surface methodology with the central composite design was employed to evaluate and model the effects of the coded independent variables including pH (3-10), incubation time (1-18 days) and carbon source (0.6-12 g L⁻¹) on K release from feldspar and phlogopite. After the completion of each period, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and filtered using Whatman paper (No. 41). Potassium concentration of samples was measured by flame photometer. Used minerals in the experiment including feldspar and phlogopite were grounded and filtered through a 230 mesh sieve. In order to remove exchangeable K, the samples were saturated by calcium chloride solution (with a ratio of 2:1), after washing with HCl, samples were then dried at 105°C for 48 hours.

Results: Results showed that there was no difference between carbon sources, applied at the first step of the experiment, so each can be employed as alternatives to each other in the culture medium. The central composite design showed R² of 0.944 and 0.918 with RMSE of 0.82 and 1.47 for predicting K release of feldspar and phlogopite, respectively, indicating high efficiency. Sensitivity analysis of the central composite design revealed that the pH is the most important factor in K release. The highest concentration of the K was observed at the highest levels of pH. Incubation time also had an impact on potassium release. In the early stages of the incubation time, the trend of potassium release was increasing, in middle stages, K amount decreased but it was accelerated over long times of incubation. The maximum potassium release in presence of phlogopite and feldspar was 121.16 and 96/82 mg L⁻¹, respectively, which was observed at pH= 10.36, sucrose amount= 6.5 g L⁻¹ during 10 days. Potassium amount in this treatment hence increased by 31.52% as compared to feldspar. According to central composite design, maximum potassium release of feldspar and phlogopite was obtained at pH= 10.36 and 10.34, sucrose concentrations of 2.26 and 6.92 g L⁻¹ at 18 and 2 days, respectively.

Conclusion: Our results showed that pH had a significant impact on K release by *Pseudomonas fluorescens* using response surface methodology. Overall, increasing incubation time along with high pH leads to the high amounts of K release from minerals. Different minerals released different content of potassium. Application of soil K-bearing minerals in combination with efficient potassium solubilizing bacterial strains as biofertilizers is required to replace chemical fertilizers and reduce the crop cultivation cost. Many bacterial strains have been

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

(*- Corresponding Author Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)

found to solubilize minerals and improve plant growth under laboratory and greenhouse conditions, but their ability under field conditions remains unexplored. The capability of these bacteria, considering the soil and plant type, and environmental factors, should be thus evaluated under field conditions.

Keywords: Aleksandrov medium, Central composite design, K-bearing minerals, Potassium solubilizing bacteria