



نشریه علمی

زیست شناسی خاک

شاپا: ۲۳۴۵-۲۵۳۶

جلد ۱۰ شماره ۲ سال ۱۴۰۱

صفحه	فهرست	عنوان
۱۱۱	اثرات نانو/میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های نوشناخته بر محیط‌زیست و نقش جامعه میکروبی در تجزیه آنها	حیب اله نادیان قمشه
۱۳۵	باکتری‌های محرک رشد گیاه و کاربرد آنها در کشاورزی	حسین بشارتی
۱۶۳	جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های ایران و بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی در آنها	لاله فریدیان، ژیلای بهارلوئی، علیرضا فلاح نصرت آباد و حسین کاری دولت آباد
۱۷۷	اثر کاربرد باکتری محرک رشد مولد بیوفیلیم و اسید آمینه تریپتوفان بر عملکرد و غلظت کادمیوم در اندام‌هوایی گیاه چاودار	اسماعیل کریمی، شکوفه محمدی و عزت‌اله اسفندیاری
۱۹۳	پیامد کاربرد پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر فراوانی و سوخت‌وساز باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین	زبیا نجف زاده نوبر و علی اکبر صفری سنجانی
۲۱۵	جداسازی باکتری‌های آزاد کننده فسفر در استخر پرورش ماهی با بکارگیری منابع مختلف فسفر نامحلول	واحد ارجمند، نعمت‌الله محمودی و علیرضا فلاح نصرت آباد
۲۲۹	اثر متابولیت‌های حاصل از تجزیه میکروبی پر مرغ بر رشد کاهو	لیلی احمدی، کاظم خاوازی، ژیلای بهارلوئی و محمدحسین داودی

نشریه علمی

زیست‌شناسی خاک

جلد 10 شماره (2)

1401

صاحب امتیاز: مؤسسه تحقیقات خاک و آب

تأییدیه درجه علمی

به استناد نامه شماره 3/18/77610 مورخ 1394/4/23 اعتبار علمی نشریه زیست‌شناسی خاک تمدید شده است

مدیر مسؤول: دکتر منوچهر گرجی
سر دبیر: دکتر هادی اسدی رحمانی
رئیس انجمن علوم خاک ایران و استاد دانشگاه تهران
استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب

اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر هادی اسدی رحمانی	استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب
دکتر حسین بشارتی	استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب
دکتر عبدالحسین ضیائی‌ان	دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس
دکتر حسینعلی علیخانی	استاد دانشگاه تهران
دکتر ناصرعلی اصغرزاد	استاد دانشگاه تبریز
دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد	دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب
دکتر احمد گلچین	استاد دانشگاه زنجان
دکتر امیر لکزیان	استاد دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر حبیب اله نادیان قمشه	استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین اهواز
دکتر فرشید نوربخش	استاد دانشگاه صنعتی اصفهان

دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد
دکتر امیر لکزیان
کبری علی نژاد
دو شماره

مدیر داخلی
ویراستار انگلیسی:
تایپ و صفحه آرایی
تعداد انتشار در سال

پایگاه الکترونیکی نشریه علمی زیست‌شناسی خاک: www.sbj.areeo.ir
پایگاه الکترونیکی انجمن علوم خاک ایران: www.soiliran.org
پایگاه الکترونیکی مؤسسه تحقیقات خاک و آب: www.swri.ir
آدرس الکترونیکی دفتر مجله: jsb.soilbiology@yahoo.com
این نشریه در پایگاه‌های علمی زیر نمایه می‌شود:
پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC): www.isc.gov.ir
پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی: www.sid.ir
پایگاه سیولیکا: www.civilica

- اثرات نانو/میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های نوشناخته بر محیط‌زیست و نقش جامعه میکروبی در تجزیه آنها 111
حبیب‌اله نادیان قمشه
- 135 باکتری‌های محرک رشد گیاه و کاربرد آنها در کشاورزی
حسین بشارتی
- جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های ایران و بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی در آنها 163
لاله فریدیان، ژیل‌ا بهارلوئی، علیرضا فلاح نصرت آباد و حسین کاری دولت آباد
- اثر کاربرد باکتری محرک رشد مولد بیوفیلم و اسید آمینه تربیتوفان بر عملکرد و غلظت کادمیوم در اندام‌هوایی گیاه چاودار 177
اسماعیل کریمی، شکوفه محمدی و عزت‌اله اسفندیاری
- پیامد کاربرد پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر فراوانی و سوخت‌وساز باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین 193
زیبا نجف زاده نویر و علی‌اکبر صفری سنجانی
- جداسازی باکتری‌های آزاد‌کننده فسفر در استخر پرورش ماهی با بکارگیری منابع مختلف فسفر نامحلول 215
واحد ارجمند، نعمت‌الله محمودی و علیرضا فلاح نصرت آباد
- 229 اثر متابولیت‌های حاصل از تجزیه میکروبی پر مرغ بر رشد کاهو
لیلی احمدی، کاظم خاوازی، ژیل‌ا بهارلوئی و محمدحسین داودی

راهنمای تهیه مقاله نشریه علمی زیست شناسی خاک

مجله زیست شناسی خاک اولین نشریه تخصصی رشته علوم خاک در ایران می باشد که مقالات پژوهشی مرتبط با تحقیقات صورت گرفته در کلیه جنبه های زیست شناسی خاک را چاپ می نماید. هدف از انتشار این مجله ارتقاء دانش اساتید، محققان و دانشجویان علاقمند این گرایش و شناخت هر چه عمیق تر از زیست شناسی خاک برای حفظ و بهره برداری پایدار از خاک می باشد. از اهم زمینه های فعالیت این نشریه می توان به نقش موجودات زنده خاک در چرخه عناصر غذایی و فرآیندهای زیستی مرتبط با بهبود ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و ارتقاء سطح حاصلخیزی خاک، تغذیه گیاه و افزایش عملکرد، مدل سازی مکانیسم ها و فرآیندهای زیستی مربوط به پویاسازی، معدنی شدن و آلی شدن عناصر غذایی، جایگاه موجودات زنده خاکری در ذخیره سازی و تغییر و تبدیلات مواد آلی خاک، تنوع زیستی و عملکردی بخش زنده خاک، آنزیم های خاک، روابط موجودات زنده خاک با یکدیگر و همچنین ریشه گیاهان و تبدلات مولکولی بین آنها، تشخیص، بیان و تبادل ژن در خاک، اثرات متقابل انواع آلودگی ها و بخش زنده خاک منجمله زیست پالایی خاک های آلوده، فرآیندهای زیستی خاک و نقش آنها در تولید و مصرف گازهای گلخانه ای، فناوری زیستی موجودات خاکری برای تولید انواع مایه تلقیح ها و کودهای زیستی، فعال کننده های تجزیه مواد آلی و پاک کننده های زیستی خاک های آلوده، استفاده از فناوری های مولکولی جدید برای شناسایی و همچنین ردیابی موجودات زنده در خاک و نقش آنها در پدیده های مختلف خاک اشاره کرد.

نکات مهم:

- 1- متن مقاله نباید در هیچ نشریه ای چاپ و یا همزمان به نشریه دیگری ارسال شده باشد.
 - 2- مسئولیت صحت و سقم کلیه مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسندگان می باشد.
 - 3- مسئولیت صحت و سقم ترتیب نام نویسندگان بر عهده شخصی است که مقاله را برای نشریه ارسال می کند.
 - 4- مقالات صرفاً می بایستی منتج از تحقیقات نویسنده یا نویسندگان و فقط در زمینه زیست شناسی خاک باشد.
- مقالات باید با استفاده از word 2007 و در محیط windows xp و با استفاده از قلم نازنین 14 تایپ شده باشند. نویسنده (گان) محترم می بایستی مقاله از طریق سایت نشریه www.iranjsb.ir ارسال نمایند. ذکر نام و نام خانوادگی نویسندگان، مرتبه علمی، آدرس پستی نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیک کلیه نویسندگان به صورت یک مقاله کامل در قسمت فایل های با نام و فایل بدون نام نویسندگان در فایل های بدون نام نویسنده، تکمیل و ارسال نسخه اصل تعهدنامه با امضاء خود نویسنده (گان) در فایل های پیشنهادی سایت الزامی است.

نحوه نگارش مقاله

- 1- مقاله حداکثر در 15 صفحه A4 با فاصله خطوط 1/5 و حاشیه های 3 سانتی متر از هر طرف و به صورت تک ستونی در نرم افزار Word 2007 تایپ شود.
- 2- نوع قلم فارسی و انگلیسی و اندازه آنها مطابق جدول زیر استفاده شود.
- 3- تمامی سطور در متن مقاله دارای شماره گذاری (Line numbering) باشد.
- 4- پیش از نقطه (.) و کاما (,) گذاشتن فاصله لازم نیست، لیکن پس از آنها، یک فاصله لازم است.
- 5- اصول نگارش زبان فارسی به طور کامل رعایت شده و حتی الامکان از به کار بردن اصطلاحات انگلیسی که معادل فارسی آنها در فرهنگستان زبان فارسی تعریف شده اند، پرهیز گردد.

- 6- برای ذکر جنس و گونه گیاه، جانور و یا میکروارگانیسم ها از حالت *ایتالیک* استفاده شود.
- 7- در صورت استفاده از واژه (های) مخفف باید در اولین استفاده، واژه مذکور تعریف و پس از آن واژه مخفف در مقاله استفاده گردد.
- 8- استفاده از پاورقی برای ارائه اطلاعات تکمیلی در مقاله بلامانع است. در صورت استفاده از پاورقی، باید به ترتیب شماره گذاری انجام گیرد.

جدول 1- نوع و اندازه قلم برای تهیه بخش های مختلف مقاله

موقعیت استفاده	نام قلم	اندازه قلم
عنوان مقاله	BNazanin پر رنگ	14
متن مقاله	BNazanin	12
عناوین بخش های مقاله	BNazanin پر رنگ	12
نام مؤلفان	BNazanin پر رنگ	12
کلمات کلیدی (Keywords)	BNazanin پر رنگ	12
عناوین جداول و اشکال	BNazanin پر رنگ	11
متن جداول و شکل ها و منابع	BNazanin	10 و یا 11 بر حسب نیاز
متن انگلیسی	Times New Roman	یک واحد کمتر از اندازه فارسی در هر موقعیت

ساختار مقاله

هر مقاله باید شامل برگ مشخصات، عنوان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی فارسی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، سپاسگزاری، منابع مورد استفاده، چکیده انگلیسی و واژه‌های کلیدی انگلیسی باشد.

برگ مشخصات مقاله: این قسمت در یک صفحه مجزا تهیه شده و شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده (گان) و شماره تماس نویسنده مسئول می‌باشد.

عنوان مقاله: عنوان مقاله حداکثر در 20 کلمه و منعکس کننده محتوای مقاله باشد. در زیر عنوان نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده (گان) ذکر گردد.

چکیده فارسی: چکیده مقاله در حداکثر 300 کلمه، بیانگر مسئله، هدف، روش و نتایج بدست آمده و نتیجه گیری کلی از پژوهش است. چکیده می‌بایستی ترجیحاً در یک پاراگراف تنظیم گردد. در زیر چکیده فارسی و در پاورقی آدرس پستی نویسنده مسئول ذکر گردد.

واژه‌های کلیدی:

واژه‌های کلیدی (Keywords) شامل حداقل 3 و حداکثر 6 کلمه مرتبط با پژوهش انجام شده باشد. این واژه‌ها می‌بایستی به گونه‌ای انتخاب گردد که در عنوان مقاله نبوده تا حداکثر استفاده از آنها برای تهیه فهرست موضوعی (index) امکان پذیر باشد. واژه‌های کلیدی بر اساس حروف الفبای فارسی مرتب شوند.

مقدمه

در این بخش بایستی موضوع پژوهش و فرضیه‌های موردنظر تعریف گردد. به مهم‌ترین تحقیقات صورت گرفته قبلی در داخل و خارج از ایران اشاره شود و سپس لزوم پژوهش موردنظر تشریح و با تأکید بر وجه تمایز این پژوهش با مطالعات قبلی مشخص شود.

مواد و روش‌ها

این قسمت شامل مواد مورد استفاده و شرح روش بکار رفته مانند جامعه آماری، روش‌های نمونه‌گیری، اندازه‌گیری‌ها و نحوه تجزیه و تحلیل آماری می‌باشد. برای روش‌های متداول و شناخته شده نیازی به ذکر جزئیات وجود نداشته و فقط به منبع مورد استفاده اشاره شود.

نتایج

در این بخش، نتایج بدست آمده از پژوهش به همراه جدول و شکل (اعم از تصویر یا نمودار) بیان می‌شود. از تکرار داده‌ها به صورت چندگانه (جدول، نمودار و غیره) پرهیز گردد. ارسال فایل Excel مربوط به نمودارها الزامی است. از کلماتی نظیر گراف، نقشه، تصویر و نظایر آن خودداری شده و تنها از واژه «شکل» استفاده شود. هر جدول از شماره، عنوان، سرستون‌ها و متن جدول تشکیل می‌شود. یک جدول باید با خطی افقی از شماره و عنوان جدول متمایز شود. همچنین سر جدول با یک خط افقی از متن جدول جدا و در زیر متن جدول نیز یک خط افقی رسم شود. عنوان جدول در بالای جدول درج و پس از کلمه جدول و شماره آن، خط تیره و سپس عنوان ذکر شود. در متن جدول تا جایی که ممکن است نباید از خطوط افقی و عمودی استفاده کرد. هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به کمیّت آن ستون باشد. اگر همه ارقام جدول دارای یک واحد مشترک باشند، آن واحد در عنوان اصلی جدول ذکر شود. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول به صورت زیرنویس ارائه شوند.

در نمودارها از نشانه‌های \blacktriangle \blacksquare \bullet \triangle \square \circ به صورت توپر و توخالی استفاده شود. برای درج عنوان هر شکل، پس از کلمه شکل و شماره آن، نقطه و سپس عنوان ذکر شود. اختصارات موجود در شکلها و جداول باید در زیرنویس توضیح داده شوند. تمام اعداد متن و توضیحات جداول و شکلها باید به زبان فارسی ارائه گردد. از ارسال نمودارهای رنگی جداً اجتناب نموده و از رنگهای سفید، سیاه و هاشورهای کاملاً متفاوت استفاده شود.. تمامی جداول و اشکال باید به ترتیب شماره در مقاله آورده شوند و شماره مذکور نیز باید به همان ترتیب در متن مقاله مورد اشاره قرار گیرد.

بحث

در این قسمت با استفاده از سایر منابع، یافته‌های پژوهش علت‌یابی شده و دلایل قبول و رد آنها مورد بحث قرار می‌گیرد. بنابراین قسمت عمده بررسی منابع در این قسمت مورد استناد قرار می‌گیرد. * در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را توأمأ تحت عنوان «نتایج و بحث» ارائه کرد.

نتیجه‌گیری

در این بخش نویسنده از پژوهش انجام یافته نتیجه‌گیری کرده و کاربرد عملی و یا تئوری حاصل از تحقیق را بیان می‌نماید. ارائه پیشنهادات در این بخش انتهائی نیز بلامانع است.

سپاسگزاری:

در این بخش نویسنده (گان) از اشخاص و سازمان‌هایی که در اجرای تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماید. این بخش در حداکثر 50 کلمه تنظیم گردد.

منابع مورد استفاده:

فهرست منابع باید شامل منابعی باشد که در متن ذکر شده و انتشار یافته‌اند و نیز شامل منابعی می‌شوند که برای چاپ پذیرفته شده‌اند. مکاتبات شخصی و یا تحقیقات چاپ نشده فقط در متن مقاله قابل ذکر می‌باشند. در مورد منابعی که بصورت آنلاین چاپ شده‌اند و فاقد شماره جلد و یا صفحه می‌باشند، ذکر شناسه دیجیتال (DOI) ضروری است.

شیوهٔ ارجاع به منابع علمی در تمام متن مقاله بایستی به صورتی باشد که منبع مورد ارجاع (چه فارسی و چه انگلیسی) در پایان جمله در داخل پرانتز به فارسی ارائه شود. برای منابع دارای دو نویسنده، نام هر دو نویسنده و منابعی که بیش از دو نویسنده دارند، نخست نام نفر اول و سپس "همکاران" و تاریخ بیان شود. مثال:

..... نتایج مشابهی توسط برخی پژوهشگران نیز گزارش شده است (کریمی و احمدی، 1389).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010؛ کریمی و احمدی، 1389).

برای منابعی که لزوماً در داخل پرانتز ارائه نمی‌شود بدین صورت عمل شود.

بای بردی و همکاران (1382) گزارش کردند...

اسمیت (2002) گزارش کرد ...

اسمیت و جونز (2002) گزارش کردند...

اسمیت و همکاران (2002) گزارش کردند...

فهرست منابع مورد استفاده در پایان متن به صورت پیوسته و به ترتیب منابع فارسی و انگلیسی ارائه شوند. منابع مورد استفاده به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نگارنده، (یا اولین نگارنده برای منابعی که بیش از یک نگارنده دارند) زیر هم آورده شوند. چنانچه از یک نگارنده چندین منبع ذکر شود، ترتیب درج آن‌ها بر حسب سال انتشار، از جدید به قدیم است. اگر از نگارنده‌ای چندین منبع همسال وجود داشته باشد، با گذاشتن حروف a، b و c پس از سال انتشار منابع از یکدیگر متمایز شوند. چنانچه مقالات منفرد و مشترک در یک سال از یک نگارنده ارائه شود، نخست مقالات منفرد و سپس مقاله‌های مشترک به ترتیب حروف الفبای نام نگارندگان بعدی مرتب شوند.

برای یک مقاله یا کتاب به ترتیب نام خانوادگی نگارنده (گان)، حرف اول اسم کوچک نگارنده (گان)، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، عنوان کامل مجله، شماره جلد، و اولین و آخرین صفحه مقاله ارائه شود. برای یک کتاب به ترتیب نام خانوادگی و سپس حرف اول نام کوچک نگارنده، تاریخ انتشار، عنوان کامل کتاب، نام ناشر، محل انتشار ارائه شود. در مورد مرجعی که نویسنده آن مشخص نیست به جای نام نگارنده از "Anonymous" برای منابع انگلیسی و (بی نام) برای منابع فارسی استفاده شود.

چنانچه منبع ترجمه شده باشد، در فهرست منابع باید نخست نام نویسنده (گان) کتاب اصلی، عنوان مشخصات آن (به زبان انگلیسی) و سپس نام مترجم (مترجمان) ذکر شود.

مثال‌هایی برای تنظیم منابع

- 1- مقاله از مجله
Brennan, E.W. and Lindsay, W.L. 1998. Reduction and oxidation effect on the solubility and transformation of iron oxides. Soil Science Society of America Journal 62:930–937.
- 2- مقاله از کارگاه آموزشی یا علمی
Hanbury, A. 2002. The taming of the hue, saturation and brightness colour Space, 7th Computer Vision Winter Workshop, February 2002, Bad Aussee, Austria.
- 3- مطلب از کتاب
Lindsay, W.L. 1979. Chemical equilibrium in soils. John Wiley & Sons, New York.
- 4- مطلب نقل شده یک نویسنده در یک مجموعه مقالات
Logsdon, S.D. and Laird, D.A. 2003. Ranges of bound water properties associated with a smectite clay. p. 101–108. In: Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substance. Proc. of Conf., Rotorua, New Zealand. 23–26 Mar. 2003. Industrial Research, Auckland, New Zealand.
- 5- ذکر مطلب از نویسنده ای در یک کتاب که نام ویراستاران روی جلد آن است
Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. p. 403–427. In: Page, A.L. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. No. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- 6- ذکر مطلب از اینترنت
Soil Survey Staff. 2004. NRCS soils [Online]. Available at <http://soils.usda.gov> [verified 23 Mar. 2005]. USDA-NRCS, Washington, DC.

چکیده انگلیسی

چکیده انگلیسی بایستی ترجمه دقیق چکیده فارسی باشد. واژه‌های کلیدی انگلیسی: باید ترجمه دقیق واژه‌های کلیدی فارسی باشد. واژه‌های کلیدی بر اساس حروف الفبای انگلیسی مرتب شوند و حرف اول کلمات به صورت بزرگ (کاپیتال) نوشته شود.

کلیه مقالات پس از دریافت توسط سردبیر بررسی و پس از تایید با راهنمای تهیه مقاله تطبیق و در صورت رعایت فرمت نشریه، مقاله برای داوری ارسال خواهد شد. پس از اتخاذ رأی داوران و تأیید گروه دبیران (هیأت تحریریه)، مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت. چنانچه مقاله ارسالی با راهنمای تهیه مقاله تطبیق نداشته باشد به نویسنده مسئول عودت داده خواهد شد و مجدداً از زمان برگشت، تاریخ رسید مقاله منظور و برای داوری ارسال خواهد شد.

فرم تعهد نامه

نشریه علمی زیست‌شناسی خاک

اینجانب نویسنده مسئول مقاله زیر:

موارد زیر را به آگاهی می‌رسانم:

1. کلیه تهیه کنندگان مقاله از ارسال آن به دفتر نشریه شما آگاهند
2. مقاله قبلاً در هیچ نشریه داخلی و خارجی منتشر نشده است
3. مقاله تا زمان پایان بررسی در آن نشریه به نشریه دیگری ارسال نخواهد شد.
4. هیچگونه تغییری در تعداد نویسندگان یا ترتیب ذکر اسامی انجام نخواهد شد.

نام خانوادگی نویسنده اول: امضاء نویسنده اول مقاله

نام خانوادگی نویسنده دوم: امضاء نویسنده دوم مقاله

نام خانوادگی نویسنده سوم: امضاء نویسنده سوم مقاله

نام خانوادگی نویسنده چهارم: امضاء نویسنده چهارم مقاله

3 مقاله	دکتر پیمان عباس زاده	1 مقاله	دکتر هادی اسدی رحمانی
1 مقاله	دکتر علیرضا فلاح	1 مقاله	دکتر حسین بشارتی
1 مقاله	دکتر فرشید نوربخش	1 مقاله	دکتر احمدی پوربابایی
		2 مقاله	دکتر وحید اله جهانزاده
		3 مقاله	دکتر هوشنگ خسروی
		1 مقاله	دکتر حسین کاری دولت آباد
		1 مقاله	دکتر لادن رضی
		1 مقاله	دکتر علی اشرف سلطانی
		1 مقاله	دکتر حسینعلی علیخانی
		1 مقاله	دکتر محسن علمایی

اثرات نانو/میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های ناشناخته بر محیط‌زیست و نقش جامعه میکروبی در تجزیه آنها

حبیب اله نادیان قمشه¹

استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان؛ nadian_habib@yahoo.com

ص 111 - 134

دریافت: 1401/4/18 و پذیرش: 1401/8/11

چکیده

انباشت فزاینده زباله‌های پلاستیکی یکی از چالش‌های اصلی زیست‌محیطی است که در حال حاضر جوامع بشری با آن مواجه هستند. سمیت زیست‌محیطی نانو/میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های ناشناخته یک تهدید دائمی برای زیست‌بوم‌های زمینی، دریایی و جوی می‌باشد. ذرات نانوپلاستیک به خوبی قادرند از غشاء سلولی عبور کرده و به درون سلول وارد شوند و کلیه اعمال حیاتی موجودات زنده از جمله انسان، گیاهان و ریزجانداران را مختل نمایند. نانو/میکروپلاستیک‌ها به دلیل مقاومت در برابر تجزیه به‌عنوان یک بحران جدی جهانی محسوب می‌شوند. لذا تاکنون تلاش‌های زیادی جهت حذف یا کاهش ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها، از طریق فناوری‌های زیستی که از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه و نیز سازگار با محیط‌زیست است صورت گرفته شده است. توانایی آنزیم‌های زیستی در کاتالیز نمودن پلی‌مرهای پلاستیک به‌عنوان یک جایگزین کارآمد و پایدار برای پالایش و بازیافت پلاستیک مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. انواع مختلفی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک از جامعه میکروبی تاکنون کشف شده است. با این وجود، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک به‌طور طبیعی برای تجزیه پلاستیک مصنوعی در کاربردهای صنعتی به دلیل پایداری حرارتی ضعیف و فعالیت کاتالیزوری کم مناسب نیستند. بنابراین، کاوش در محیط‌های گوناگون برای کشف آنزیم‌های جدید تجزیه‌کننده پلاستیک با ویژگی‌ها و عملکردهای مطلوب، به‌طور فزاینده مورد توجه قرار گرفته است. در رویکرد زیستی، تجزیه نانو/میکروپلاستیک‌ها، افزایش بازده دپلمیرزاسیون و بهینه‌سازی فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم‌های دخیل که به شیوه‌های گوناگون بررسی شده‌اند در این مقاله نیز مورد اشاره و بحث قرار می‌گیرند. علاوه بر این، تلاش‌های تحقیقاتی اخیر پیشرفت‌های قابل‌توجهی در کشف و مهندسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک داشته‌اند که نوید بزرگ در تصفیه پایدار پلاستیک از طریق تجزیه زیستی را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پالایش زیستی، تنش‌های اکسیداتیو، زیست‌بوم‌های خشکی و دریایی، مهندسی آنزیم،

نانو/میکروپلی‌مرهای پلاستیک

¹ نویسنده مسئول، آدرس: اهواز، ملاتانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان - دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

مقدمه

محیط‌زیست و جانوران به وجود آورده است. این ذرات با داشتن سطح ویژه زیاد و افزودنی‌های شیمیایی دارای اثرات سمی مستقیم و غیرمستقیم و حتی فوری بر روی انواع موجودات زنده می‌باشند. علاوه بر این، این ذرات قادرند به عنوان ناقل، سایر آلاینده‌ها و نیز میکروب‌های بیماری‌زا را به سهولت و از راه‌های گوناگون وارد محیط‌زیست و موجودات زنده نمایند (اکسو و همکاران، 2019). این ذرات همچنین می‌توانند به سهولت از طریق زنجیره غذایی و یا از طریق استنشاق هوا وارد بدن انسان شوند و صدمات جدی به کارکرد اندام‌های بدن وارد نمایند (ژ و همکاران، 2021؛ رهس و همکاران، 2016).

استفاده از روش‌های فیزیکی مثل فیلتراسیون جهت پالایش مکان‌های آلوده به نانو/میکروپلاستیک‌ها به دلایل پیچیدگی، ناسازگار بودن با محیط‌زیست و گران بودن کمتر مورد استقبال قرار گرفته‌اند (آرپیا و همکاران، 2021). لذا فناوری‌های زیستی که مقرون به صرفه، پایدار، کارآمد و دوستدار محیط‌زیست هستند مورد توجه قرار گرفته است. هر چند رویکردهای زیستی همانطور که خواهیم دید مشکلات و محدودیت‌های خاص خود را دارد. اساس تجزیه زیستی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها مبتنی بر هیدرولیز آنزیمی است. پلی‌مرهای پلاستیک در مقابل تجزیه بسیار مقاوم هستند. ویژگی‌های کلیدی ذرات پلاستیک شامل ماهیت آبریز بودن آنها، وزن ملکولی بالا و طول زنجیره پلیمری بلند باعث مقاومت آنها در برابر تجزیه زیستی می‌شوند (سریدهاران و همکاران، 2021). با وجود این، سرعت و میزان تجزیه زیستی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها به عوامل مختلفی نظیر میزان کارایی آنزیم‌های مترشحه و پایداری ساختاری آنها در گرمای بالا، میزان گرما دوست بودن میکروب‌های تجزیه کننده، نوع و ساختار نانو/میکروپلاستیک‌ها و همینطور به شرایط محیطی بستگی دارد. قارچی‌هایی مانند *Aspergillus niger* و باکتری‌هایی مانند *Pseudomonas* و *Vibrio* قادر به ایجاد کنسرسیومی هستند که تجزیه زیستی ذرات

پلی‌مرهای پلاستیک که به آنها آلاینده‌های سفید نیز گفته می‌شود به دلیل سبک بودن، ارزان گبودن، حمل و نقل ساده، دوام و قابلیت استفاده فراوان در بسیاری از مصارف توانسته است جایگزین موادی نظیر چوب، فلزات، سنگ‌ها و الیاف نخی و پشمی شوند. برآوردها حاکی از آن است که از 359 میلیون تن پلاستیک تولید شده در سال در سراسر جهان، 150 تا 200 میلیون تن در محل دفن زباله یا محیط طبیعی انباشته می‌شود (گی‌یر و همکاران، 2017). بیشتر پتروپلاستیک‌ها که مصرف فراوان دارند از نوع پلی‌اتیلن ترفتالات¹، پلی‌اتیلن²، پلی‌پروپیلن³، پلی‌استایرن⁴ و پلی‌ونیل کلراید⁵ می‌باشند (اوربانک و همکاران، 2018). پلی‌اتیلن ترفتالات، فراوان‌ترین پلاستیک مصرفی است که سالانه تقریباً 70 میلیون تن در سراسر جهان برای تهیه ظروف یکبار مصرف، بسته‌بندی و منسوجات تولید می‌شود. فرایند اصلی بازیافت PET که از طریق ابزارهای ترمومکانیکی انجام می‌شود منجر به از دست دادن خواص مکانیکی آنها می‌شود (تورنیر و همکاران، 2020). لذا ترجیح داده می‌شود تا پلاستیک‌ها به جای بازیافت سنتز جدید شوند و بدین ترتیب انباشته شدن زباله‌های پلاستیک ادامه می‌یابد و به عنوان یک تهدید بزرگ زیست‌محیطی موجب نگرانی شدید شده است.

ذرات پلاستیکی با قطر کمتر از 5 میلی‌متر میکروپلاستیک‌ها و ذرات کوچکتر از 100 نانومتر به عنوان نانوپلاستیک‌ها تعریف می‌شوند. این ذرات ممکن است به تدریج در اثر تخریب و تجزیه و یا از طریق سنتز تولید شوند (تیواری و همکاران، 2020).

پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها به خصوص ذرات نانو به‌عنوان آلاینده‌های نوظهور تهدیدهای جدیدی را برای

1. Polyethylene terephthalate (PET)

2. Polyethylene (PE)

3. Polypropylene (PP)

4. Polystyrene (PS)

5. Polyvinyl chloride (PVC)

بالاتر از آن می‌باشد. این در حالی است که در این دما این آنزیم تحت اگرگاسیون سریع قرار می‌گیرد و غیرفعال می‌شود (شیرک و همکاران، 2018). بر این اساس، تلاش‌های فراوانی تاکنون صورت گرفته شده تا با استفاده از فناوری‌های پیشرفته توانایی کاتالیز آنزیم‌های دخیل در تجزیه زیستی نانو/میکروپلاستیک‌ها بهینه و افزایش یابد (تیواری و همکاران، 2020؛ تاها و همکاران، 2021). در واقع، تحقیقات گسترده در سطح مهندسی متابولومیک سیستم‌ها به عنوان یک استراتژی مهم که موفقیت میکروب‌های مهندسی شده با بهبود راندمان تجزیه پلاستیک را دنبال می‌کند مورد توجه قرار گرفته است (یانگ و همکاران، 2017).

در این مقاله مروری تحلیلی، حضور ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها در زیست‌بوم‌های خشکی و آبی به‌همراه اثرات آنها بر جوامع زیستی آنها ارائه می‌شود. علاوه بر این، اهمیت رویکردهای مختلف مطالعات اخیر در پالایش زیستی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها با تاکید بر موفقیت‌های بدست آمده، چالش‌ها و تنگناهای موجود مورد بحث و تفسیر قرار می‌گیرد.

پراکندگی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها در محیط زیست

پلی‌مرهای پتروپلاستیک در شکل و انواع ترکیبات مختلف وارد سیستم‌های طبیعی شده و تحت تجزیه شیمیایی و مکانیکی (اکسیداتیو و حرارتی) و زیستی قرار می‌گیرند که طی آن به تدریج و پیوسته پلیمرهای حجیم به ذرات نانو/میکروپلاستیک تبدیل می‌شوند. این ذرات در تمام زیست‌بوم‌ها پراکنده هستند و می‌توانند به تمام اجزاء زنده از پلانکتون‌ها و انواع آبزیان گرفته تا سایر جانداران ریز و درشت خشکی وارد شوند. اولین بار آلودگی‌های ناشی از پلی‌مرهای پلاستیکی که در زیست‌بوم‌های خشکی تولید می‌شوند در محیط‌های دریایی و اقیانوس‌ها مشاهده گردیدند. به‌همین دلیل بیشتر مطالعات انجام شده در خصوص نانو/میکروپلاستیک‌ها در زیست‌بوم‌های دریایی متمرکز شده است. گزارش شده است که در بیش از 690 گونه دریایی پلی‌مرهای پلاستیکی مشاهده شده

پلاستیکی را با سازوکارهای مختلف نظیر سنتروفی¹ بهبود می‌بخشند.

برای تشدید تجزیه زیستی ذرات پلاستیک، اخیراً روش‌های پیشرفته مختلفی مانند تجزیه از طریق واکنش‌های آنزیمی (پری‌یا و همکاران، 2021) با استفاده از ابزارها و فناوری‌های مولکولی پیشرفته (پرویت و همکاران، 2020؛ سودهاکار و همکاران، 2007) و دیگر رویکردها که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بازسازی به کمک بیوراکتور غشایی (پوریو و همکاران، 2019)، اصلاح مبتنی بر نانوفناوری (یوهیدا و همکاران، 2021) و غیره نیز به کار گرفته می‌شوند. در واقع جامعه بسیار متنوع میکروبی در زیست‌بوم‌های آبی و خشکی قادرند پلی‌مرهای پلاستیک را به‌عنوان منبع کربن مورد هیدرولیز آنزیمی قرار داده و ضمن تأمین انرژی و افزایش زیست‌توده این آلاینده‌ها را به واحدهای اولیه خود تبدیل نموده و به این ترتیب اثرات سمی آنها را از بین ببرند. بیشتر آنزیم‌های دخیل در این تجزیه زیستی شامل کوتینازها²، لیپازها³، کربوکسیل‌استرازها⁴، تاناز⁵، پلی‌اتیلن ترفتالات هیدرولاز⁶، هیدرولاز⁶ و مونو (2-هیدروکسی‌اتیل ترفتالات هیدرولاز⁷ هیدرولاز⁷ می‌باشند (اسکاریچان و همکاران، 2022). افزایش دما یک ابزار کلیدی در تسریع تجزیه زیستی پلی‌مرهای پلاستیک محسوب می‌شود. از طرف دیگر، افزایش دما سبب ناپایداری در ساختار آنزیم‌های هیدرولیتیک و غیرفعال شدن آنها می‌شود. آنزیم‌ها در دمای بالا به درجات متفاوت دچار انعقاد یا اگرگاسیون⁸ شده و فعالیت آنها متوقف و یا به شدت کاهش می‌یابد. به عنوان مثال، هیدرولیز کارآمد پلی‌اتیلن ترفتالات مستلزم فعال شدن آنزیم کوتیناز در دمای 70 درجه سانتی‌گراد یا

1. Syntrophy

2. Cutinases

3. Lipases

4. Carboxyesterases

5. Tannase

6. Polyethylene terephthalate hydrolase (PETase)

7. Mono(2-hydroxyethyl terephthalate hydrolase

(METase)

8. Aggregation

پلی‌استایرن بر ریزجلبک‌های *Chlamydomonas reinhardtii* و دیاتوم‌های سایکروفیل (*Chetoceros neogracile*) منجر به کاهش میزان رشد، کلروفیل a، فعالیت فتوسنتزی، پروتئین محلول و مواد پلی‌مری برون‌سلولی به علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژن شده است (لای و ژو، 2020؛ گونزالز-فرناندز، 2019). به‌طور مشابه، زمانی که ریزجلبک *Chlorella pyrenoidosa* تحت تأثیر میکروپلی‌ونیل کلراید قرار گرفت میزان کلروفیل a و فعالیت فتوسنتزی کاهش زیادی پیدا نمود (ژائو و همکاران، 2019). بر خلاف این نتایج، اسجلوما و همکاران (2015) مشاهده نمودند هنگامی که ریزجلبک *Dunaliella tertiolecata* در معرض ذرات میکروپلی‌استایرن به مدت 72 ساعت قرار داشت میزان رشد و فتوسنتز کاهش نیافت. نتایج متناقض می‌تواند مربوط به پاسخ متفاوت ریزجلبک به نوع پلیمر پلاستیک، شرایط متفاوت آزمایش و نیز طول مدت در معرض قرار گرفتن باشد.

تأثیر نانو/میکروپلاستیک‌ها بر گیاهان آبی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. اکثر مطالعات نشان داده‌اند که نانو/میکروپلاستیک‌ها یک اثر بازدارنده بر محتوای رنگدانه فتوسنتزی فتوتوتروف‌های آبی دارند (ژو و همکاران، 2019). تأثیر نانو/میکروپلاستیک‌ها بر محتوای رنگدانه فتوسنتزی ممکن است تحت تأثیر تفاوت گونه‌ها، اندازه ذرات، نوع و غلظت نانو/میکروپلاستیک‌ها باشد (زنگ و همکاران، 2016؛ لانگ و همکاران، 2017).

اثر نانو/میکروپلاستیک‌ها بر خاک و جامعه میکروبی آن زیست‌بوم‌های خشکی به خصوص خاک‌های کشاورزی جزء مکان‌های مختلف انباشت پلی‌مرهای پلاستیک هستند. اخیراً گزارش شده است که میزان انباشت پلی‌مرهای پلاستیک در خاک‌ها از میزان انباشت آن در منابع آبی بیشتر شده است (فائو 2021). این آلاینده‌ها به عنوان میکروپلاستیک‌های ثانویه قادرند خصوصیات فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک را به طریق مستقیم و یا غیرمستقیم تغییر دهند. پلی‌مرهای پلاستیک بر

است (آسمونیت و آل‌مروت، 2019). زمین‌های کشاورزی از طریق استفاده از منابع مختلف نظیر لجن فاضلاب، استفاده از مواد پلاستیکی در عملیات مختلف کشاورزی، استفاده از مواد پوشاننده بذرها، استفاده از آب آبیاری میزان زیادی از ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها را دریافت می‌کنند (اکسو و همکاران، 2020).

اثر نانو/میکروپلاستیک‌ها بر ریزجانداران آبی

زیست‌بوم‌های آبی به‌عنوان عمده‌ترین بخش محیط‌زیست مخزن بزرگی را برای دریافت آلاینده‌ها از جمله پلی‌مرهای پلاستیک فراهم می‌سازند. این آلاینده‌ها قادر به ایجاد اثرات سمی و نامطلوب بر جانداران آبی و در نتیجه بر چرخه مواد غذایی می‌باشند. اثرات سمی نانو/میکروپلاستیک‌ها بر بیش از 90 درصد پلانکتون‌ها شامل فیتوپلانکتون‌ها (سیانوباکترها، انواع جلبک‌ها نظیر جلبک‌های سبز، جلبک‌های قهوه‌ای طلایی و دیاتوم‌ها) و زوپلانکتون‌ها نشان داده شده است (لای و ژو 2020؛ لارو و همکاران، 2021). اندازه ذرات پلاستیک بر روی میزان سمیت فیتوپلانکتون‌ها بسیار مهم است. به عنوان مثال اثرات سمی نانوذرات پلی‌استایرن، بر مولفه‌های رشدی ریزجلبک *Chlorella pyrenoidosa* در مقایسه با ذرات میکرو بسیار بیشتر است (لای و همکاران، 2019) نتایج مشابهی مبنی بر تأثیر منفی پلاستیک میکروپلی‌ونیل کلراید¹ بر رشد ریزجلبک *Karenia mikimotoi* گزارش شده است (ژو و همکاران، 2019). این ذرات بر فعالیت فیزیولوژیک و ترکیبات بیوشیمیایی فیتوپلانکتون‌ها نیز اثرات سمی زیادی دارند.

در واقع، نانوذرات پلی‌استایرن قادرند به سهولت از راه‌های مختلف نظیر کلاترین² و فاگوسیتوز³ درون لایه‌های لیپیدی غشاء سلولی نفوذ کنند. این ذرات نه تنها می‌توانند فعالیت‌های سلولی را مختل نمایند بلکه همچنین قادرند پیوستگی پروتئین‌های موجود در غشاء پلاسمایی را بهم بریزند (روسی و همکاران، 2014). تأثیر

¹ Polyvenil choride

² Clathrin

³ Phagocytosis

پلی‌مرهای پلاستیک نه تنها ترکیب و فراوانی قارچ‌های میکوریزا آربسکولار (ونگ و همکاران، 2020) و دیگر انواع ریزجاندران (لوزانو و همکاران، 2021) را تغییر می‌دهد بلکه قادرند بر قابلیت جذب و چرخه عناصر غذایی، اختلال در فرایندهای متابولیک، تشدید تنش‌ها و بطور کلی بر روابط زیستی خاک و گیاه اثرات قابل توجهی ایجاد نمایند (لای و همکاران، 2019).

نتایج کارهای گذشته در خصوص تأثیر پلی‌مرهای پلاستیک بر فراوانی و چرخه عناصر غذایی نشان می‌دهد زمانی که میکروپلاستیک‌های پلی‌ونیل کلراید و پلی‌لاکتیک اسید به یک خاک رسوبی اضافه گردید تغییر ترکیب جامعه و فعالیت‌های میکروبی خاک به گونه‌ای بود که فرایندهای نیتریفیکاسیون را مهار و محتوای نیتروژن موجود خاک را کاهش داد (سیلی و همکاران، 2020). نتایج مشابهی در کاهش نیتروژن آمونیومی خاک با کاربرد میکروپلاستیک پلی‌لاکتیک اسید نیز گزارش شده است (چن و همکاران، 2019a). این کاهش به حضور گروه‌های عاملی کربونیل (=O) و هیدروکسیل (-OH) پلی‌لاکتیک اسید نسبت داده شد که می‌تواند نیتروژن آمونیومی را در سطوح خود تثبیت و قابلیت جذب آن را کاهش دهند و یا مانع از اکسیداسیون زیستی آنها شوند. چرخه نیتروژن در خاک نیز ممکن است به طور غیرمستقیم تحت تأثیر آنزیم‌هایی باشد که ماده آلی خاک را هیدرولیز می‌کنند. مشتقات پلی‌استایرن و پلی‌اتیلن موجود در خاک می‌توانند با محدود کردن آنزیم‌های کلیدی مرتبط با نیتروژن مانند کیتیناز و لوسین آمینوپپتیداز¹ چرخه نیتروژن را مختل کنند (زنگ و همکاران، 2020). در خصوص تأثیر ذرات نانو میکروپلاستیک‌ها بر جذب عناصر غذایی خاک نتایج متناقضی گزارش شده است، به عنوان مثال بوسکر و همکاران (2019) گزارش نمودند که وجود پلی‌مرهای پلاستیک در خاک باعث کاهش شدید یا توقف جذب عناصر غذایی از خاک میشود، حال آنکه همان و

حسب نوع و میزان آنها و نیز ویژگیهای خاک تأثیر متفاوتی بر اندازه و ثبات خاکدانه‌های خاک دارند (دسوزا ماچادو و همکاران، 2018). تأثیر منفی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها بر جامعه میکروبی خاک نقش ارزنده آنها را در تشکیل خاکدانه‌ها کاهش می‌دهد. پلی‌مرهای پلاستیک نیز قادرند بسیاری از آلاینده‌های آلی نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و عناصر سنگین را جذب نمایند (ونگ و همکاران، 2019) و آلودگی‌های چند گانه و ترکیبی را ایجاد نمایند. نقش ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها بر فراوانی و تنوع قارچ‌های میکوریزا آربسکولار به‌خوبی مشخص نشده است و تنها مطالعات محدودی در این خصوص گزارش شده است. در یک مطالعه تأثیر میکروپلاستیک‌های پلی‌اتیلن و پلی‌لاکتیک اسید بر تنوع قارچ‌های میکوریزا آربسکولار گزارش گردید (ونگ و همکاران، 2020).

نتایج نشان داد که تأثیر منفی پلی‌لاکتیک اسید در مقایسه با پلی‌اتیلن بر جامعه قارچ‌های میکوریزا آربسکولار بسیار بیشتر بود. بر خلاف این نتایج، همان و همکاران (2020) مشاهده نمودند که همزیستی گیاه پیاز (آلیوم سپا) و قارچ میکوریزا آربسکولار (مخلوطی از *Funneliformis mosseae*، *Funneliformis caledonium* و *Rhizophagus irregularis*) با حضور میکروپلاستیک پلی‌استر باعث افزایش رشد ریشه، فعالیت میکروبی و کلونیزاسیون قارچی با هیف‌ها، کویل‌ها (هیف‌های پیچ‌خورده) و آربوسکول‌ها گردید. آنها دلیل این افزایش را غیرمستقیم و ناشی از بهبود خصوصیات خاک نظیر دانه‌بندی و افزایش ظرفیت نگهداری آب خاک بر ساختار ریشه گیاه دانستند. این دلایل توسط لیهیت و همکاران (2021) نیز مورد تأیید قرار گرفت. تأثیر تنش‌های محیطی می‌تواند بر معماری و ساختار ریشه گیاه تأثیر زیادی ایجاد نماید که این خود سبب افزایش وابستگی گیاه به قارچ‌های میکوریزا آربسکولار و در نتیجه پاسخ رشد میکوریزایی گیاه را به دنبال خواهد داشت (نادیان و همکاران، 2013). به طور کلی، آلودگی ناشی از

¹ Leucine aminopeptidase

خود قرار دارند و مستندات کافی برای تأیید نهایی آنها وجود ندارد.

اثرذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها بر مولفه‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاهان

ذرات نانوپلاستیک بر خلاف ذرات میکروپلاستیک قادرند به سهولت از غشاء سلولی عبور و در اجزاء سلولی انباشته شوند (سون و همکاران، 2019؛ سان و همکاران، 2020). در یک مطالعه مشاهده شد که تنباکو (*Nicotiana tabacum*) ذرات پلی‌استایرن بیشتر از 100 نانومتر را نمی‌تواند جذب کند ولی ذرات بین 20 تا 40 نانومتر را به خوبی جذب می‌نماید (باندمن و همکاران، 2012). در تأیید این نتایج، لای و همکاران (2019) مشاهده نمودند که ذرات پلی‌استایرن نشان‌دار شده با فلورسن با اندازه 200 نانومتر در موسیژل کلاهک ریشه گیاه کاهو تجمع پیدا نمودند و با چشم غیرمسلح، به‌رنگ سبز تیره، قابل مشاهده بودند. این ذرات قادر بودند از طریق جریان آپوپلاستیک در فضای بین‌سلولی ریشه (فضای دونان) وارد شوند. در یک مطالعه دیگر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، وجود ذرات پلی‌استایرن در سیتوپلاسم سلول‌های پوست ریشه‌های پیاز رنگ‌آمیزی شده مشاهده گردید. ارزیابی‌های سیتوژنتیکی در این مطالعه نشان داد که تنش‌های اکسیداتیو ناشی از ذرات پلی‌استایرن سبب کاهش شدید رشد ریشه پیاز گردید. این کاهش رشد ناشی از اختلالات میتوزی و تأخیر در حرکت کروموزوم‌ها در مرحله آنافاز در سلول‌های مریستمی ریشه گیاه پیاز بود (گیورگتی و همکاران، 2020).

بر حسب اینکه بار الکتریکی سطحی نانوپلی‌مرهای پلاستیک مثبت و یا منفی باشد میزان جذب و ورود آن به سلول‌های ریشه گیاه و در نتیجه میزان صدمات ناشی از آن بر مولفه‌های رشدی و فیزیولوژیک گیاه متفاوت است. در این رابطه، سان و همکاران (2020) مشاهده نمودند زمانی که گیاه *Arabidopsis thaliana* (تالیانا) به مدت یک هفته در معرض دو نوع نانوذرات

همکاران، (2020) مشاهده نمودند که استفاده از میکروپلی‌استر در خاک به دلیل بهبود دانه‌بندی و افزایش ظرفیت نگهداری آب خاک منجر به افزایش جذب عناصر غذایی شد. بدون شک خصوصیات خاک، اندازه، نوع و میزان ذرات پلی‌مرهای پلاستیک و نوع گیاه در قابلیت جذب عناصر غذایی دخیل و می‌تواند نتایج متفاوتی را ایجاد کنند.

گزارشات متعددی مبنی بر تأثیر پلی‌مرهای پلاستیک بر جوامع میکروبی خاک و فعالیت‌های آنزیمی آنها وجود دارد. در این میان "نوع" پلی‌مر یک متغیر کلیدی در فراوانی و فعالیت میکروبی می‌باشد. استفاده از پلی‌مرهای پلی‌ونیل کلراید و پلی‌اتیلن در یک سیستم خاک-گندم سبب تغییر ترکیب جمعیت باکتری‌ها از گرم مثبت به گرم منفی و کاهش فعالیت آنزیم‌های بتا-گلوکزیداز¹ و اگرایلوسیداز² به میزان 16 تا 43 درصد گردید (زنگ و همکاران، 2020). افزودن پلی‌مرهای پلاستیک به خاک نه تنها از طریق واحدهای ساختمانی آنها بلکه از طریق مواد شیمیایی همراه (نظیر دی‌اکسین‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک پولی‌سیکلیک) که در فرایند ساخت پلاستیک به آنها افزوده می‌شوند بر جامعه زیستی خاک و زیستگاه آنها اثرات زیان‌بار وارد می‌کند (گو و همکاران، 2020).

در خصوص تأثیر نانو/میکروپلاستیک‌ها بر فراهمی و چرخه عناصر غذایی در خاک، تنها اطلاعات مختصری در مورد نیتروژن و کربن وجود دارد که به بعضی از آنها اشاره گردید. ما هنوز از تأثیر این آلاینده‌ها به خصوص نانو/پلاستیک‌ها بر فراهمی عناصر پرنیاز و کم‌نیاز گیاه در برهمکنش با جامعه میکروبی خاک بی‌اطلاع هستیم. برای درک بیشتر، نیاز است تا اثرات مستقیم و غیرمستقیم این آلاینده‌ها بر انواع ریزجانداران خاک به‌خصوص آندسته که در فراهمی عناصر غذایی نقش دارند مورد مطالعه قرار گیرند. در حال حاضر، به‌دلیل اطلاعات کم ما در این خصوص بسیاری از نتیجه‌گیری‌ها هنوز در مراحل اولیه

1. β -Glucosidase

2. Xylosidase

پلی‌استایرن و تترافلورواتیلن¹ به تنهایی و یا در ترکیب با آرسنیک 3 ظرفیتی قرار گرفت رشد ریشه و برگ‌ها با افزایش غلظت آنها به میزان قابل توجهی در تمام تیمارها کاهش یافت، ولی این کاهش با حضور آرسنیک کمتر بود (دانگ و همکاران، 2019). در واقع، جذب سطحی آرسنیک توسط میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن و تترافلورواتیلن باعث کاهش جذب آرسنیک توسط گیاه و کاهش غلظت آن در گیاه گردید. این در حالی بود که مصرف آرسنیک به‌تنهایی تأثیر منفی بیشتری بر گیاه برنج داشت (دانگ و همکاران، 2019). ذرات پلی‌استایرن شدت جذب سطحی فراوانی دارد و میتواند عناصر را به‌شدت جذب کنند. در واقع، وجود حلقه بنزنی در ساختار پلی‌استایرن باعث افزایش فاصله بین پلی‌مرهای مجاور می‌شود و این ورود عنصر به‌درون زنجیره پلی‌مری را تسهیل میکند (روچمن و همکاران، 2013). از این گذشته، میزان جذب سطحی عناصر سنگین تابعی از افزایش pH است. در مطالعات اخیر گزارش شده است که افزایش pH باعث افزایش شدت جذب مس، روی، کادمیم، سرب و کبالت در سطح پلی‌مرهای پلاستیک میشود (ژو و همکاران، 2021؛ گو و همکاران، 2020).

امروزه یکی از نگرانی‌ها در خصوص نانو/ میکروپلاستیک‌ها ورود آنها به زنجیره مواد غذایی و پیامدهای آنها بر سلامت جانداران می‌باشد. در یک مطالعه، وجود فراوان ذرات نانو/ میکروپلاستیک‌ها در مزارع سبزیجات اطراف شهر وهان چین و نگرانی از وجود آنها در این گیاهان گزارش شده است (چن و همکاران، 2019a). در یک مطالعه دیگر که در ایتالیا صورت گرفت وجود ذرات نانو/ میکروپلاستیک‌ها در هلو، سیب، هویج، برگ کاهو و کلم بروکلی جمع‌آوری شده از مراکز فروش این محصولات نیز گزارش شده است (رنزولا و همکاران، 2018).

پلی‌استایرن با بار سطحی منفی و مثبت قرار گرفت، مسیر جذب و انتقال نانوذرات کاملا متفاوت بود. اگر چه نانوذرات با بار سطحی مثبت (NH_2 -پلی‌استایرن) اثرات سوء شدیدتری بر مولفه‌های رشدی ریشه داشت (به‌سبب تجمع بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن) ولی جذب و ورود آنها به درون بافت‌های ریشه در مقایسه با نانوذرات با بار سطحی منفی (SO_3H -پلی‌استایرن) کمتر بود. در واقع، NH_2 -پلی‌استایرن، سبب تحریک ریشه گیاه و افزایش ترشحات ریشه‌ای می‌شود و این منجر به پایداری بیشتر NH_2 -پلی‌استایرن و در نتیجه ایجاد محدودیت در جذب آن توسط آرابیدوپسیس *تالیانا* می‌شود. نتایج مشابهی توسط فنگ و همکاران (2020) مبنی بر کاهش راندمان فتوسنتز 2 و تجمع بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن هنگامی که *Microcystis aeruginosa* (سیانوباکتر آبهای شیرین) در معرض NH_2 -پلی‌استایرن قرار گرفت گزارش شده است.

در مرحله آغازین و مهم چرخه رشد گیاه، جوانه‌زنی بذر ممکن است به دلیل تجمع ذرات نانو/ میکروپلاستیک در سطح بذر و خاصیت آبریز بودن پلی‌مرهای پلاستیک با اختلال مواجه شود (یوان و همکاران، 2019؛ بوسکر و همکاران، 2019). اثرات نامطلوب میکروپلاستیک‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در چچم پایدار (*Lolium perenne*) و شاهی یا تره‌تیزک (*sativum*)، نیز گزارش شده است (پیگناتلی و همکاران، 2021b؛ بوتس و همکاران، 2019).

برهمکنش پلی‌مرهای پلاستیکی و عناصر سنگین می‌تواند بر مولفه‌های رشدی گیاه اثرات سمی ایجاد نماید. به عنوان مثال، اثرات ترکیبی کادمیم با میکروپلاستیک‌های پلی‌اتیلن و پلی‌لاکتیک اسید سمیت بیشتری بر مولفه‌های رشدی گیاه ذرت و کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریزا آربسکولار داشتند (ونگ و همکاران، 2020). در یک مطالعه دیگر، زمانی که برنج در معرض غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک‌های

¹ Tetrafluoroethylene

تأثیر ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها بر برخی ترکیبات شیمیایی و فرایندهای فیزیولوژیک گیاه

ذرات نانو پلاستیک قادرند به بخش‌های مختلف سلول‌های گیاهی نظیر سیتوپلاسم، واکوئل، هسته و غشاهای واکوئلی و پلاسمایی وارد شده و اثرات زیان‌باری بر فرایندهای شیمیایی و فیزیولوژیک گیاه وارد نمایند. کاهش محتوای کلروفیل نسبی در برگ‌های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) در معرض پلی‌اتیلن با چگالی کم (منگ و همکاران، 2021) و در آرایید-وپسیس تالیانا در معرض پلی‌استایرن (سان و همکاران، 2020) گزارش شده است. به طور کلی سمیت نانو/میکروپلاستیک‌ها بر رشد گیاه و آسیب به فتوسنتز بیشتر به صورت دو سازوکار فیزیکی (اختلال و یا قطع جریان آب و عناصر غذایی) و یا شیمیایی (تولید گونه‌های فعال اکسیژن) ایجاد می‌شود. بدون شک مولفه‌های دیگری نظیر نوع و سن گیاه، همچنین نوع، غلظت و اندازه پلی‌مرهای پلاستیک و زمان در معرض قرار گرفتن بر میزان این سمیت دخیل هستند.

نوع گروه‌های عاملی پلی‌مرهای پلاستیک بر فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه نیز بسیار مهم است. به عنوان مثال، زمانی که گیاه آرایید-وپسیس تالیانا در معرض دو نوع نانوذرات پلی‌استایرن، یکی با گروه عاملی $(\text{PS}-\text{NH}_2)-\text{NH}_2$ و دیگری با گروه عاملی $(\text{PS}-\text{SO}_3\text{H})-\text{SO}_3\text{H}$ با غلظت 1 گرم بر کیلوگرم قرار گرفت میزان سنتز کلروفیل در تیمار $\text{PS}-\text{NH}_2$ متوقف گردید، اگر چه در تیمار نانوپلی‌استایرن با گروه عاملی $\text{SO}_3\text{H}-\text{SO}_3\text{H}$ سنتز کلروفیل مشابه تیمار شاهد بود (سان و همکاران، 2020).

این نشان می‌دهد که چگونه سازوکارهای بیوشیمیایی پیچیده و گاهی ناشناخته با دخالت آنزیم‌های مختلف قادرند بر این فرایندها تحت تنش‌های اکسیداتیو اثر گذار باشند. شاهی (تره‌تیزک) زمانی که در معرض غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌اتیلن تروفاتلات قرار گرفت سبب گردید تا نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در غلظت زیاد پلی‌اتیلن نامتعادل گردد که نشان دهنده کاهش بازده

فتوسنتزی است (پیگناتلی و همکاران، 2021a). به‌طور مشابه، در گیاه چچم چند ساله (*Lolium perenne*) در مواجهه با پلی‌مرهای پلی‌اتیلن با وزن ملکولی بالا و پلی‌لاکتیک اسید نیز نسبت کلروفیل a به کلروفیل b افزایش یافت (بوتس و همکاران، 2019). دیگر شاخص‌های فتوسنتزی مانند هدایت روزنه‌ای، سرعت فتوسنتز، میزان تعرق و میزان انتقال الکترون در برگ‌های کاهو و ذرت زمانی که در معرض پلی‌مرهای پلاستیک قرار گرفت کاهش قابل‌توجه پیدا نمود (رن و همکاران، 2021؛ گوآ و همکاران، 2019؛ پهلویان و گدیک، 2021). نقش ذرات نانوپلاستیک بر ژن‌های دخیل در فرایندهای فتوسنتزی به صورت تنظیم‌کاهشی¹ و در تنش‌های اکسیداتیو به صورت تنظیم‌افزایشی² تأیید شده است (اکسیا و همکاران، 2020؛ پهلویان و گدیک، 2021).

در یک مطالعه دیگر، برنج در معرض غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن و پلی‌تترافلورواتیلن به تنهایی و یا در ترکیب با آرسنیک 3 ظرفیتی قرار گرفت (دونگ و همکاران، 2019). نتایج نشان داد سرعت فتوسنتز برنج در تمام تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد کاهش قابل توجه یافت. کاهش محتوای کلروفیل مشاهده شده در این مطالعه عمدتاً ناشی از تغییر محتوای کلروفیل a است که تغییر نسبت کلروفیل a به کلروفیل b را به دنبال داشت. به طور کلی، دو عامل مسئول کنترل سرعت فتوسنتز هستند (فارکوهار و شارکی 1982)، یکی عوامل روزنه‌ای (به عنوان مثال، هدایت روزنه‌ای) و دیگری عوامل غیرروزنه‌ای (فرایندهای بیوشیمیایی فتوسنتز). در یک مطالعه که بر روی برنج انجام گرفت میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن و تترافلورواتیلن از طریق اختلالات روزنه‌ای کاهش سرعت فتوسنتز را سبب شدند، اگر چه کاهش سرعت فتوسنتز در برنج با افزایش آرسنیک از طریق تخریب کلروپلاست و کاهش فعالیت آنزیم رویسکو یا ریبولوز بیسفسفات کربوکسیلاز³ نیز

¹ Downregulation

² Upregulation

³ RuBisCO (Ribulose biphosphate carboxylase)

شاهد کاهش یافت. گونه‌های فعال اکسیژن شامل سوپر اکسید و پراکسید نیز افزایش یافتند که منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز گردید (لو و همکاران، 2021). در این مطالعه همچنین آنالیز نسخه‌برداری نشان داد که بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر پلی‌استایرن به شدت کاهش یافت. علاوه بر این، نانوذرات پلی‌استایرن توانست میزان ریزهسته‌ها (میکرونکلئوس‌ها) را در سلول‌های ریشه افزایش دهد (2/8 تا 4/89 برابر) که نشان دهنده سمیت ژنی می‌باشد (لو و همکاران، 2021). به طور کلی، روند افزایشی گونه‌های فعال اکسیژن در ریشه گیاهان بیشتر از برگ‌ها و اندام هوایی است، که نشان می‌دهد آسیب ناشی از نانو/میکروپلاستیک‌ها در ریشه بیشتر از برگ است (گاؤ و همکاران، 2019).

ماشین دفاعی ضد اکسایشی سلول قادر است گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از نانوذرات پلاستیک را در غلظت‌های کم از بین ببرد (جیانگ و همکاران، 2019). متابولیت‌های ضد اکسایشی شامل ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش آسیب آنها به مولکول‌های زیستی، سلول‌ها و بافت‌های فعال سنتز می‌شوند. بطور کلی می‌توان گفت که افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن و تغییر در غلظت و فعالیت متابولیت‌های ضد اکسایشی نشانگر اثرات سمی آلاینده‌هایی مانند نانو/میکروپلاستیک‌ها می‌باشد (دونگ و همکاران، 2019). ضد اکسایشی‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و متابولیت‌های غیر آنزیمی نظیر گلوتاتیون، فلاونوئیدها، اسید اسکوربیک نه تنها مواد اکسایشی را از بین می‌برند بلکه به عنوان حسگرهای کلیدی در وضعیت احیایی سلول نقش مهمی دارند (پیگناتلی و همکاران 2021b; ژو و همکاران، 2021; یو و همکاران، 2021).

گزارش شده است (دونگ و همکاران، 2019). رویسکو یک آنزیم کلیدی در فرایند فتوسنتز و جذب و تثبیت دی‌اکسید کربن است.

تنش‌های اکسیداتیو نانوذرات پلاستیک بر گیاه

موجودات زنده مقادیر زیادی گونه‌های فعال اکسیژن را به خصوص تحت تنش‌های محیطی تولید می‌کنند که به آن تنش‌های اکسیداتیو یا انفجار اکسیداتیو می‌گویند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر شامل پراکسید هیدروژن، سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن تک‌اتمی می‌باشند که در خلال احیای ناقص اکسیژن ملکولی تولید و افزایش می‌یابند. گونه‌های فعال اکسیژن در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشاء پلاسمایی، میتوکندری و کلروپلاست وجود دارند. این ترکیبات حد واسط، قادرند در بسیاری از فرایندهای حیاتی که در اجزاء سلولی صورت می‌گیرند اختلال ایجاد نمایند مانند اکسید نمودن پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA. نتایج بیوشیمیایی ریشه‌های گیاه پیاز در مواجهه با غلظت‌های 0/01، 0/10 و 1/0 گرم در لیتر نانوذرات پلی‌استایرن نشان داد که اکسایشی‌های پراکسید هیدروژن و تیوباربی‌توریک اسید به میزان قابل توجهی در بالاترین غلظت نانوذرات در سلول‌های اپیدرم و پوست ریشه افزایش می‌یابد. (گیورگتی و همکاران، 2020). در تأیید این نتایج، جیانگ و همکاران (2019) گزارش نمودند که استفاده از 100 میلی‌گرم نانوذرات پلی‌استایرن منجر به القا مالون‌دی‌الدهید ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد در گیاه باقلا گردید. مالون‌دی‌الدهید یک ترکیب آلی است و به عنوان یکی از نشانگرهای تنش اکسیداتیو شناخته شده است. القا تنش‌های اکسیداتیو توسط نانوذرات پلی‌استایرن توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (به عنوان مثال، دونگ و همکاران، 2019). علاوه بر این، در یک مطالعه ستیوژنیک، ریشه‌های گیاه باقلا به مدت 24، 48 و 72 ساعت در معرض نانوذرات پلی‌استایرن با قطر 10 نانومتر قرار گرفت. نتایج نشان داد که "شاخص میتوز" در ریشه در بالاترین غلظت پلی‌استایرن 16/8 درصد نسبت به

تجزیه زیستی نانو/میکروپلاستیک‌ها

تجمع آلاینده‌های نوظهور نانو/میکروپلاستیک‌ها در محیط زیست و اثرات زیان بار آنها نگرانی‌های فزاینده‌ای را ایجاد نموده است. لذا به منظور حفظ سلامت محیط‌زیست و پالایش زیست‌بوم‌های طبیعی از این آلاینده‌ها رویکردهای مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. همانطور که گفته شد در بین این رویکردها، تجزیه زیستی پلی‌مرهای پلاستیک در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی از امتیازات محیط‌زیستی فراوانی برخوردار هستند هر چند با محدودیت‌ها و مشکلاتی نیز همراه است. بنابراین طی سال‌های اخیر با توجه به تهدید اکولوژیک نانو/میکروپلاستیک‌ها، پژوهشگران جهت تجزیه این پتروپلی‌مرها بیشتر بر فناوری‌های زیستی متمرکز شده‌اند. جوامع میکروبی دخیل در این تجزیه بیشتر از *Aspergillus*، *Streptomyces*، *Streptomyces badius flavus*، *Ideonella* و *Pseudomonas aeruginosa setonii sakaiensis* می‌باشند (جیسوال و همکاران، 2019؛ یوآن و همکاران، 2020؛ کنوت و همکاران، 2020).

جامعه میکروبی جهت استفاده از کربن ذرات پلاستیک و کسب انرژی و افزایش زیست‌توده اقدام به تجزیه و دپلمریزاسیون این ذرات طی مراحل مختلف "تغییر ساختار فیزیکی و شیمیایی پلیمرها"¹، "تبدیل پلیمرهای کمپلکس‌تر به پلیمرهای ساده‌تر توسط ترشحات آنزیمی"²، "ترکیب سازی مولکول‌ها"³ و در مرحله نهایی "اکسیداسیون متابولیت‌ها"⁴ می‌کنند (یوآن و همکاران، 2020). در واقع، نانو/میکروپلاستیک‌ها توسط آنزیم‌های میکروبی و با سازوکاری که معمولاً متضمن هیدرولیز است، تجزیه می‌شوند. در تجزیه نانو/میکروپلاستیک‌ها دو سازوکار برون‌سلولی و درون‌سلولی در چهار چوب مراحل گفته شده در فوق شرکت دارند. در فرایند

درون‌سلولی، میکروپلاستیک‌ها بر سطوح نانو/میکروپلاستیک‌ها تجمع می‌یابند تا آنها را هیدرولیز و به واحدهای کوچکتر تبدیل نمایند. در فرایند برون‌سلولی، میکروپلاستیک‌ها با ترشح آنزیم‌های برون‌سلولی نظیر هیدرولازها این توانایی را دارند که مولکول‌های بسیار پیچیده را به واحدهای پلیمری خود تبدیل کنند (یوآن و همکاران، 2020؛ لیر و همکاران، 2021). در شرایط هوایی، مونومرهای تولیدی محلول در آب توسط سازوکار متابولیک میکروبی مانند اکسیداسیون و چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید منجر به تولید دی‌اکسید کربن و آب می‌شوند و در محیط‌های بی‌هوایی، متان نیز تولید می‌شود. چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید به عنوان یکی از مسیرهای متابولیکی اصلی برای تولید انرژی از بیشتر ترکیبات آلی عمل می‌کند. در این چرخه، استیل کوآنزیم‌آ به عنوان واسطه کلیدی عمل نموده و در فعالیت‌های سلولی مانند تشکیل دی‌اکسید کربن توسط اکسیداسیون، تشکیل استات، بیوسنتز و غیره مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد.

در بین مصنوعات پلاستیکی، PET بیشتر از همه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پلاستیک به دلیل ارزان بودن، وجود ویژگی‌های شیمیایی و مکانیکی خوب، فراوان‌ترین پلیمر مصرفی است و لذا به سبب وجود انباشت بیشتر و پیامدهای آن بر محیط‌زیست، مطالعات زیادی در خصوص تجزیه زیستی آن صورت گرفته شده است. PET ابتدا در صنایع پارچه (داکرون یا پلی‌استر) و پس از آن برای ساخت انواع پلاستیک‌های یک‌بار مصرف مورد استفاده قرار گرفته است (تانگچی و همکاران، 2019). امروزه PET در بسیاری از مصارف خانگی، پزشکی، آرایشی، کشاورزی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان تولید PET سالانه حدود 70 الی 80 میلیون تن در سراسر جهان گزارش شده است که 64 درصد کل پسماند پلاستیک در طبیعت را تشکیل می‌دهد (راگارت و همکاران، 2017؛ گراویل و همکاران، 2017).

با توجه به اینکه کمپوست، پساب‌ها، لجن فاضلاب و پسماندهای جامد شهری در زیست‌بوم‌های خشکی به

1. Biodeterioration
2. Biofragmentation
3. Assimilation
4. Mineralization

غربال شده بر اساس هیدرولیز پی‌نیتروفنیل بوتیرات¹ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بین این جدایه‌ها، جدایه PBURU-B5 که با انجام آزمون‌های ملکولی و مرفولوژیک به عنوان قارچ *Fusarium solani* شناخته شد بیشترین هیدرولیز پیوندهای استری الیاف PET را به خود اختصاص داد (نیمچوا و همکاران، 2008).

ساختار شیمیایی و کریستالی پلی‌مرهای پلاستیک به آن خاصیت آبریزی می‌دهد و این باعث مقاومت این پلی‌مرها در مقابل تجزیه زیستی می‌شوند. لذا پژوهش‌های زیادی به منظور کاهش این مقاومت در مقابل تجزیه انجام شده است. تشکیل بیوفیلم باعث کاهش خاصیت آبریزی پلی‌مرهای پلاستیک و تسهیل در تجزیه زیستی آنها می‌شود. ریزجاندران پروتئین‌هایی مانند کلاژن² و فیبرین³ را به عنوان یک پوشش تولید می‌کنند که به چسبندگی سلول به سلول و سلول به سطح در بیوفیلم کمک می‌کند (سیموس و همکاران، 2010؛ بریز و همکاران، 2006). توانایی جذب ریزجاندران به سطوح پلی‌مرهای پلاستیک و تشکیل بیوفیلم یک عامل مهم در تجزیه زیستی آنها محسوب می‌شود. در این رابطه، تشکیل بیوفیلم و افزایش سرعت تجزیه پلی‌اتیلن توسط *Pseudomonas sp* نشان داده شده است (ترییدی و سیل، 2013).

اور و همکاران (2004) گزارش نمودند که باکتری *Rhodococcus ruber* C208 با استفاده از روغن معدنی (آلکان‌های آلی تقطیر شده از نفت) توانستند از طریق افزایش کلونیزاسیون میکروبی روی سطح پلی‌اتیلن و افزایش پتانسیل بیوفیلم میزان تجزیه را تا 50 درصد تسریع نمایند. سیوان و همکاران (2006) نیز گزارش نمودند که باکتری‌های *Rhodococcus ruber* C208 موجود در سطح پلی‌اتیلن می‌تواند در هر هفته 0/86 درصد از این پلاستیک را تجزیه کنند. در یک مطالعه دیگر، روبرتس و همکاران (2020) میزان افزایش تجزیه

عنوان منابع عمده آلودگی نانو/میکروپلاستیک‌ها محسوب می‌شوند، لذا به منظور کاهش آلودگی این منابع مطالعاتی با رویکردهای آنزیمی، غشای زیستی و مولکولی پیشرفته انجام گرفته است. از مطالعات اولیه در خصوص تأثیر تجزیه زیستی بر پلی‌مرهای پلاستیک می‌توان به کار تحقیقی (آلبرتسون، 1978) اشاره نمود. در این مطالعه برای اولین بار، کربن پلی‌اتیلن، نشان‌دار (^{14}C) گردید و در معرض مخلوطی از سه گونه قارچ پوسیدگی چوب شامل: *Odontia* و *Peniophora gigantean*، *Fomes annosus* و *bicolor* قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان $^{14}\text{CO}_2$ آزاد شده ناشی از تجزیه میکروبی پلی‌اتیلن نشان‌دار (متوسط وزن ملکولی 300000 دالتون) در سال اول برابر با 0/26 درصد (وزنی) و در سال دوم برابر با 0/36 درصد (وزنی) پلی‌مر اضافه شده بود. وی در یک مطالعه دیگر (آلبرتسون و بنهیدی، 1980)، با کاهش وزن مولکولی پلی‌اتیلن نشان‌دار به 1000 دالتون (عصاره‌گیری با سیکلوهگزان) میزان تجزیه میکروبی را به 0/16 درصد وزنی کاهش داد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که میزان $^{14}\text{CO}_2$ آزاد شده ناشی از تجزیه میکروبی پلی‌اتیلن نشان‌دار به اجزاء با وزن ملکولی پایین موجود در پلی‌اتیلن مربوط می‌شود.

آنزیم‌های مختلف میکروبی مانند کوتینازها، استرازها، هیدرولازها و کربوکسی استرازها قادر به تغییر و یا تجزیه مواد پلاستیکی هستند. افزون بر این، اکسیژنازهای مختلف مانند مونواکسیژنازها و دی‌اکسیژنازها قادرند تغییرات آنزیمی پلاستیک را از طریق فرایند اکسیداسیون (اکسو و همکاران، 2020) و یا آنزیم‌های لیپاز هیدرولیز PET را از طریق بهبود خاصیت آبدوستی آن (هسیه و کرام، 1998) تسهیل کنند. نیمچوا و همکاران (2007) مشاهده نمودند که توانایی قارچ *Fusarium solani* در هیدرولیز PET نسبت به قارچ *Fusarium oxysproum* بیشتر بود. آنها در یک مطالعه دیگر، طیف وسیعی از قارچ‌ها را به منظور تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده PET جمع‌آوری و از نظر میزان فعالیت کوتیناز مورد غربال‌گری قرار دادند. در این مطالعه، توانایی تولید آنزیم کوتیناز در بین جدایه‌های

¹ p-Nitrophenyl butyrate

² Collagen

³ Fibrin

زیستی و تغییرات سطح پلاستیک پلی اتیلن ترفتالات توسط باکتری‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و به مدت 40 روز را با استفاده از میکروسکپ الکترونی نشان دادند. گزارش شده است که ژن *ompR* (تنظیم کننده سنتز پروتئین غشاء پلاسمایی) تشکیل بیوفیلم را تقویت می‌کند (پراکاش و همکاران 2003، اتول و همکاران 2000). تشکیل بیوفیلم یک رویداد بسیار تنظیم شده است و *algC* به عنوان یک ژن تولیدکننده آلزینات توانایی تشکیل بیوفیلم را تا چهار برابر افزایش می‌دهد و به طور مثبت توسط فاکتور سیگما تنظیم می‌شود (کوکار و همکاران، 2009). تعیین نوع ترشحات برون سلولی، درصد نسبی آنها و طول ماندگاری آنها در بیوفیلم برای انواع ریزجانداران دخیل در افزایش تجزیه پلی‌مرهای پلاستیک بسیار مهم و نیاز به تحقیقات جدید و بیشتر دارد. تعیین الگوی تشکیل بیوفیلم‌ها و توانایی جذب آنها به سطوح پلاستیک که می‌تواند متأثر از میزان منابع کربنی و نیتروژنی باشد، برای ریزجانداران مختلف با هدف دستیابی به انتخاب بهترین سویه‌های توانمند در تجزیه زیستی پلاستیک باید مورد توجه و پژوهش‌های بیشتر قرار گیرد.

استفاده از باکتری‌های ابرگرمدوست در تجزیه نانو/میکروپلاستیک‌ها

لجن فاضلاب که محصول جانبی تاسیسات تصفیه فاضلاب است دارای مقادیر زیادی از ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها می‌باشد. لذا استفاده از این پسماندها در مزارع کشاورزی و ورود نانو/میکروپلاستیک‌ها به خاک و نهایتاً به زنجیره غذایی یکی از نگرانی‌های زیست‌محیطی بشمار می‌آید. به‌همین منظور تهیه کمپوست لجن فاضلاب با استفاده از روش‌ها و فناوری‌هایی که قادر به کاهش و یا حذف این آلاینده‌ها باشند امروزه بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. به‌طور کلی، با افزایش دما در خلال فرایند کمپوستی‌شدن، باکتری‌های گرما دوست فعال می‌شوند و این در کارایی تجزیه زیستی پلی‌مرهای پلاستیک نقش مهمی را بازی

می‌کنند. در واقع، ترکیب و فراوانی جمعیت میکروبی تحت تأثیر نوع فناوری و روش بکار گرفته شده در تهیه کمپوست بسیار مهم است. به عنوان مثال، یو و همکاران (2018) در یک مطالعه 21 روزه، ترکیب جامعه میکروبی را در دو روش کمپوست‌سازی هایپرترموفیلیک¹ (ابرگرمدوست) و کمپوست‌سازی ترموفیلیک مرسوم² مقایسه نمودند. نتایج نشان داد که در کمپوست نمودن لجن فاضلاب مبتنی بر هایپرترموفیلیک، 35/5 تا 41/7 درصد از جمعیت باکتری‌ها متعلق به خانواده *Thermaceae* بود، اما در کمپوست‌سازی مبتنی بر ترموفیلیک مرسوم جمعیت غالب باکتری‌ها از خانواده *Thermoactinomycetaceae* و با فراوانی 29/9 الی 36/1 درصد بود. این تغییر جامعه میکروبی تحت تأثیر شرایط گرمایی در طول دوره کمپوستی شدن نشان دهنده مزایای فنی - اقتصادی کمپوست‌سازی هایپرترموفیلیک نسبت به ترموفیلیک مرسوم می‌باشد. چن و همکاران (2019b) بر مبنای نتایج فوق و به منظور مقایسه و تأثیر دو روش تهیه کمپوست‌سازی مبتنی بر هایپرترموفیلیک و ترموفیلیک بر میزان تجزیه زیستی میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن و حذف آنها، مطالعه‌ای را با رویکردی جدید به اجرا در آوردند.

نتایج آنها نشان داد که 43/7 درصد از میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن پس از 45 روز فعالیت باکتری‌های ابرگرمدوست از لجن حذف شدند که بیشترین درصدی است که تا زمان گزارش این نتایج توسط تجزیه زیستی در نانو/میکروپلاستیک‌ها ثبت شده است و یک رویکرد امیدوارکننده در تجزیه زیستی میکروپلاستیک‌ها و سایر مواد آلی محسوب می‌شود. در واقع، دمای زیاد کمپوست سازی مبتنی بر هایپرترموفیلیک افزایش توان تجزیه زیستی و در نتیجه افزایش کارایی، بهبود کیفیت و سلامت کمپوست را به دنبال دارد. افزون بر این، دمای زیاد کمپوست (حدود 80 درجه سانتی‌گراد) منجر به کاهش آب‌گریزی پلاستیک‌ها (از طریق حضور

¹ Hyperthermophilic

² Conditional thermophilic

پلی‌اتیلن با وزن ملکولی بالا و پلی‌پروپیلن، در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به ترتیب به میزان 58/2، 46/6 و 56/3 درصد از وزنشان کاسته شود. در استفاده از کنسرسیوم میکروبی می‌توان ترکیب میکروبی را به گونه‌ای تعیین و هدایت نمود تا با انجام سازوکارهای خاصی به بهبود و افزایش توان تجزیه زیستی منجر شود. به عنوان مثال سویه‌های قارچ *Aspergillus niger* و باکتری *sp. Pseudomonas* قادر به ایجاد کنسرسیومی بودند که توان تجزیه زیستی قطعات پلاستیکی را با سازوکار سنتروفی بهبود بخشیدند (اوگانباو و همکاران، 2019). درک بهتر از تأثیر جامعه میکروبی گرمادوست بر نانو/میکروپلاستیک‌ها در فرایند کمپوستی‌شدن برای توسعه تکنیک‌های بسیار کارآمد در حذف ذرات پلاستیک بسیار حیاتی است. بنابراین، شناخت فرایندهای دینامیک در ساختار و ترکیب جامعه میکروبی تحت تأثیر میزان دما در طول فرایند کمپوستی‌شدن، مدیریت تجزیه زیستی و حذف ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. گو (2020) در یک مقاله انتقادی، اکثر مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه زیستی پلی‌مرهای پلاستیک را مورد نقد و انتقاد قرار داده است. وی عقیده دارد اگرچه تجزیه زیستی پلاستیک‌ها مدتهاست که مورد توجه پژوهشگران می‌باشد ولی نتایج بسیاری از آنها نتوانسته‌اند به مسائل اساسی و کلیدی علمی بپردازند. او عنوان می‌نماید که در این مطالعات بسیاری از پژوهشگران شیمی پلیمر پایه پلاستیک‌ها که اساس مطالعات را تشکیل می‌دهد نادیده گرفته‌اند. وی اشاره دارد که در بیشتر این پژوهشها، از پلاستیک‌های تجارتي استفاده شده است که حاوی مواد همراه (مکمل‌ها و نرم‌کننده‌ها) می‌باشند. لذا اظهار می‌دارد که نتایج حاصل از تجزیه زیستی آن‌ها بدون شک با نتایجی که می‌توانست از پلی‌مرهای خالص (بدون افزودنی‌ها) بدست آید کاملاً متفاوت است. به اعتقاد نگارنده، این نقد خالی از اشکال نمی‌باشد، زیرا که مشکل زیست‌محیطی ما انباشت همین پلاستیک‌های تجارتي در محیط می‌باشد نه پلی‌مرهای خالص پلاستیک. لذا از نظر

گروه‌های C=O یا C-O می‌شود و در پی آن، مقاومت کمتر پلاستیک را در برابر تجزیه زیستی ایجاد می‌کند. وجود دمای بالاتر از 85 درجه سانتی‌گراد در تمام طول دوره کمپوستی‌شدن می‌تواند به کاهش تجزیه زیستی منجر شود (چن و همکاران، 2019b). در فرایند کمپوست‌سازی مبتنی بر هایپرترموفیلیک، علاوه بر آنکه بسیاری از ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها حذف می‌شوند سایر آلاینده‌های آلی و پاتوژن‌ها نیز حذف می‌شوند. در فناوری کمپوست‌سازی هایپرترموفیلیک، رایج‌ترین باکتری‌ها در تجزیه زیستی ترکیبات آلی استفاده از *Thermus*، *Bacillus* و *Geobacillus* می‌باشد (چن و همکاران، 2019b).

استفاده از کنسرسیوم‌های میکروبی در تجزیه نانو/میکروپلاستیک‌ها

بعضی از پژوهشگران به منظور افزایش توان تجزیه زیستی ذرات نانو/میکروپلاستیک‌ها تنها از کنسرسیوم‌های میکروبی در مقایسه با سویه‌های میکروبی منفرد استفاده نمودند. روبرتس و همکاران (2020) برای اولین بار کنسرسیومی شامل پنج سویه از گونه‌های سودوموناس و باسیلوس را جهت هیدرولیز PET بکار بردند. این سویه‌ها که در تجزیه ترکیبات آروماتیک به‌خوبی شناخته شده می‌باشند و در محیط‌های بسیار آلوده فراوان یافت می‌شوند (بهارتی و همکاران، 2019)، در یک همکاری نزدیک و هم‌افزایی قادر بودند PET را تجزیه و آنرا به مونومرهای اتیلن گلیکول و تروفنالیک اسید تبدیل نمایند. در این مطالعه، افزایش قابل‌توجه فعالیت آنزیمی لیباز در کنسرسیوم میکروبی در مقایسه با سویه‌های منفرد کاملاً مشهود بود. در یک گزارش مشابه دیگر، نقش کنسرسیوم باکتریایی جدیدی از پنج سویه *Brevibacillus sp.*، *Aneurinibacillus sp.*، غربالگری شده از کارخانه‌های تصفیه فاضلاب و محل‌های دفن زباله، در تجزیه بالقوه پلی‌مرهای پلاستیک نشان داده شده است (اسکاریباجان و همکاران، 2018). هم‌افزایی این باکترهای گرمادوست جدید سبب گردید تا پلی‌اتیلن با وزن ملکولی کم،

کاربرد و تجزیه زیستی این آلاینده‌ها، ضروری است تا کار بر روی پلاستیک‌های تجارتي صورت گیرد.

استفاده از فناوری‌های نوین در تجزیه زیستی نانو/میکرو پلاستیک‌ها

همانطور که گفته شد یکی از محدودیت‌ها در تجزیه زیستی پلی‌مرهای پلاستیک ناپایداری حرارتي در ساختار آنزیم‌های هیدرولیزکننده می‌باشد. آنزیم‌ها به طور متفاوت با افزایش درجه حرارت ساختار خود را از دست می‌دهند و دچار انعقاد یا اگریگاسیون می‌شوند. به عنوان مثال، هیدرولیز کارآمد PET مستلزم آن است که آنزیم کوتیناز بدست آمده از کمپوست شاخ-برگ¹ در دمای 70 درجه سانتی‌گراد یا بالاتر از آن فعال باشد، این در حالی است که در این دما این آنزیم تحت اگریگاسیون سریع قرار می‌گیرد و از دست دادن ساختار سوم آن نیز شروع می‌شود (شیرک و همکاران، 2018). در این رابطه سلیمان و همکاران (2014) مشاهده نمودند زمانی که دما از 70 درجه به 80 درجه سانتی‌گراد افزایش یابد نیمه‌ی عمر آنزیم کوتیناز بدست آمده از کمپوست شاخ-برگ از 40 دقیقه به 7 دقیقه کاهش پیدا می‌کند. جلوگیری از اگریگاسیون آنزیم نیازمند هر دو پایداری کلوتیدی و ساختاری پروتئین است. پایداری حرارتي پایین آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک یکی از گلوگاه‌های اصلی برای کاربردهای عملی است. با الهام از ویژگی‌های ساختاری منحصر به فرد پروتئین‌های ترموفیل، استراتژی‌های مؤثری نظیر استفاده از فناوری‌های مولکولی پیشرفته، افزایش بازده آنزیم‌های هیدرولیزکننده از طریق مهندسی نمودن آنها و دیگر رویکردها که در ذیل به آنها اشاره می‌گردد برای بهبود پایداری حرارتي آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک بکار گرفته شده‌اند.

دست یافتن به آنزیم‌های جدید و نوشناخته‌ای که از توان بالایی در هیدرولیز پلی‌مرهای پلاستیک برخوردار باشند همواره یک هدف امیدوارکننده برای مقابله با آلاینده‌های پلاستیک بوده است. بر این اساس، اولین بار

یوشیدا و همکاران (2016) باکتری جدیدی از جنس *Ideonella* را از طریق غربالگری جوامع میکروبی از نمونه‌های خاک، فاضلاب و لجن طبیعی فعال آغشته به اجزاء بطری‌های پلاستیک (PET) بدست آوردند. این سویه نشان دهنده گونه جدیدی از جنس *Ideonella* بود که نام *Ideonella sakaiensis* 201-F6 برای آن پیشنهاد و در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری به شماره شناسایی 1547922 ذخیره شده است (یوشیدا و همکاران، 2016). این باکتری نوشناخته دو نوع آنزیم هیدرولاز PET به نام PETase و Metase تولید می‌کند که به طور هم‌افزایی قادرند PET را تجزیه کنند و در نهایت آنرا به مونومرهای اولیه خود اتیلن گلیکول و ترفتالیک اسید تبدیل کنند. PETase یک هیدرولاز سرین شبه‌کوتین است (کنوت و همکاران، 2020) که قادر است پلی‌مرهای PET را تجزیه و مونو (2-هیدروکسی اتیل ترفتالیک² و بیس (2-هیدروکسی اتیل ترفتالیک³ را آزاد کند.

در این مطالعه، به پروتئین نوشناخته ISF6_4831 که از سویه باکتری *Ideonella sakaiensis* 201-F6 استخراج شده بود و توانایی تجزیه PET را داشت آنزیم PETase اطلاق گردید. سه آنزیم دیگر این مطالعه که از غربالگری کنسرسیوم میکروبی حاصل شده بود عبارت بودند از TtH که از یک اکتینومیست ترموفیل *Thermofibida fusca* بدست آمده بود، آنزیم دوم کوتینازی بود که از کمپوست شاخ-برگ بدست آمده بود (LCC) و آنزیم سوم کوتیناز استخراج شده از قارچ *Fusarium solani* (FsC) بود. فعالیت آنزیم PETase مربوط به *Ideonella sakaiensis* 201-F6 در هیدرولیز PET با سه آنزیم هیدرولیزکننده دیگر PET که هر سه در یک شاخه فیلوژنتیک قرار داشتند نشان داد که توانایی آنزیم PETase در تجزیه PET از هر سه آنزیم دیگر به میزان قابل توجهی بیشتر بود.

هیدرولیز آنزیمی PET به عنوان پرمصرف‌ترین و آلاینده‌ترین پتروپلیمر محیط‌زیست بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. در این رابطه، تورینر و همکاران

² Mono-(2-hydroxyethyl)terephthalic (MHET)

³ Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET)

¹ Leaf - branch compost cutinase (LCC)

برابر بیشتر از نوع بومی آن و بدون حضور سورفکتانت بود. در واقع، سورفکتانت کاتیونی جذب آنزیم به سطح پلاستیک را از طریق برهمکنش‌های الکترواستاتیک تسهیل می‌کند. در این مطالعه، مشاهده شد که با افزایش دمای واکنش، حتی در غلظت‌های پایین‌تر سورفکتانت‌ها با زنجیره‌های آلکیل کوتاه‌تر، واکنش کاتالیزوری به‌طور مؤثرتری تسریع می‌شود که نشان دهنده تسهیل برهم‌کنش‌های آبگریز بین زنجیره‌های آلکیل سورفکتانت‌ها و سطح پلاستیک PET است. در این مطالعه، استفاده از سورفکتانت آنیونی دودسیل سولفات ($C_{12}\text{-OSO}_3^-$). فعالیت آنزیم کوتیناز جهش یافته را $4/3$ برابر افزایش داد. بر خلاف آنزیم کوتیناز، فعالیت آنزیم PETase در هیدرولیز پلاستیک PET و در برهم‌کنش با سورفکتانت کاتیونی دودسیل‌تری‌متیل‌آمونیم C_{12}^+ $N(\text{CH}_3)_3$ به‌شدت کاهش یافت ولی با حضور سورفکتانت آنیونی کاملاً افزایش یافت (فوروکاوا و همکاران، 2018). در واقع، اتصال سورفکتانت آنیونی به سطح پلاستیک منجر به ایجاد یک سطح با بار منفی می‌شود که با بار مثبت PETase (دارای نقطه ایزوالکتریک 9/4) برهم‌کنش می‌دهد. تأثیر متفاوت سورفکتانت آنیونی و کاتیونی بر میزان فعالیت کاتالیستی آنزیم‌ها همچنانکه در بالا اشاره گردید می‌تواند به عواملی نظیر ساختار سه بعدی آنزیم‌ها، ماهیت و فراوانی بار الکتریکی آنها، طول زنجیره آلکیل سورفکتانت‌ها و برهم‌کنش‌های آبگریز بین زنجیره‌های آلکیل و سطح پلاستیک، نوع و درجه کریستالی بودن پلاستیک و نوع و غلظت آنزیم بستگی داشته باشد.

یکی دیگر از راه‌های افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی‌مرهای پلاستیک گلیکوزیلاسیون³ آنزیم است. گلیکوزیلاسیون از طریق تقویت تثبیت ترمودینامیکی پروتئین و جلوگیری از آگریگاسیون پروتئین، پایداری حرارتی آنزیم را افزایش می‌دهد. در این مورد، شیرک و همکاران (2018) در مطالعه ترمودینامیک و سینتیک ثبات ساختاری آنزیم کوتیناز استخراج شده از

(2020) در یک مطالعه به منظور بهبود کارایی آنزیم‌های هیدرولیزکننده PET، چندین آنزیم گزارش شده قبلی (یوشیدا و همکاران، 2016) شامل آنزیم‌های LCC, TFH, FSC و PETase را در هیدرولیز PET آمورف بکار بردند. آنها از طریق مهندسی آنزیم با استفاده از تکنیک مدل سازی ملکولی و آنالیز سطح - تماسی آنزیم، موفق به افزایش بازده دپلمریزاسیون و بهینه سازی فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم‌ها شدند. نتایج آنها نشان داد که آنزیم کوتیناز استخراج شده از کمپوست شاخ-برگ در مقایسه با دیگر آنزیم‌های فوق با توانایی خیلی بیشتر قادر بود PET را به میزان $93/2$ میلی‌گرم معادل ترفتالیک اسید در ساعت به ازاء هر میلی‌گرم آنزیم تجزیه نماید. این نتایج نقش مهندسی آنزیم در افزایش کارایی کاتالیستی آنزیم، در مقایسه با نتایج یوشیدا و همکاران (2016) را به خوبی نشان می‌دهد.

توانایی هیدرولیز کردن PET در حضور سورفکتانت‌ها¹ یکی دیگر از روشهایی است که جهت افزایش پایداری ساختمان آنزیم در دمای‌های بالاتر و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالیستی آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته است. در این رابطه فوروکاوا و همکاران (2018) هیدرولیز PET با درجه کریستالی کم و ضخامت 200 میکرومتر را توسط آنزیم کوتیناز استخراج شده از باکتری *Thermobifida fusca* در دماهای مختلف از 40 تا 70 درجه سانتی‌گراد مطالعه کردند. نتایج نشان داد که پلاستیک PET مورد تجزیه قرار گرفت و ترکیبات بیس (2-هیدروکسی اتیل) ترفتالات، مونو (هیدروکسی اتیل) ترفتالات و تروفتالیک اسید تولید شدند. با مهندسی نمودن آنزیم در این مطالعه، زمانی که از آنزیم کوتیناز جهش یافته (TfCut2 G62A/F209A) استفاده شد، اضافه نمودن یک سورفکتانت کاتیونی به نام دودسیل‌تری‌متیل‌آمونیم² ($C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$) به غلظت 250 بی‌پی‌ام سبب افزایش هیدرولیز آنزیمی پلاستیک PET به میزان 31 نانومول در دقیقه بر سانتی‌متر مربع شد که $12/7$

1. Surfactants

2. Dodecyltrimethylammonium

3. Glycosylation

غیرمهندسی شده، افزایش فعالیت هیدرولیتیکی را برای PET و پلی‌آمید نشان داد (آراجو و همکاران، 2007). مهندسی تشکیل پیوندهای هیدروژنی در ناحیه‌ای که ساختار آنزیمی با ثبات‌تر را بر عهده دارد روش دیگری برای دستیابی به افزایش پایداری حرارتی است (کوی و همکاران، 2021). تقویت اتصال سوبسترا به مکان فعال آنزیم بهبود پایداری حرارتی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک را فراهم می‌نماید. پیوند هیدروژنی می‌تواند ساختارهای درجه بالاتر پروتئین را حفظ کند و در نتیجه می‌تواند ثبات ساختاری را تقویت کرده و مقاومت در برابر دمای بالا را بهبود بخشد. به عنوان مثال، تشکیل یک پیوند هیدروژنی با واسطه آب بین باقیمانده‌های S121E و N172 آنزیم در ناحیه حلقه اتصال انعطاف‌پذیر β6-β7 PETase می‌تواند استحکام ناحیه‌ای را افزایش داده و منجر به افزایش قابل ملاحظه پایداری حرارتی شود (سون و همکاران، 2019). در مطالعه دیگری، جهش‌های متعددی از جمله T140D، W159H، J168R و S188Q برای معرفی پیوندهای هیدروژنی جدید در PETase انجام شد. نتایج نشان داد که PETase مهندسی شده دمای ذوب 31 درجه سانتی‌گراد بالاتر از آنزیم نوع بومی آن داشت (کوی و همکاران، 2021).

مطالب فوق نشان می‌دهد هر چند تلاش‌های تحقیقاتی اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی برای کشف، مشخص کردن و اصلاح آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک از راه‌های گوناگون از جمله از طریق تکنیک‌های پیشرفته مبتنی بر omics را به دنبال داشته است، ولی با توجه به دشواری و چالش‌های موجود، به‌منظور دستیابی جامع به بیوکاتالیز آنزیمی برای تصفیه و بازیافت پایدار پلاستیک تحقیقات بیشتری باید انجام شود.

نتیجه‌گیری کلی

این مقاله دیدگاه جامعی از حضور نانو/میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های نوظهور در محیط‌زیست و اثرات زیان‌آور آنها بر زیست‌بوم‌های خشکی و آبی را ارائه می‌دهد. پساب‌ها، لجن فاضلاب،

کمپوست شاخ-برگ (LCC) مشاهده نمودند که درجه حرارت شروع اگرگاسیون برای LCC گلیکوزیل شده 10 درجه سانتی‌گراد نسبت به LCC غیرگلیکوزیل بیشتر بود. علاوه بر این، سرعت اگرگاسیون LCC گلیکوزیل در دمای 70 درجه سانتی‌گراد و یا بیشتر آهسته‌تر بود. در نهایت، فرایند گلیکوزیلاسیون این آنزیم در مقایسه با آنزیم غیرگلیکوزیل منجر به بهبود نقش کاتالیستی آنزیم کوتیناز استخراج شده از کمپوست شاخ-برگ برای هیدرولیز PET گردید. نتایج مشابهی مبنی بر نقش گلیکوزیل نمودن آنزیم کوتیناز بدست آمده از *Thiellavia terrestris* و کوتیناز قارچ *Aspergillus oryzae* در ممانعت از اگرگاسیون آنزیمی و بهبود پایداری و فعالیت کاتالیستی این آنزیم با افزایش دما در مقایسه با تیمارهای غیرگلیکوزیل نیز گزارش شده است (شیرک و همکاران، 2018). بنابراین، می‌توان گفت گلیکوزیلاسیون آنزیم LCC یک استراتژی تثبیت‌کننده قدرتمند است که از طریق ممانعت از واکنش پروتئین-پروتئین (شیرک و همکاران، 2018) می‌تواند بدون در نظر گرفتن منشاء میکروبی آنها برای سایر پروتئین‌های مستعد اگرگاسیون اعمال شود.

تقویت اتصال سوبسترا (بستر) به مکان فعال آنزیم رویکرد دیگری است جهت بهبود پایداری حرارتی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک. مکان فعال آنزیم، یک نقطه داغ برای مهندسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک است زیرا برهمکنش بین مکان فعال آنزیم و بستر عامل مهمی است که کارایی پلیمریزاسیون پلاستیک را رقم می‌زند. در واقع مکان فعال آنزیم مهمترین بخش در ساختار یک آنزیم است زیرا مستقیماً واکنش شیمیایی را کاتالیز می‌کند. یک استراتژی متداول ایجاد دهانه وسیع تری از مکان فعال آنزیم برای افزایش دسترسی به بستر پلاستیک است. اولین تلاش برای این منظور در مهندسی آنزیم کوتیناز قارچ *Fusarium solani* انجام شد (آراجو و همکاران، 2007). طی این فرایند، آنزیم جهش یافته (L182A) با دهانه بیشتر مکان فعال، نسبت به آنزیم

شده است. بنابراین، مهندسی پروتئین به طور فزاینده‌ای برای ساخت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک با کارایی و پایداری کاتالیزوری بهتر مورد استفاده قرار گرفته شده است. پیشرفت‌ها در مهندسی متابولومیک و زیست‌شناسی دست‌کاری شده به عنوان فناوری‌های تأثیرگذار منجر به کشف و یا توسعه سویه‌های میکروبی با توان بالا در بازیافت پلاستیک‌های مصنوعی به روشی سبزتر شده است. اگرچه استفاده از این فناوری‌ها در تجزیه زیستی نانومیکروپلاستیک‌ها یک رویکرد امیدوارکننده و الهام‌بخش تحقیقات آینده می‌باشد، اما به دلیل سرعت کمتر، معدنی شدن ناقص و سازوکارهای کمتر شناخته شده تجزیه زیستی، آنها در مراحل ابتدایی خود قرار دارند. به عنوان مثال، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک که تاکنون شناسایی شده‌اند، ممکن است تنها بخش کوچکی از آنزیم‌های مرتبط با دیپلمیریزاسیون پلاستیک در محیط را تشکیل دهند. بسیاری از اطلاعاتی که درک ما را در مورد پیامدهای بالقوه نانومیکروپلاستیک‌ها بالا می‌برد از مطالعات در شرایط آزمایشگاهی و کوتاه مدت به دست آمده‌اند که ممکن است با نتایج میدانی مطابقت نداشته باشد. لذا با توجه به نوظهور بودن این آلاینده‌ها و توجه جهانی برای پالایش آنها، توسعه و گسترش همه‌جانبه کارهای تحقیقاتی، تا حصول هدف نهایی که تجارتي کردن زیست‌پالایی این آلاینده‌ها می‌باشد، از اهمیت و ضرورتی خاص برخوردار است.

پسماندهای جامد شهری و کمپوست به عنوان منابع بالقوه آلودگی نانومیکروپلاستیک‌ها در محیط‌زیست نگرانی‌های روزافزونی را ایجاد نموده‌اند. لذا تلاش‌های گوناگونی با رویکردهای مختلف با تأکید و تمرکز بر فناوری‌های زیستی در جهت پالایش این آلاینده‌ها و حفظ سلامت محیط‌زیست و موجودات زنده تا کنون صورت گرفته شده است. مقاومت شدید پلی‌مرهای پلاستیک در مقابل تجزیه یک چالش جدی را در زیست‌پالایی آنها به وجود آورده است. در واقع، نانومیکروپلاستیک‌ها توسط آنزیم‌های میکروبی و با سازوکاری که معمولاً متضمن هیدرولیز است، تجزیه می‌شوند. لذا راهکارهای گوناگونی جهت افزایش تجزیه آنها مانند شناسایی و انتخاب بهترین سویه‌های توانمند، استفاده از کنسرسیون‌های میکروبی و استفاده از باکترهای ابرگرمدوست بکار گرفته شده است. افزون بر این، در تجزیه پلی‌مرهای پلاستیک، افزایش توان تشکیل بیوفیلم، استفاده از سورفکتانت‌های کاتیونی و آنیونی و گلیکوزاسیون آنزیمی راه‌کارهایی است که جهت افزایش توان کاتالیتی آنزیم‌ها در هیدرولیز نانومیکروپلاستیک‌ها همچنان که اشاره گردید و با موفقیت‌هایی نیز همراه بود بکار برده شده است. برای افزایش توان تجزیه زیستی ذرات پلاستیک موفقیت‌هایی در استخراج آنزیم‌های جدید تجزیه‌کننده پلاستیک از طریق تکنیک‌های پیشرفته مبتنی بر omics و بهینه‌سازی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک، هر چند ناچیز، حاصل

فهرست منابع:

1. Albertsson, A-C. and Banhidi, Z.G. 1980. Microbial and oxidative effects in degradation of PE. *Applied Polymer Science* 25 (8): 1655-1671, <https://doi.org/10.1002/app.1980.070250813>.
2. Albertsson, A-C. 1978. Biodegradation of synthetic polymers. II. A limited microbial conversion of ^{14}C in polyethylene to $^{14}\text{CO}_2$ by some soil fungi. *Applied Polymer Science* 22 (12): 3419-3433, <https://doi.org/10.1002/app.1978.070221207>.
3. Araujo, R., Silva, C., O'Neill, A., Micaelo, N. and Guebitz, G. 2007. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide fibers. *Journal of Biotechnology* 128: 849-857. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.12.028.
4. Arpia, A.A., Chen, W.H., Ubando, A.T., Naqvi, S.R. and Culaba, A.B. 2021. Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: A state-of-the-art review. *Journal of Hazardous Materials* 418:126381. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126381>.

5. Ašmonaitė, G. and Almroth, B.C. 2019. Effects of microplastics on organisms and impacts on the environment: Balancing the known and unknown. Technical report by authors at Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, Sweden, pp: 1-70, <https://www.researchgate.net/publication/331257977>.
6. Bandmann, V., Müller, J.D., Köhler, T. and Homann, U. 2012. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *Federation of European Biochemical Societies letters* 586: 3626–3632. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.008>.
7. Bharti, V., Gupta, B. and Kaur, J. 2019. Novel bacterial strains *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. isolated from petroleum oil contaminated soils for degradation of flourene and phenanthrene. *Pollution* 5:657–669. <https://doi.org/10.22059/POLL.2019.274084.571>.
8. Boots, B., Russell, C.W. and Green, D.S. 2019. Effects of microplastics in soil ecosystems: above and below ground. *Environmental Sciences of Technology* 53 (19): 11496–11506. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03304>.
9. Bosker, T., Bouwman, L.J., Brun, N.R., Behrens, P. and Vijver, M.G. 2019. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere* 226: 774–781, doi: 10.1016/j.Chemosphere.2019.03.163.
10. Bryers, J.D., Jarvis, R.A., Lebo, J., Prudencio, A., Kyriakides, T.R. and Urich, K. 2006. Biodegradation of poly (anhydride-esters) into non-steroidal anti-inflammatory drugs and their effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro and on the foreign-body response in vivo. *Biomaterials* 27(29):5039–5048. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.034.
11. Chen, Y., Leng, Y., Liu, X., Wang, J. 2019a. Microplastic pollution in vegetable farmlands of suburb Wuhan, central China. *Environmental Pollution*, 257: 113449. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113449>.
12. Chen, Z., Zhao, W.Q., Xing, R.Z., Xie, S.J., Yang, X.G., Cui, P., Lü, J., Liao, H.P., Yu, Z., Wang, S.H. and Zhou, S.G. 2019b. Enhanced in situ biodegradation of micro-plastics in sewage sludge using hyper-thermophilic composting technology. *Journal of Hazardous Materials* 384: 121271. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121271>.
13. Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., Mitra, R., Han, J., Li, C., Liu, W. and Chen Q. 2021. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy. *ACS (American Chemical Society) Catalysis* 11, 1340–1350. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c05126>.
14. de Souza Machado, A.A., Lau, C.W., Till, J., Kloas, K., Lehmann, A., Becker, R. and Rillig, M.C. 2018. Impacts of microplastics on the soil biophysical environment. *Environmental Science of Technology* 52: 9656–9665. doi: 10.1021/acs.est.8b02212.
15. Dong, Y., Gao, M., Song, Z. and Qiu, W. 2019. Microplastic particles increase arsenic toxicity to rice seedlings. *Environmental Pollution* 259: 1-38. 113892, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113892>.
16. FAO, 7 December 2021: <https://news.un.org/en/story/2021/12/1107342>.
17. Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 317-345.
18. Feng, L.-J., Sun, X.-D., Zhu, F.-P., Feng, Y. Duan, J.-L., Xiao, F. Li, X.-Y., Shi, Y., Wang, Q., and Sun, J.-W. 2020. Nanoplastics promote microcystin synthesis and release from *Cyanobacterial Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*, 54: 3386–3394. doi: 10.1021/acs.est.9b06085.
19. Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K. and Miyamoto, K. 2018. Acceleration of enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) by surface coating with anionic surfactants. *ChemSusChem* 11(23): 4018–4025. <https://doi.org/10.1002/cssc.201802096>.

20. Gao, M., Liu, Y. and Song, Z. 2019. Effects of polyethylene microplastic on the phytotoxicity of di-n-butyl phthalate in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. ramosa Hort). *Chemosphere*, 237: 124482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124482>.
21. Geyer, R., Jambeck, J.R. and Law, K.L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 3(7):1-6, e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782.
22. Giorgetti, L., Spanò, C., Muccifora, S., Bottega, S., Barbieri, F., Bellani, L. and Castiglione, M.R. 2020. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 149: 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.014>.
23. Gonzalez-Fernandez, C, Toullec, J., Lambert, C., Goic, N. L., Seone, M., Moriceau, B., Huvet, A., Berchel, M., Vincent, D., Courcot, L., Soudant, P. and Paul-Pont, I. 2019. Do transparent exopolymeric particles (TEP) affect the toxicity of nanoplastics on *Chaetoceros neogracile*? *Environmental Pollution* 250: 873–882 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.093>.
24. Gravouil, K., Ferru-Clément, R., Colas, S., Helye, R., Kadri, L., Bourdeau, L., Moumen, B., Mercier, A. and Ferreira, T. 2017. Transcriptomics and lipidomics of the environmental strain *rhodococcus ruber* point out consumption pathways and potential metabolic bottlenecks for polyethylene degradation. *Environmental Science and Technology* 51(9): 5172–5181. doi:10.1021/acs.est.7b00846.
25. Gu, J.D., 2020. Biodegradability of plastics: the issues, recent advances, and future perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 28 (2): 1278–1282. doi:10.1007/s11356-020-11501-9.
26. Guo, X., Hu, G., Fan, X. and Jia, H. 2020. Sorption properties of cadmium on microplastics: The common practice experiment and A two-dimensional correlation spectroscopic study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 190: 110 -118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110118>.
27. Hsieh, Y., and Cram, L.A. 1998. Enzymatic hydrolysis to improve of wetting and absorbency of polyester fabrics. *Textile Research Journal* 68 (5): 311-319. doi:10.1177/004051759806800501.
28. Jaiswal, S. Babita Sharma, B., and Pratyosh Shukla, P. 2019. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology and Innovation* 17: 100567 <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100567>.
29. Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M. and Klobučar, G. 2019. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* 250: 831–838. doi:10.1016/j.envpol.2019.04.055
30. Knott, B.C., Erickson, E., Mark, D., Allen, M.D., Gado, J.E., Graham, R., Kearns, F.L., Pardo, I., Topuzlu, E., Anderson, J.J., Austin, H.P., Dominick, G., Johnson, C.W., Rorrer, N.A., Szostkiewicz, C.J., Copié, V., Payne, C.M., Woodcock, H.L., Donohoe, B.S., Beckham, G.T. and McGeehan, J.E., 2020. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (41): 25476–25485. doi:10.1073/pnas.2006753117.
31. Kokare C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N. and Mahadik, K.R. 2009. Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology* 8(2):159–168. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123465789/3883>.
32. Larue, C., Sarret, G., Castillo-Michel, H., Elena Pradas, A. and del Real, R. 2021. A critical review on the impacts of nanoplastics and microplastics on aquatic and terrestrial photosynthetic organisms. *Small* 17 (20): 1-28. <https://doi.org/10.1002/smll.202005834>.

33. Lear, G., Kingsbury, J.M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S.D., Wallbank, J.A., Weaver, L., and Pantos, O. 2021. Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiome* 16:2 <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>.
34. Lehmann, A., Leifheit, E. F., Feng, L., Bergmann, J., Wulfl, A., Rillig, M. C. 2020. Microplastic fiber and drought effects on plants and soil are only slightly modified by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Ecology Letters*, This article is published with open access at link.springer.com and journal.hep.com.cn. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0060-4>.
35. Leifheit, E.F., Lehman A., Rilling, M.C. 2021. Potential effects of microplastic on arbuscular mycorrhizal fungi. *Frontiers in Plant Science* 12:1-9 Article number 626709 <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.626709>.
36. Li, S. and Zho, L. 2020. Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of the Total Environment* 714:1-8., 136767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136767>.
37. Li, L., Zhou, Q. Yin, N., Tu, C., Luo, Y. 2019. Uptake and accumulation of microplastics in an edible plant. *Chinese Science Bulletin*, 64: 928–934. doi:10.1360/N972018-00845.
38. Long, M., Paul-Pont, I., Hégaret, H., Moriceau, B., Lambert, C. and Huvet, A. 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environmental Pollution* 228: 454–463. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.047 .
39. Lozano, Y.M., Lehnert, T., Linck, L.T., Lehmann, A., and Rillig, M.C. 2021. Microplastic shape, polymer type, and concentration affect soil properties and plant biomass. *Frontiers in Plant Science* 12:616645. doi: 10.3389/fpls.2021.616645.
40. Lu, Y., Ma, Q., Xu., X., Yu, Z., Guo, T. and Wu, Y. 2021. Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of polystyrene microplastics on *Vicia faba* roots. *Environmental Pollution*, 288: 117821.
41. Meng, F., Yang, X., Riksen, M., Xu, M., and Geissen, V. 2021. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Science and Total Environment* 755:142516. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142516.
42. Nadian, H., Fathi, G., and Abdollahi, M. 2013. Phosphorus Inflow into Two Species of Clover Root with Different Morphology Colonized by AM Fungi. *Iran Agricultural Research*, 36 (1): 40-54.
43. Nimchua, T., Eveleigh, D. E., Sangwatanaroj, U. and Punnapayak, H. 2008. Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate-hydrolyzing enzyme for fabric modification. *Journal of International Microbiology and Biotechnology* 35:843–850. Doi. 10.1007/s10295-008-0356-3.
44. Nimchua, T., Punnapayak, H., and Wolfgang Zimmermann, W. 2007. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. *Biotechnology Journal* 2: 361–364 doi.10.1002/biot.200600095.
45. Ogunbayo, A.O., Olanipekun, O.O. and Adamu, I.A. 2019. Preliminary Studies on the Microbial Degradation of Plastic Waste Using *Aspergillus niger* and *Pseudomonas* sp. *Journal of Environmental Protection*, 10: 625-631. <https://doi.org/10.4236/jep.2019.105037>.
46. Orr, I.G., Hadar, Y. and Sivan, A. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(1):97–104. doi: 10.1007/s00253-004-1584-8.

47. O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology 54(1):49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
48. Pehlivan, N. and Gedik, K. 2021. Particle size-dependent biomolecular footprints of interactive microplastics in maize. Environmental Pollution 277: 116772. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116772>
49. Pignattelli, S., Broccoli, A., Piccardo, M., Terlizzi, A. and Renzi, M. 2021a. Effects of polyethylene terephthalate (PET) microplastics and acid rain on physiology and growth of *Lepidium sativum*. Environmental Pollution 282: 116997. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116997>.
50. Pignattelli, S., Broccoli, A., Piccardo, M., Felling, S., Terlizzi, A. and Renzi, M. 2021b. Short-term physiological and biometrical responses of *Lepidium sativum* seedlings exposed to PET-made microplastics and acid rain. Ecotoxicology and Environmental Safety 208: 111718. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111718>.
51. Poerio, T., Piacentini, E. and Mazzei, R. 2019. Membrane processes for micro-plastic removal. Molecules 24 (22): 4148. doi: 10.3390/molecules24224148.
52. Prakash B, Veeragowda, B.M. and Krishnappa, G. 2003. Biofilms: a survival strategy of bacteria. Current Science 85(9):1299–1307. <https://www.jstor.org/stable/24108133>.
53. Priya, A., Dutta, K. and Daverey, A. 2021. A comprehensive biotechnological and molecular insight into plastic degradation by microbial community. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 97 (2): 381–397. <https://doi.org/10.1002/jctb.6675>.
54. Purohit, J., Chattopadhyay, A. and Teli, B. 2020. Metagenomic exploration of plastic degrading microbes for biotechnological application. Current Genomics. 21 (4): 253–270.
55. Ragaert, K., Delva, L. and Van Geem, K. 2017. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. Waste Management 69: 24–58. doi: 10.2174/1389202921999200525155711.
56. Rehse, S., Kloas, W. and Zarfl, C. 2016. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of daphnia magna. Chemosphere 153:91–99. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.133.
57. Ren, X., Tang, J., Wang, L. and Liu, Q. 2021. Microplastics in soil-plant system: effects of nano/microplastics on plant photosynthesis, rhizosphere microbes and soil properties in soil with different residues. Plant and Soil 462 (1): 561–576. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04869-1>.
58. Renzella, J., Townsend, N., Jewell, J., Breda, J., Roberts, N., Rayner, M. and Wickramasinghe, K. 2018. What national and subnational interventions and policies based on mediterranean and nordic diets are recommended or implemented in the WHO European region and is there evidence of effectiveness in reducing noncommunicable diseases, World Health Organization, Regional Office for Europe: Health Evidence Network Synthesis Report, No. 58, Copenhagen, Denmark. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326264>.
59. Roberts, C., Edwards, S., Vague, M., León- Zayas, R., Scheffer, H., Chan, G., Swartz N.A. and Mellies, J.L. 2020. Environmental consortium containing *Pseudomonas* and *Bacillus* species synergistically degrades polyethylene terephthalate plastic. mSphere 5 (6):e01151-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01151-20>.
60. Rochman, C., Browne, M., Halpern, B., Hentschel, B., Hoh, E., Karapanagioti, H., Rios-Mendoza, L., Takada, H., Teh, Swee, T. and Thompson, R. 2013. Policy: classify plastic waste as hazardous. Nature. 494: 169-171. doi:10.1038/494169a.
61. Rossi, G., Barnoud, J., and Monticelli, L. 2014. Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. The Journal of Physical Chemical Letters. 5 (1): 241–246. <https://doi.org/10.1021/jz402234c>.

62. Seeley, M.E., Song, B., Passie, R. and Hale, R.C. 2020. Microplastics affect sedimentary microbial communities and nitrogen cycling. *Nature Communication* 11: 2372. doi:10.1038/s41467-020-16235-3.
63. Shirke, A.N., White, C., Englender, J.C., Zwarycz, A., Butterfoss, G.L., Linhardt, R.G., Gross, R.A. 2018. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and effect on PET hydrolysis. *Biochemistry* 57 (7): 1190–1200, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01189>.
64. Simoes, M., Simoes, L.C. and Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science Technology* 43(4):573–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>.
65. Sivan, A., Szanto, M. and Pavlov, V. 2006. Biofilm development of the polyethylene degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(2): 346–352. doi: 10.1007/s00253-005-0259-4.
66. Sjollem, S.B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H.A., Kraak, M.H.S., Vethaak, A.D. 2015. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?. *Aquatic Toxicology*, 170: 259–261. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.002.
67. Skariyachan, S., Taskeen, N., Preethi Kishore, A. and Venkata Krishna, B. 2022. Recent advances in plastic degradation – From microbial consortia-based methods to data sciences and computational biology driven approaches. *Journal of Hazardous Materials*, 426 128086, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128086>.
68. Skariyachan, S., Manjunath, M., Shankar, A., Bachappanavar, N. and Patil, A. A. 2018. Application of novel microbial consortia for environmental site remediation and hazardous waste management toward low- and high-density polyethylene and prioritizing the cost-effective, eco-friendly, and sustainable biotechnological intervention. *Handbook of Environmental Materials Management*, Chapter 9, 431-478. doi: 10.1007/978-3-319-73645-7_9.
69. Son, H.F., Cho, I.J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H., Choi, S.Y., Lee, S. Y. and Kim, K. J. 2019. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PETdegradation. *American Chemical Society Catalysis*, 3519-3526, doi: 10.1021/acscatal.9b00568.
70. Sridharan, S., Kumar, M., Bolan, N.S., Singh, L., Kumar, S., Kumar, R. and You, S. 2021. Are micro-plastics destabilizing the global network of terrestrial and aquatic ecosystem services? *Environmental Research* 198: 111243. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111243>.
71. Sudhakar, M., Priyadarshini, C., Doble, M., Murthy, P.S. and Venkatesan, R. 2007. Marine bacteria mediated degradation of nylon 66 and 6. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 (3): 144–151. doi:10.1016/j.ibiod.2007.02.002.
72. Sulaiman, S., You, D.-J., Kanaya, E., Koga, Y., and Kanaya, S. 2014. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase. *Biochemistry* 53 (11): 1858–69. doi: 10.1021/bi401561p.
73. Sun, X.-D., Yuan, X.-Z., Jia, Y., Feng, L.-J., Zhu, F.-P., Dong, S.-S., Liu, J., Kong, X., Tian, H. Duan, J.-L., Ding, Z., Wang, S.-G. and Xing, B. 2020. Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Nanotechnology* 15 (9), 755–760. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0707-4>.
74. Taha, Z.D., Amin, R.M., Anuar, S.T., Nasser, A. and Sohaimi, E.S. 2021. Micro-plastics in seawater and zooplankton: a case study from Terengganu estuary and offshore waters, Malaysia. *Science of the Total Environment*, 786: 147466. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147466.

75. Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Kenji Miyamoto, K., Kimura, Y. and Oda, K. 2019. Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *American Chemical Society Catalysis* 9: 4089–4105.
76. Tiwari, N., Santhiya, D. and Sharma, J.G. 2020. Microbial remediation of micro-nano plastics: current knowledge and future trends. *Environmental Pollution Journal* 265: 115044. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115044>.
77. Tournier, V., Topham, C.M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair¹, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M-L., Texier¹, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci¹, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S. and Marty, A. 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles, *Nature* 580: 216-219, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
78. Tribedi, P. and Sil, A.K. 2013. Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environmental Science and Pollution Research* 20(6):4146–4153. doi: 10.1007/s11356-012-1378-y.
79. Uheida, A., Mejía, H.G., Abdel-Rehim, M., Hamd, W. and Dutta, J. 2021. Visible light photocatalytic degradation of polypropylene micro-plastics in a continuous water flow system. *Journal of Hazardous Materials*, 406: 124299. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124299.
80. Urbanek, A.K., Rymowicz, W. and Mirończuk, A.M. 2018. Degradation of plastics and plastic degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 7669–7678. doi: 10.1007/s00253-018-9195-y.
81. Wang, H.T., Ding, J., Xiong, C., Zhu, D., Li, G., Jia, X.Y., Zhu, Y.G. and Xue, X.M. 2019. Exposure to microplastics lowers arsenic accumulation and alters gut bacterial communities of earthworm *Metaphire californica*. *Environmental Pollution* 251: 110–116. doi: 10.1016/j.envpol.2019.04.054.
82. Wang, F., Zhang, X., Zhang, S. and Sun, Y. 2020. Interactions of microplastics and cadmium on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in an agricultural soil. *Chemosphere* 254: 126791. <https://doi.org/10.1016/j.Chemosphere.2020.126791>.
83. Wu, X., Lu, J., Du, M., Xu, X., Beiyuan, J., Sarkar, B., Bolan, N., Xu, W., Xu, S., Chen, X., Wu, F. and Wang, H. 2021. Particulate plastics-plant interaction in soil and its implications: a review. *Science of the Total Environment* 792: 148337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148337>.
84. Wu, Y., Guo, P., Zhang, X., Zhang, Y., Xie, S. and Deng, J. 2019. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *Journal of Hazardous Materials* 374: 219–227. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.04.039.
85. Xiao, Y., Jiang, X., Liao Y., Zhao, W., Zhao, P. and Li, M. 2020. Adverse physiological and molecular level effects of polystyrene microplastics on freshwater microalgae. *Chemosphere* 255:126914 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126914>.
86. Xu, Y., He, Q., Liu, C. and Huangfu, X. 2019. Are micro-or nanoplastics leached from Drinking water distribution systems? *Environmental Science and Technology* 53: 9339–9340, American Chemical Society Publications, doi: 10.1021/acs.est.9b03673.
87. Xu, Z., Xiong, X., Zhao, Y., Xiang, W. and Wu, C. 2020. Pollutants delivered every day: phthalates in plastic express packaging bags and their leaching potential. *Journal Hazardous Materials* 384: 121282. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121282.
88. Yang, D., Cho, J.S., Choi, K.R., Kim, H.U. and Lee, S.Y. 2017. Systems metabolic engineering as an enabling technology in accomplishing sustainable development goals. *Microbial Biotechnology* 10 (5): 1254–1258. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12766>.
89. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y. and Oda, K. 2016. A bacterium that degrades and

- assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351 (6278): 1196–1199. doi: 10.1126/science.aad6359.
90. Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y. and Yu, F. 2020. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of the Total Environment*, 715: 136968. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136968>.
 91. Yuan, W., Zhou, Y., Liu, X. and Wang, J. 2019. New perspective on the nanoplastics disrupting the reproduction of an endangered fern in artificial freshwater. *Environmental Science and Technology* 53 (21): 12715–12724. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02882>.
 92. Yu, H., Peng, J., Cao, X., Wang, Y., Zhang, Z., Xu, Y. and Qi, W. 2021. Effects of microplastics and glyphosate on growth rate, morphological plasticity, photosynthesis, and oxidative stress in the aquatic species *Salvinia cucullata*. *Environmental Pollution* 279: 116900. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116900>.
 93. Yu, Z., Tang, J., Liao, H., Liu, X., Zhou, P., Chen, Z., Rensing, C. and Zhou, S. 2018. The distinctive microbial community improves composting efficiency in a full-scale hyperthermophilic composting plant. *Bioresource Technology* 265: 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.011>.
 94. Zang, H., Zhou, J., Marshall, M.R., Chadwick, D.R., Wen, Y. and Jones, D.L. 2020. Microplastics in the agroecosystem: are they an emerging threat to the plant-soil system? *Soil Biology and Biochemistry* 148: 107926, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107926>.
 95. Zhang, C., Chen, X., Wang, J., and Tan, L. 2016. Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental Pollution* 220: 1282–1288. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.005.
 96. Zhao, T., Tan, L., Huang, W., and Wang, J. 2019. The interactions between micro polyvinyl chloride and marine dinoflagellate *Karenia mikimotoi*: The inhibition of growth, chlorophyll and photosynthetic efficiency. *Environmental Pollution*, 24: 883-889. doi:10.1016/j.envpol.2019.01.114.
 97. Zhou, P., Adeel, M., Shakoor, N., Guo, M., Hao, Y., Azeem, I., Li, M., Liu, M. and Rui, Y. 2021. Application of Nanoparticles Alleviates Heavy Metals Stress and Promotes Plant Growth: An Overview. *Nanomaterials* 11(1):26. doi: 10.3390/nano11010026.
 98. Zhou, J., Wena, Y., Marshall, M.R., Heng Gui, H., Yang, Y., Zeng, Z., Davey, L., Jones, D.L. and Zang, H. 2021. Microplastics as an emerging threat to plant and soil health in agroecosystems. *Science of the Total Environment* 787: 147444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147444>.

باکتری‌های محرک رشد گیاه و کاربرد آنها در کشاورزی¹

حسین بشارتی²

استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ besharati1350@yahoo.com

ص 135 - 162

دریافت: 1401/4/14 و پذیرش: 1401/8/11

چکیده

با توجه به نقش و اهمیت باکتری‌های محرک رشد گیاه در تغذیه و سلامت گیاه، بویژه در تولید محصولات سالم و ارگانیک، شناخت ویژگی‌ها و مکانیسم‌های تأثیر آنها بر گیاه، و نیز چالش‌های کاربرد آنها در شرایط مزرعه، در مدیریت استفاده از آنها ضرورت دارد. ریزوسفر بعنوان لایه نازک (یک تا دو میلی‌متر ضخامت) خاک اطراف ریشه‌های گیاه که تحت تأثیر سیستم ریشه‌های گیاه قرار دارد، تعریف می‌شود. باکتری‌های موجود در این لایه که از لحاظ تعداد و تنوع تحت تأثیر ریشه گیاه می‌باشد، باکتری‌های ریزوسفری نام دارند. باکتری‌های ریزوسفری به لحاظ نوع تأثیری که بر گیاه می‌توانند داشته باشند، مفید، مضر یا بی‌اثر هستند. به باکتری‌های ریزوسفری مفید و غیرهمزیست که قادرند با یک یا چند مکانیسم خاص بطور مستقیم یا غیر مستقیم رشد گیاه را افزایش دهند باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) می‌گویند. تولید هورمون‌های گیاهی (اکسین، جیبرلین...)، انحلال ترکیبات فسفر، تثبیت نیتروژن، تولید سیدروفور، اکسایش ترکیبات گوگرد، تولید آنزیم ACC-Deaminase از جمله مکانیسم‌های مستقیم و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی پاتوژن (کیتیناز، ...)، افزایش مقاومت سیستمیک گیاه، تولید سیانید هیدروژن، ایجاد رقابت با پاتوژن‌ها، تولید ترکیبات فرار، تولید سیدروفور از مکانیسم‌های غیرمستقیم تأثیر این باکتری‌ها بر گیاهان می‌باشد. در این نوشتار پس از شرح مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیمی که توسط این باکتری‌ها صورت می‌گیرد، اثرات کاربردهای باکتری‌های محرک رشد گیاه بر گیاهان و نیز عوامل مهم تعیین‌کننده نتایج کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بررسی شده و در پایان ملاحظاتی که در کاربرد این باکتری‌ها و مسایل بازار رسانی آنها باید مدنظر قرار گیرند، بحث و بررسی شده است.

واژه‌های کلیدی: ریزوسفر، کود زیستی، فیتوهورمون، سیدروفور، آنزیم، پلی‌ساکارید برون سلولی

¹ بخشی از این مقاله برگرفته از کتاب میکروبیولوژی خاک مدرن (Modern Soil Microbiology) فصل 22 با عنوان "باکتری‌های محرک رشد گیاه در خاک‌های کشاورزی و تحت تنش" نوشته E. Gamalero و RB. Glick می‌باشد که در سال 2019 توسط ناشر بین‌المللی Taylor & Francis منتشر شده است.

² نویسنده مسئول، آدرس: کرج، جاده مشکین دشت، بلوار امام خمینی، موسسه تحقیقات خاک و آب

باکتری‌های ریزوسفری

در یک خاک معمولی ممکن است چند میلیون تا چند صد میلیون سلول میکروبی در هر گرم وزن خشک خاک، وجود داشته باشد. این تعداد بی‌شمار میکروارگانیسم‌ها به صورت ناهمگن در خاک توزیع می‌شوند، سلول‌ها عمدتاً در منافذ ریز غنی از مواد مغذی که محیط‌های مطلوب برای رشد هستند، مستقر می‌باشند. در خاک دارای پوشش نباتی، توزیع باکتری‌ها در خاک بسیار نامتوازن‌تر از خاک بدون گیاه است، در منطقه اطراف ریشه (ریزوسفر) بدلیل شرایط موجود، تعداد و تنوع باکتری‌ها متفاوت از خاک دورتر از ریشه‌ها (خاک غیر ریزوسفری) می باشد (گامالرو و گلک، 2019).

در سال 1904، هیلنر ریزوسفر را به عنوان منطقه نازک (1 تا 2 میلی‌متر ضخامت) خاک اطراف ریشه‌های گیاه تعریف کرد که تحت تأثیر سیستم ریشه است. به دلیل آزاد شدن انواع ترکیبات آلی توسط ریشه‌ها، تراکم و فعالیت های میکروبی در ریزوسفر اغلب افزایش می‌یابد، به طوری که آن را نقطه داغ و برانگیخته¹ برای کلونیزاسیون و فعالیت میکروب‌ها در نظر می‌گیرند. عبارت بهتر ریزوسفر عبارت است از، لایه نازکی از خاک اطراف ریشه های گیاه که میکروارگانیسم‌های موجود در آن از لحاظ تعداد و تنوع تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه قرار دارند (شکل 1).

به طور کلی، میکروارگانیسم‌های مستقر در ناحیه ریزوسفر با توجه به تأثیر بر روی گیاه، می‌توانند به عنوان مفید، مضر یا بی اثر طبقه بندی شوند. تخمین زده شده است که حدود دو تا پنج درصد از باکتری‌های موجود در ریزوسفر دارای خصوصیات فیزیولوژیکی هستند که می‌توانند در تقویت رشد گیاه و/یا بهبود سلامت گیاهان نقش داشته باشند (آنتون و پروست، 2005)، به باکتری‌های ریزوسفری مفید که قادرند بطور مستقیم یا غیر مستقیم با یک یا چند مکانیسم رشد و نمو گیاه را بهبود بخشند،

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)² گفته می‌شود (شکل 2). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه باکتری‌های مفید و غیرهمزیست هستند که قادرند با یک یا چند مکانیسم خاص بطور مستقیم یا غیر مستقیم رشد گیاه را افزایش دهند. به آنها باکتری‌های افزایش دهنده محصول³ نیز می‌گویند زیرا در اکثر موارد تلقیح گیاه با این باکتری‌ها افزایش رشد و عملکرد را بدنبال داشته است.

طیف وسیعی از باکتری‌های خاکزی می‌توانند در زمره باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه قرار گیرند، از جمله آنها می‌توان به جنس‌های سودوموناس، باسیلوس، آزوسپریلوم، فلاوباکتریوم و ازتوباکتر اشاره کرد. با توجه به طیف وسیع باکتری‌های PGPR تنوع گیاهان هدف، پراکندگی آنها در شرایط خاکی و اقلیمی متفاوت و تعدد مکانیسم‌های تأثیر این باکتری‌ها، مطالعات زیادی در دنیا درخصوص آنها انجام شده است. در ایران نیز مطالعات متعددی در قالب پایان نامه‌ها، رساله‌ها، طرح‌ها و پروژه‌ها در دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی صورت گرفته است.

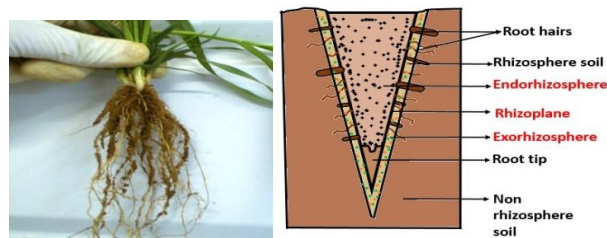
ارزیابی جمعیت سودوموناس‌ها در ریزوسفر گندم در مناطق مختلف کشور (رسولی صدقیانی و همکاران، 1384)، اثر قارچ‌کش بر سودوموناس‌ها و آزوسپریلوم (سلطانی طولارود و همکاران، 1393)، اثر برجوانه زنی، رشد و عملکرد ذرت علوفه‌ای (نظارت و غلامی، 1390، سیدشریفی و خاوازی، 1391) رشد و نمو کلزا (عباس‌زاده دهجی و همکاران، 1393) سرعت رشد، زمان گلدهی و الگوی تجمع استویوزاید در گیاه استویا (اطرشی و همکاران، 1394) جوانه‌زنی ریحان در شرایط تنش شوری (عقیقی شهوردی و همکاران، 1393) رشد، عملکرد و اجزای عملکرد، در گندم (ذبیحی و همکاران، 1388)، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز، رشد و نمو، پارامترهای رشدی و غلظت عناصر کم مصرف در تنش شوری در کلزا (سلطانی طولارود و همکاران، 1393، ارزانش و همکاران،

² Plant Growth Promoting Rhizobacteria

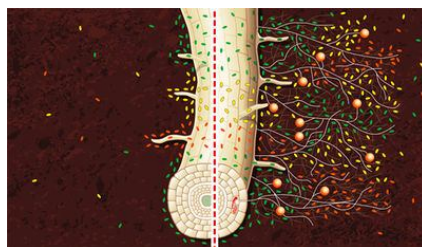
³ Yield Increasing Bacteria

¹ Hot spot

(1391)، خواص کیفی و کمی قارچ دکمه‌ای (ملایی و بشارتی 1389)، بر جذب نیتروژن و عملکرد گندم (محمدی و همکاران، 1389)،



شکل 1- وضعیت ریشه گیاه و خاک اطراف آن و بخش‌های مختلف ریزوسفر
(<https://biologyreader.com/rhizosphere.html>)



شکل 2- باکتری‌های ریزوسفری مفید (PGPR) در اطراف ریشه گیاه
(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Plant_Growth_Promoting_Bacteria)

1388، ذبیحی و همکاران، 1388 خسروی و همکاران، 1392) بر رشد گندم آبی و دیم (ملکوتی و همکاران، 1383)، بر جذب فسفر و شاخص‌های رشد ذرت (حمیدی و همکاران، 1388، نورقلی پور و همکاران 1385، بشارتی و صالح راستین 1378، ایرانی پور و همکاران 1386) بر جذب پتاسیم و وزن خشک ذرت (فلاح و همکاران 1387)، بر شاخص‌های رشد کلزا (عباس زاده دهجی و همکاران 1387، اخگر 1387، اسدی رحمانی 1388)، مواردی از مطالعات انجام شده در ایران می‌باشند که در اکثر موارد اثر مثبت باکتری‌ها بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده گزارش شده است. در پژوهشی دیگر در موسسه تحقیقات خاک و آب باکتری‌های سودوموناس، آزوسپریلوم و فلاوباکتیریم از ریزوسفر گندم از استانهای مختلف جداسازی و صفات محرک رشدی آنها بررسی شد. سپس باکتری‌هایی با توانایی محرک رشدی قابل توجه، در شرایط گلخانه و سپس در مزارع گندم در استانهای فارس، کرمانشاه، مازندران، سمنان، خراسان

عملکرد علوفه و دانه سورگوم (کشاورزافشار و همکاران، 1390)، شاخص‌های رشد و عملکرد دو رقم گندم در خاک شور (سادات و همکاران، 1389) بر خصوصیات کمی و کیفی کنجد (جهان و همکاران، 1392)، بر تثبیت نیتروژن و رشد یونجه (ابراهیمی و اخگر، 1393)، ویژگی‌های مورفولوژیک و عملکرد گیاه دارویی گشنیز (درزی و همکاران، 1391)، بر عملکرد گل و اسانس و کارایی مصرف نیتروژن بابونه آلمانی (دست برهان و همکاران 1390)، عملکرد و کیفیت سیب‌زمینی (بهبود و همکاران، 1391)، آفتابگردان در شرایط آلودگی سرب و کادمیم (متشرع زاده و ثوابی، 1390)، عملکرد و اجزای عملکرد گوجه‌فرنگی در شرایط آلودگی عناصر سنگین (نعمتی و همکاران، 1394)، عملکرد برنج (نکیسا و همکاران، 1394)، عملکرد و اسانس زعفران (رسولی و همکاران، 1392)، شاخص‌های رشد برنج (افتخاری و همکاران 1388)، بر رشد و افزایش سیستم ریشه‌ای گندم (ریحانی تبار و همکاران 1379، خسروی 1376، خاوازی

باکتریهای محرک رشد به روش های مختلفی عمل می‌کنند. آنها می‌توانند رشد و عملکرد گیاه را تحریک کنند، از رشد و گسترش عوامل بیماریزای خاکزاد جلوگیری کنند، و تحمل گیاه را در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش دهند. PGPB می‌تواند در کشاورزی به عنوان کودهای زیستی یا سموم دفع آفات، در بیوتکنولوژی زیست محیطی برای گیاه پالایی و در تولید مواد غذایی به عنوان طعم دهنده و بهبود دهنده ارزش مواد مغذی مورد بهره‌برداری قرار گیرد. (بونا و همکاران، 2015)

مکانیسم‌های (مستقیم و غیر مستقیم) مورد استفاده توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه

بطورکلی باکتری‌های محرک رشد گیاه با مکانیسم‌های مستقیم و/یا غیر مستقیم بر گیاه اثر می‌گذارند (شکل 3). مکانیسم‌های مستقیم افزایش رشد گیاه شامل تحریک رشد با تولید هورمونهای گیاهی (اکسین، جیبرلین، سیتوکینین...)، بهبود جذب عناصر غذایی از طریق فرآیندهایی از قبیل تثبیت نیتروژن هوا، ترسیب آهن (با تولید سیدروفور)، حلالیت فسفات و اکسیداسیون گوگرد و نیز تولید آنزیم ACC دامیناز (1- آمینوسیکلوپروپان-1-کربوکسیلات دامیناز) و کاهش تولید اتیلن در گیاهان و در نهایت افزایش تحمل گیاه به انواع تنش های محیطی می باشند.

کلید مکانیسم‌های غیرمستقیم افزایش رشد گیاهان بر پایه سرکوب بیماری‌های خاکزاد است. این امر از طریق مکانیسم‌های گوناگون صورت می‌گیرد. تولید و رهاسازی آنتی بیوتیک‌ها، سیانید و آنزیم‌های تجزیه کننده خارج سلولی مانند کیتینازها (و سلولازها) که باعث هیدرولیز دیواره‌های سلول های قارچی و ترکیبات فرار از جمله این مکانیسم‌ها می باشند.

رضوی و صفی آباد دزفول مورد ارزیابی قرار گرفتند. باکتریهای مؤثر در اراضی زیر کشت گندم در 28 استان ارزیابی و در 25 استان در مقایسه با شاهد بطور میانگین 15 درصد عملکرد دانه گندم را افزایش داد (اسدی و همکاران، 1390).

توانایی کلونیزاسیون گیاهان و زنده ماندن در ریزوسفر و/ یا ریزوپلان¹ اولین اولویت و الزام برای یک سویه خوب باکتری محرک رشد گیاه² (PGPB) می‌باشد. عوامل مختلفی از جمله کموتاکسی (جلب شدن بسوی مواد شیمیایی خاص)، سرعت رشد، جمعیت کافی در ریزوسفر، تولید آمینو اسید و ویتامین B1، تاژک، تولید ساختارهای موماند و تولید سیدروفور، به عنوان عوامل مؤثر حضور در ریزوسفر و ریزوپلان شناخته شده‌اند.

باکتری‌های ریزوسفری در خاک، روی سطح ریشه (ریزوپلان)، فضای بین سلولهای پوست ریشه (Cortex) و یا داخل بافت ریشه و اندام هوایی گیاه یافت می‌شوند. باکتری‌های محرک رشد گیاه که در ریزوسفر یا فضاهای بین سلول‌های سطح ریشه زندگی می‌کنند، خارج سلولی یا ریزوسفری در نظر گرفته می‌شوند، در حالی که آنهایی که در داخل بافت ریشه زندگی می‌کنند و بین سلولی هستند، به آنها اندوفیت گفته می‌شود. اندوفیت‌ها ممکن است اندام‌های مختلف گیاهی را کلنیزه کنند، بدون این که علائم خارجی آلودگی یا اثرات منفی بر روی گیاه میزبان ظاهر شود. آنها می‌توانند در ریشه، ساقه، برگ، گل، دانه و میوه حضور داشته باشند (گامالرو و گلیک، 2015، گلاسز و همکاران، 2015، تروینز و همکاران، 2015). باکتری‌های ریزوبیوم می‌تواند تا حد محدودی، با حرکت از ریشه به سمت اندام هوایی، بافت های داخلی ریشه گیاهان غلات را کلنیزه کنند. بنابراین آنها می‌توانند رشد گیاه و عملکرد دانه را بدون تشکیل گره ریشه و تثبیت نیتروژن تحریک کنند در این شرایط این باکتری‌ها برای گیاه PGPR محسوب می‌شوند (گامالرو و گلیک، 2019).

1. Rhizoplane

2. Plant Growth Promoting Bacteria

مکانیسم‌های مستقیم

تولید هورمون‌های گیاهی (اکسین، جیبرلین...)
 انحلال ترکیبات فسفر
 تثبیت نیتروژن
 تولید سیدروفور
 اکسایش گوگرد
 تولید ACC-Deaminase

مکانیسم‌های غیر مستقیم

تولید آنتی بیوتیک‌ها
 آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی پاتوژن (کیتیناز، ...)
 افزایش مقاومت سیستمیک گیاه ICR
 تولید HCN
 ایجاد رقابت با پاتوژنها
 تولید سیدروفور

شکل 3- نمایی شماتیک از مکانیسم‌های اصلی مورد استفاده توسط باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه برای تحریک رشد گیاهان

همزیستی نیتروژن به ژنوتیپ گیاه لگوم، بازده کلونیزاسیون ریزوبیوم، پارامترهای شیمیایی و فیزیکی خاک و عوامل اقلیمی بستگی دارد (گامالرو و گلیک، 2019).

ریزوبیوم‌ها علاوه بر تثبیت نیتروژن در حبوبات، همچنین قادر به تولید سایر مولکول‌های مؤثر در افزایش رشد گیاهان از جمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، اسیدآبسیزیک (ABA)، سیدروفورها، ACC د آمیناز و ویتامین‌ها می‌باشند (گوبالا کریشان و همکاران 2015). همچنین آنها می‌توانند بیماری‌های خاکزاد را از طریق رقابت برای مواد مغذی، تولید آنتی بیوتیک‌ها و سیانید-هیدروژن (HCN)، آزاد سازی آنزیم‌های تجزیه کننده (لیتیک) و تولید سیدروفورها، سرکوب کنند (گوبالا کریشان و همکاران 2015، بهاتاچاریا و جها، 2012). این خصوصیات فیزیولوژیکی ویژه سویه³ هستند. ریزوبیوم‌ها، با توجه به قابلیت‌های خوب بقا و ماندگاری و خصوصیات محرک رشدی بسیار زیاد و پتانسیل‌های محافظت از گیاه، گزینه‌های عالی برای استفاده به عنوان بخشی از عملیات کشاورزی پایدار هستند. در عمل، فرمولاسیون مایه‌تلقیح‌های ریزوبیومی استفاده می‌شود که منجر به نتایج مثبت می‌شوند. متأسفانه، چنین نتایجی همیشه در شرایط مزرعه تحقق نمی‌یابد (گامالرو و گلیک، 2019).

بعلاوه، ایجاد حالت انگلی با استفاده از باکتریوفاژها و القای مقاومت سیستمیک¹ (ISR) از سازوکارهای اساسی هستند. تخریب مولکول‌های سیگنال تولید شده توسط پاتوژن‌های گیاهی [فروپاشی QQ²، ابزار دیگری است که می‌تواند توسط PGPB در کنترل زیستی مؤثر واقع شود.

تثبیت نیتروژن مولکولی

حدود 80 درصد جو زمین را گاز نیتروژن (N₂) تشکیل می‌دهد ولی برای گیاهان قابل استفاده نیست. سالانه مقادیر زیادی کودهای شیمیایی نیتروژنی برای تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاهان، در کشاورزی استفاده می‌شود. از منظر کشاورزی پایدار، تثبیت زیستی نیتروژن یک جایگزین مهم زیستی برای کودهای شیمیایی است. تثبیت زیستی نیتروژن به سه روش آزادزی، همیار و همزیستی اتفاق می‌افتد. معمولاً هر گونه ریزوبیوم می‌تواند تنها با تعداد محدودی از انواع گیاهان در تعامل باشد و برهمکنشی با گیاهان غیر از میزبان‌های طبیعی خود نشان نمی‌دهد. باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن مانند آزوسپیریلوم، ازوتوباکتر، آزوآرکوس و سیانوباکتری‌ها می‌توانند آمونیاک را برای محصولات زراعی فراهم کنند، اگرچه سهم آنها (10-160 کیلوگرم نیتروژن در هکتار) کمتر از مقداری است که ریزوبیوم‌ها برای گیاهان میزبان خود ارائه می‌دهد (13-360 کیلوگرم نیتروژن در هکتار). کارایی تثبیت

³ Strain Specific

¹ Induced Systemic Resistance
² Quorum Quenching

انحلال فسفات

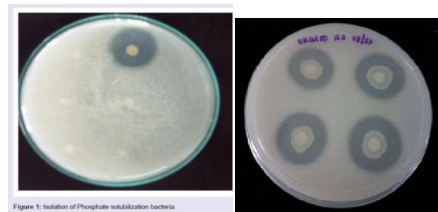
فسفر در بسیاری از خاک‌ها (بویژه خاک‌های آهکی) یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاه محسوب می‌شود، زیرا علیرغم اینکه بسیاری از خاک‌ها می‌توانند مقادیر زیادی فسفر داشته باشند، قابلیت جذب فسفر بدلیل غلظت اندک فسفر محلول در خاک اغلب محدود می‌شود (بهاتاچاریا و جها، 2012). فسفر معدنی موجود در خاک اغلب نامحلول بوده و متصل به آهن، آلومینیم، و / یا کلسیم است. فسفات آلی عمدتاً به صورت اسید فیتیک / فیتات یافت می‌شود (خان و همکاران، 2007). فیتات برای گیاهان قابل استفاده نیست زیرا ریشه‌های گیاه بطورکلی مقادیر خیلی کمی از فیتازها (آنزیم‌هایی که فیتات را تجزیه می‌کند) تولید می‌کنند. فراهمی زیستی اندک فسفر در بیشتر خاک‌ها به عنوان یک فاکتور کلیدی است که رشد گیاه را محدود می‌کند. لذا، فسفر معمولاً به عنوان بخشی از کودهای شیمیایی، به خاک اضافه می‌شود. راندمان مصرف کودهای فسفوری بندرت از 30 درصد فراتر می‌رود. باکتریهای حل‌کننده فسفات¹ (PSB)، که قادر به انحلال و معدنی کردن فسفر هستند، نویدهای بزرگی برای کشاورزی پایدار هستند. مکانیسم مورد استفاده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات برای انحلال فسفر معدنی شامل تولید اسیدهای آلی با وزن کم مولکولی است که منجر به اسیدی شدن خاک و افزایش انحلال فسفر می‌شود (خان و همکاران، 2007). بعلاوه، برخی از آگروپلی ساکاریدهایی که توسط PSB تولید می‌شوند، ممکن است با اتصال به فسفر آزاد و تنظیم تعادل انحلال فسفر، در انحلال تری کلسیم فسفات نقش داشته باشند (گامالرو و گلیک، 2019).

فسفاتازها (فسفومونواستراز، فسفودی استراز و فسفوتری استراز) استرهای فسفوری را هیدرولیز می‌کنند و فسفر آلی را معدنی می‌کنند (شکل 4). باکتری‌های مختلف خاک، نظیر *Bacillus sp.*، *Pseudomonas sp.*، *Citrobacter*، *Escherichia coli*، *Raoultella sp.*

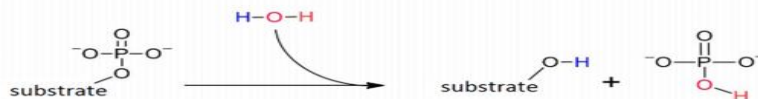
Enterobacter sp و *braakii*، به راحتی فیتات را تجزیه می‌کنند. همچنین، سویه‌های متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Enterobacter*، *Burkholderia*، *Rhizobium*، *Bacillus* و *Streptomyces* به عنوان PSB مناسب شناخته شده‌اند و هر دو فرایند انحلال فسفر و معدنی شدن فسفر در یک سویه باکتری می‌تواند رخ دهد (گامالرو و گلیک، 2019). انحلال فسفات در افزایش رشد گیاه اغلب تحت الشعاع سایر صفات مفید باکتریهای PSB، (مانند تولید اکسین یا سیدروفور ...) واقع می‌شود. باکتریای PSB می‌توانند بعد از ارزیابی عملکرد آنها در شرایط مزرعه، چه به تنهایی و چه به عنوان اجزای سیستم‌های مدیریت تلفیقی عناصر غذایی، به کودهای زیستی تبدیل شوند (استفن و همکاران، 2015). میکروارگانیسم‌هایی که قادر به انحلال فسفات هستند، در گیاه پالایی² (پالایش خاک-های آلوده به کمک گیاهان) خاک‌های متاثر از فلزات سنگین موثر هستند. هنگامی که گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین رشد می‌کنند، رشد و فعالیت‌های فیزیولوژیکی آنها مختل می‌شود و به بیماری‌های خاکزاد حساس تر می‌شوند. در این شرایط، ظرفیت آنها برای جذب و تحمل فلزات سنگین کاهش می‌یابد. استفاده از باکتریهای حل‌کننده فسفات که چندین فعالیت محرک رشدی داشته و نیز دارای پتانسیل سم‌زدایی فلز می‌باشند، ممکن است بطور غیرمستقیم با تحریک رشد گیاه و بهبود سلامت آنها حتی در چنین شرایط تنش‌زا، باعث افزایش کارایی گیاه پالایی شود (اوتینو و همکاران 2015).

² Phytoremediation

¹ Phosphate Solubilizing Bacteria



شکل 4- انحلال تری کلسیم فسفات و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری حل‌کننده فسفات در محیط کشت اسپربر



شکل 5- هیدرولیز پیوند استری در ترکیبات آلی فسفوری و آزاد شدن فسفر توسط آنزیم فسفاتاز

بر تولید و رهاسازی ترکیبات کلات کننده Fe^{+3} (فیتوسیدوفورها) و جذب کمپلکس آهن-فیتوسیدروفور به داخل سلول‌های ریشه می‌باشد. نمونه تیپیک گیاهان استراتژی II، علف‌ها و گیاهان خانواده گرامینه می‌باشند. بطورکلی سیدروفورها مواد آلی با وزن مولکولی کم و میل شدید برای ترکیب شدن بطور اختصاصی با آهن، که توسط میکروارگانیسم‌ها و گیاهان برای مقابله با کمبود آهن خاک تولید شده و امکان انتقال آهن به داخل سلول را فراهم می‌نماید. دینامیک آهن در ریزوسفر نه تنها توسط خصوصیات خاک و گیاه تنظیم می‌شود، بلکه تحت کنترل ترکیبات تولید شده بوسیله میکروب‌ها نیز می‌باشد (نمانسیو و همکاران، 2009). کمبود آهن وقتی اتفاق می‌افتد که غلظت آن به حدود 10^{-6} مولار برسد. در این شرایط در رشد سلول‌های باکتریایی اختلال ایجاد شده و مرفولوژی آنها تغییر یافته و میزان تولید RNA و DNA کاهش می‌یابد (برائون و هنتکه، 2011). لذا تولید کلات کننده‌های آهن (سیدروفور) افزایش می‌یابد. این مولکول‌های تمایل بالایی به Fe^{+3} دارند (K_d بین 10^{23} تا 10^{52} متغیر است). کمپلکس آهن-سیدروفور از طریق ناقل‌های خاص غشای بیرونی جذب سلول می‌شود.

سیدروفورها با توجه به ساختار شیمیایی شان، به انواع کاتکولات‌ها، هیدروکسامات‌ها و کربوکسیلات‌ها

ترسیب آهن¹

کمبود آهن به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد در کشاورزی شناخته می‌شود. در خاک‌های هوازی، آهن بیشتر به صورت هیدروکسیدها، اکسی هیدروکسیدها و اکسیدها وجود دارد، لذا مقدار آهن موجود برای جذب توسط ارگانیسم‌های زنده کم بوده و، به ترتیب در حدود 10^{-7} تا 10^{-23} مولار در pH 3/5 و 8/5 می‌باشد. هم میکروارگانیسم‌ها و هم گیاهان به آهن زیادی احتیاج دارند (یعنی به ترتیب حدود 10^{-5} تا 10^{-7} و 10^{-4} تا 10^{-9} مولار). این نیاز در ریزوسفر اهمیت پیدا می‌کند، جایی که رقابت شدید آهن بین ریشه‌های گیاه، باکتری‌ها و قارچ‌ها اتفاق می‌افتد (میمو و همکاران، 2014).

گیاهان از دو استراتژی برای جذب آهن از خاک استفاده می‌کنند. استراتژی I در گیاهان دو لپه‌ای و تک لپه‌ای غیرگرامینه مشاهده می‌شود. این استراتژی مبتنی بر کاهش pH در ریزوسفر از طریق آزاد سازی ترکیبات معدنی (H^+) و آلی (نظیر اسیدهای آلی، ترکیبات فنلی) می‌باشد. در نتیجه اسیدی شدن ریزوسفر، آهن فریک (Fe^{+3}) به فرم آهن فرو (Fe^{+2}) احیا شده و به داخل سلول‌های ریشه منتقل می‌شود. استراتژی II مبتنی

¹ Iron Sequestration

Rhizoctonia solani ، *Macrophomina phaseolina* ، *Pythium spp* ، و *Fusarium spp* گزارش شده‌است (علی و ویدها، 2012 سولوچانا و همکاران، 2014).

بعلاوه، سیدروفورهای باکتریایی ممکن است مقاومت سیستمیک القایی (ISR) را در گیاهان تقویت کنند، بنابراین مقاومت گیاه در مقابل پاتوژنهای گیاهی را افزایش می‌دهند (ازنار و دلاگی، 2015). القای مقاومت سیستمیک در برابر آلودگی *M. oryzae* در برنج تیمار شده با پسودوباکتین (pseudobactin) تولیدی توسط *Pseudomonas fluorescens* مشاهده شد. تلقیح گیاه با یک سویه جهش یافته این باکتری که قادر به تولید پسودوباکتین نبود، منجر به پیشرفت بیماری شد. این فرضیه مطرح شده‌است که سودوباکتین با تنظیم بیان هورمونهای جاسمونیک اسید و اتیلن ایمنی گیاه را محقق می‌سازد. دجوهری و همکاران (2012) در گیاه گوجه فرنگی نقش پسودوباکتین 374، سالیسیلیک اسید و پسودومونین تولیدی توسط باکتری محرک رشد *P. fluorescens* را در کلونیزاسیون ریشه‌های *A. thaliana* توسط همین باکتری و نیز در مقاومت سیستمیک القایی (ISR) علیه *P. syringae pv* را بررسی کردند. تلقیح گیاهان با نوع وحشی باکتری و سویه‌های جهش یافته که قادر به تولید این سه متابولیت نبودند، نشان داد که تولید آنها توسط باکتری *P. fluorescens* برای ایجاد ISR در گیاه *Arabidopsis* لازم نیست (گامالرو و گلیک، 2019).

تولید هورمون‌های گیاهی و/یا محرک‌های گیاهی

اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و آبسزیک اسید هورمون‌های گیاهی (فیتوهورمون‌ها) هستند که در رشد و نمو گیاهان نقش تنظیم‌کنندگی دارند. فیتوهورمون‌ها یا مواد شبه هورمونی که قادر به تحریک جوانه زنی بذر و غده، تشکیل ریشه یا رسیدن میوه هستند، اغلب به کودهای زیستی تجاری اضافه می‌شوند. بسیاری از باکتری‌های محرک رشد گیاه قادر به تولید و تنظیم فیتوهورمون‌ها هستند. حدود 80% کل

طبقه‌بندی می‌شوند. سیدروفورهای باکتریایی هم بطور مستقیم (تحریک رشد گیاه با بهبود تغذیه آهن) و هم غیرمستقیم (تحریک رشد گیاه با مهار پاتوژنهای گیاهی) در رشد گیاه نقش دارند. (سمر و همکاران، 1389). گیاهان ممکن است تحت تأثیر کاهش آهن ناشی از سیدروفورهای آزاد شده توسط باکتری‌ها قرار بگیرند یا نگیرند. بعضی از گیاهان حتی می‌توانند فری-سیدروفورهای باکتریایی را جذب و استفاده نمایند. اثرات مثبت سیدروفورهای تولید شده توسط باکتری‌ها بر رشد گیاه با بکارگیری فری-سیدروفورهای نشاندار به عنوان تنها منبع آهن، به اثبات رسیده‌است. کمپلکس آهن-پیووردين تولید شده توسط *Pseudomonas fluorescens* منجر به افزایش مقدار آهن در بافت‌های گیاهی و بهبود رشد گیاه *Arabidopsis thaliana* شد. کمپلکس‌های آهن-سیدروفور تولید شده توسط باکتری *P. fluorescens* و قارچ *Trichoderma asperellum* می‌توانند به عنوان منبع آهن برای گیاهان رفتار کرده، کمبود آهن در کشت‌های هیدروپونیک را برطرف نمایند (ناگاتا و همکاران، 2013).

هنگامی که یک گیاه در یک خاک آلوده به فلز سنگین رشد می‌کند، بهبود تغذیه آهن توسط باکتری‌های خاک از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود. برخی، سیدروفورها می‌توانند منیزیم، منگنز، کروم (III)، گالیم (III)، کادمیوم، مس، نیکل، آرسنیک، سرب و روی را به رادیونوکلیدها مانند پلوتونیوم (IV) متصل نمایند. سیدروفور تولید شده توسط سودوموناس باعث افزایش تجمع آرسنیک در برگ و ساقه یک سرخس ابرجاذب آرسنیک گردید. سیدروفورهای تولید شده توسط PGPB محدود می‌کنند تغذیه آهن را برای قارچهای فیتوپاتوژن که (1) قادر به تولید کلات کننده‌های آهن نیستند، (2) مقدار کمی از سیدروفورها را آزاد می‌کنند، یا (3) سیدروفورهایی که میل کمی برای جذب آهن دارند را تولید می‌کنند. حذف و توقف پاتوژن گیاهی توسط سیدروفورهای باکتریایی اخیراً در بیوکنترول

سلولی و تمایز ریشه‌های مویین، در ریشه گیاهان تلقیح شده با سویه وحشی باکتری *A. brasilense* (مولد IAA)، بیش از حد بیان شدند، در حالی که در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های جهش یافته بیان این ژن‌ها القا نشد. بعلاوه، ژنهای درگیر در تولید DNA، RNA و پروتئین و همچنین تقسیم سلولی و فرآیندهای نمو سلول، در گیاهان تلقیح شده با سویه جهش یافته کاهش یافت.

سیتوکینین‌ها به طور گسترده در گیاهان عالی، جلبک‌ها و باکتری‌ها وجود دارند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله تحریک تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول، گسترش بافت، تنظیم وقفه و شکوفایی جوانه‌های خفته، فعال شدن جوانه‌زنی بذر، افزایش ایجاد انشعابات، تجمع کلروفیل، توسعه برگ و تأخیر در پیری نقش کلیدی دارند. این مولکولها بیان ژنی که کدکننده پروتئین اکسپنسین (Expansin) است را تنظیم می‌کنند که باعث انعطاف دیواره سلول‌های گیاهی شده و انبساط سلول در اثر تغییرات تورژسانس را تسهیل می‌نماید و منجر به تغییر در اندازه و شکل سلول‌های گیاهی می‌شود.

تلقیح بذر با باکتری‌های مولد سیتوکینین‌ها منجر به افزایش سیتوکینین در بافتهای گیاهی و افزایش رشد و نمو گیاه می‌شود. تنش‌های محیطی مختلف مانند خشکسالی می‌توانند میزان سیتوکینین در گیاه را تنظیم کنند. هنگامی که خاک خشک می‌شود، میزان سیتوکینین در گیاهان کاهش یافته و منجر به بسته شدن روزنه و کاهش هدر رفت آب از برگها می‌شود. برگهای درخت سرو خمره ای (*Platyclus orientalis*) در شرایط تنش خشکی با باکتری *Bacillus subtilis* مولد سیتوکینین تلقیح شدند، در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد محتوای نسبی آب و پتانسیل آب برگ بالاتر بود. علاوه بر این، نشأت الکترولیت با حضور *B. subtilis* کاهش یافت (لیو و همکاران، 2013). تلقیح گیاهان در معرض تنش خشکی با باکتری مولد سیتوکینین، می‌تواند با حفظ میزان آب به رشد گیاهچه کمک کند. سیتوکینین‌های تولید شده

جدایه‌های خاکزی قادر به تولید اکسین هستند. تولید IAA توسط باکتریها براساس شش مسیر متابولیکی می‌باشد که در پنج مورد از آنها تریپتوفان به عنوان پیش ماده اصلی IAA است. اکسین‌ها بسیاری از فرایندهای گیاهی، شامل توسعه و تمایز سلول، جوانه زنی بذر و غده، توسعه آوندهای چوبی و ریشه، آغازش ریشه جانبی و اصلی، پاسخ به نور و جاذبه، فلورسانس و میوه دهی، فتوسنتز، تشکیل رنگدانه، بیوسنتز متابولیت‌های مختلف و مقاومت در برابر شرایط تنش را تنظیم می‌کنند. مقادیر مختلف اکسین درون بافت‌های گیاه منجر به واکنشهای متنوع گیاه می‌شود که تابعی از نوع گیاه، بافت موردنظر و مرحله رشد گیاه است. با این حال، منبع اکسین درونی گیاه تحت تأثیر میکروارگانیسم‌های خاک که قادر به تولید این فیتوهورمون هستند، می‌باشد. بنابراین، غلظت اکسین درون گیاه تعیین کننده اثر (مثبت یا منفی) IAA باکتری بر رشد گیاه است. مقادیر زیاد اکسین باعث افزایش تولید اتیلن در گیاهان شده و منجر به ریزش برگ و میوه، توقف رشد ساقه و تقویت مادگی در گلهای دو پایه می‌شود (گامالرو و گلیک، 2019).

باکتری‌های *Azospirillum* احتمالاً از طریق ترکیبی از تثبیت نیتروژن و تولید اکسین، رشد گیاه را افزایش می‌دهند. فرمولاسیون تجاری آزوسپیریلوم احتمالاً با اصلاح ساختار ریشه و با افزایش تعداد ریشه‌های جانبی و ریشه‌های مویین ممکن است عملکرد گیاه را حدود 30٪ افزایش دهند (هانجریا و همکاران، 2010). اسپاین و همکاران (2014) دریافتند که تلقیح گیاه *Arabidopsis thaliana* با باکتری *Azospirillum brasilense* تولیدکننده IAA طول ریشه اولیه را کاهش داده ولی میزان انشعابات ریشه و تعداد ریشه‌های مویین را افزایش داد. سویه جهش یافته باکتری *A. brasilense* که قدرت تولید اکسین را نداشت، نتوانست چنین تغییراتی در ساختار ریشه ایجاد کند. تجزیه و تحلیل بیان ژنی در گیاهان نشان داد که ژنهای دخیل در تغییر دیواره

ریزوبیوم، بورخلدریا و زانتوموناس مشاهده شده است (تودزینسکی و همکاران، 2016). افزایش رشد گیاه توسط PGPB تولید کننده جیبرلین توسط چندین محقق گزارش شده است، و اثر مثبت مشاهده شده روی زیست توده گیاهی غالباً با افزایش محتوای جیبرلین ها در بافت های گیاهی در ارتباط است (گامالرو و گلیک، 2019).

باکتری *Photorhabdus temperata* توانایی تولید چندین نوع جیبرلین (GA1، GA3، GA4 و GA7) را دارا می‌باشد. پس از تلقیح گیاهان برنج، این مولکول‌ها باعث افزایش ارتفاع، میزان کلروفیل و زیست توده تازه و خشک گیاه شدند (یولا و همکاران، 2014). به طور مشابه، تلقیح خیار با باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* سویه SE370 مقدار GA1 و GA4 داخل گیاه و پیش سازهای آنها را افزایش داد، که هم در شرایط تنش شوری و هم در شرایط غیر تنش، زیست توده بخش هوایی و محتوای کلروفیل گیاهان را افزایش داد.

افزایش تحمل گیاه به تنش از طریق تولید

ACC - Deaminase¹

ACC - دامیناز آنزیمی است که ACC (پیش ساز انتهایی اتیلن در گیاهان) را تجزیه کرده و آمونیاک و آلفاکتوبوتیرات (α -ketobutyrate) آزاد می‌کند. در نتیجه مقدار اتیلنی که گیاه می‌تواند تولید کند، کاهش می‌یابد. اتیلن مراحل اصلی رشد گیاه، یعنی جوانه‌زنی، بذر، تمایز بافت، تشکیل ریشه و شاخه اولیه، انشعاب و طویل شدن ریشه، رشد جوانه جانبی، گلدهی، ریزش گل، رسیدن و ریزش میوه، تولید آنتوسیانین، تولید ترکیبات آلی فرار² (VOCs) (مسئول تشکیل عطر در میوه‌ها)، هیدرولیز ترکیبات ذخیره‌ای، پیری و ریزش برگ را تنظیم می‌کند (گلیک، 2014). در طی برقراری همزیستی گیاه با میکوریزا و / یا ریزوبیوم‌ها، افزایش موضعی اتیلن رخ می‌دهد. باکتری‌های قادر به تولید ACC - دامیناز ممکن است برقراری همزیستی را تسهیل کنند (گلیک، 2014).

توسط باکتری‌های موجود در ریشه‌های گیاه، ممکن است انتشار اسید آمینه توسط گیاه را که میکروب‌ها را جذب کرده و رشد آنها را تحریک می‌کند، تغییر دهند. تلقیح گندم با باکتری *B. subtilis* IB-22 (که قادر به تولید سیتوکینین از نوع زاتین بود) منجر به افزایش 30 درصدی غلظت اسید آمینه در خاک در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده گردید. در مقابل، گیاهان تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* IB-21 که مولد سیتوکینین نبودند، بر میزان اسیدهای آمینه موجود در خاک تأثیری نداشتند (کودویارووا و همکاران، 2014).

از آنجا که گیاهان دچار کمبود نیتروژن میزان اسیدهای آمینه کمتری را ترشح می‌کنند، تولید سیتوکینین ها توسط باکتری ها باعث تحریک آزاد سازی اسیدهای آمینه توسط گیاه می‌شود، در نتیجه باعث بهبود شرایط برای میکروب های خاک بویژه در خاکهای فقیر شده و بدین ترتیب افزایش بهره‌وری و باروری گیاه و میکروب را تسهیل می‌نماید. (گامالرو و گلیک، 2019).

جیبرلین‌ها برای اولین بار به عنوان هورمونهای گیاهی در گیاه برنج که با قارچ *Fusarium moniliforme* (که قبلاً با نام *Gibberella fujikuroi* نامیده می‌شد) آلوده شده بود، شناسایی شدند. جیبرلین‌ها توسط گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها ساخته می‌شوند. جیبرلین‌ها تقسیم سلولی و رشد سلول‌ها را تنظیم نموده و در جوانه زنی بذر، طویل شدن ساقه، فراوانی ریشه‌های موئین، گلدهی، تنظیم میوه دهی، و تأخیر پیری در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی دخیل هستند. گلدهی زودرس، افزایش عملکرد محصول و نیز اندازه میوه‌های بزرگتر در گیاهان تیمار شده با این هورمون پیش‌بینی می‌شود. در میان باکتری‌ها، توانایی تولید مواد شبه جیبرلین ابتدا در *A. brasilense* و *Rhizobium spp* مشاهده شد. از زمان کشف اولیه، تولید جیبرلین در طیف وسیعی از جنسهای باکتریایی از جمله آزوتوباکتر، آرتروباکتر، آزوسپیریولوم، پرومیکرومونوسپورا، سودوموناس، باسیلوس، اسیتوباکتر، فلاوباکتریوم، میکروکوکوس، آگروباکتریوم، کلستریودیوم،

¹ ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate)

² volatile organic compounds

است به عنوان یک مولکول سیگنالی در چندین فرآیند گیاه از جمله ارتباط ریشه به ساقه عمل کند. بنابراین، باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) که آنزیم ACC - دامیناز تولید می‌کنند، ممکن است میزان سیگنال ACC در کارکردهای گیاهی خاص نظیر تنظیم عملکرد دیواره سلولی، را کاهش دهند. لذا باکتری‌هایی که دارای ACC - دامیناز هستند در شرایط تنش‌های محیطی مختلف (شرایط تولید اتیلن) از جمله غرقابی، آلودگی توسط سموم آلی و فلزات سنگین از جمله نیکل، سرب، روی، مس، کادمیوم، کبالت، شوری، خشکی؛ آلودگی با پاتوژنهای باکتری و قارچی و نیز نماتدها، به رشد گیاه کمک می‌کنند (گامالرو و گلیک، 2015).

کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و تحریک مسیره‌های دفاعی گیاه

استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست علیه پاتوژنهای گیاهی با مکانیسم‌های مختلف، از توسعه و فعالیت پاتوژن‌ها در ریزوسفر ممانعت نموده و یا آنها را حذف می‌کند. استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست و تلقیح آنها به گیاه با هدف تأمین سلامت گیاه (Biocontrol) بعنوان جایگزین آفت‌کشها و سموم برای تحقق کشاورزی پایدار و تولید محصولات سالم مورد توجه زیادی قرار گرفته‌است. میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست با مکانیسم‌های مختلفی در برابر پاتوژن‌ها عمل می‌کنند: افزایش ظرفیت دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها با ایجاد مقاومت سیستمیک القایی (Induced systemic resistance) و مقاومت سیستمیک اکتسابی (systemic acquired resistance) - تولید آنتی‌بیوتیک‌ها - تولید آنزیم‌های برون سلولی تجزیه‌کننده دیواره سلولی پاتوژن‌ها - تولید سیانید هیدروژن - اشغال جایگاه‌های خاص روی ریشه - تولید سیدروفور - رقابت با پاتوژن‌ها برای مصرف عناصر غذایی و توقف فعالیت آنزیم‌ها و توکسین‌های تولید شده توسط پاتوژن‌ها (باکتری‌های PGPR با تولید پروتئین‌های برون سلولی خاص فعالیت آنزیم‌های تولید شده توسط پاتوژن‌ها را کاهش داده یا

علاوه بر این، اتیلن پاسخ گیاهان به تنش را تنظیم می‌کند. یک مدل دو فازی برای توضیح این که اتیلن ممکن است اثرات ناشی از آلودگی پاتوژن را کاهش داده و یا بدتر کند، پیشنهاد شده‌است. مطابق این مدل، مدت کوتاهی پس از بروز تنش، تولید اتیلن در داخل گیاه به حداکثر (پیک) کوچکی می‌رسد. این اولین تولید و آزاد شدن اتیلن از ذخیره ACC موجود در گیاه ایجاد می‌شود و ممکن است ژنهای دفاعی گیاه را فعال کند (استرنزو همکاران، 2012). در مرحله دوم، بدنبال تولید ACC اضافی در داخل گیاه، پیک بزرگتری از تولید اتیلن مشاهده می‌شود. این پیک به عنوان یک سیگنال برای شروع فرآیندهایی مانند پیری، کلروز و ریزش عمل می‌کند، که همه اینها برای رشد و بقای گیاهان بازدارنده هستند.

بنابراین، علائم در گیاهانی که با تنش‌های مختلف محیطی روبرو هستند، بیشتر پیامدهای اوج دوم (بزرگ) اتیلن است تا اثرات مستقیم خود تنش. بر اساس این مدل، باکتری‌های تولید کننده ACC، ممکن است آسیب ناشی از تنش به گیاهان را کاهش دهند. تولید ACC دی آمیناز برای اولین بار در *Pseudomonas sp*، و در مخمر *Cyberlindnera Saturnus*، گزارش شد، در حالی که اکنون در بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یافت شده‌است (گلیک، 2014، ناسیمتو و همکاران، 2014). باکتری‌های تولیدکننده در اکثر خاک‌ها فراوان هستند. در حقیقت، ژنهای کدکننده ACC - دامیناز (ژنهای ساختاری *acdS* و ژن تنظیم کننده *acdR*) در بسیاری از باکتری‌های مختلف خاک متعلق به جنس *آزوسپیریلوم*، *ریزوبیوم*، *آگروباکتریوم*، *آکروموباکتر*، *بورخلدریا*، *رالستونیا*، *پارابورخلدریا*، *سودوموناس* و *انتروباکتر* یافت شده‌اند (ناسیمتو و همکاران 2014). در گیاهان عالی، اتیلن از طریق فعالیت آنزیم ACC سنتاز از *S-adenosyl-methionine* حاصل می‌شود. به ویژه هنگامی که گیاهان با تنش‌های محیطی روبرو هستند، اتیلن ممکن است به غلظت‌هایی که می‌تواند مانع رشد گیاه شود، برسد. علاوه بر این، ACC همچنین ممکن

این نتایج نشان داد که باکتری *B. amyloliquefaciens* سویه FZB42 نتوانست در گیاهان سالم پاسخهای دفاعی گیاه را از طریق مسیرهای اسید سالیسیلیک و اتیلن افزایش دهد، در حالی که در گیاهان آلوده به پاتوژن هم افزایشی فعال شدن مسیرهای جاسمونیک اسید و اتیلن، همراه با توقف مسیر القایی اسید سالیسیلیک، رخ می‌دهد. در حال حاضر، پیچیدگی تنظیم ISR به روشنی مشخص نشده است. و دقیقاً معلوم نیست که چگونه PGPB و پاتوژن های گیاهی مختلف بر بیان ژن گیاه تأثیر می‌گذارند

آنتی بیوتیک ها و سیانید هیدروژن

تولید آنتی بیوتیک‌ها معمولاً با توانایی باکتریهای PGPB در سرکوب رشد پاتوژن گیاهی همراه است (کنترل زیستی). آنتی بیوتیک‌های دخیل در سرکوب بیماری‌های خاکزاد شامل فنازین‌ها، فلوروگلوکوسینول‌ها، پیرولوئورین، پیرولنترین، لیپوپپتیدهای حلقوی و سیانید هیدروژن می‌باشند (گامالرو و گللیک، 2019). باکتری‌هایی مانند سودوموناس، کروموباکتریوم و ریزوبیوم می‌توانند علاوه بر آنتی بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن نیز تولید کنند (مونون و همکاران، 2015). این متابولیت ثانویه انتقال الکترون را متوقف کرده و تدارک انرژی برای سلول‌ها را مختل می‌کند. توانایی آزاد کردن سیانید یکی از خصوصیات فیزیولوژیکی است که در حال حاضر در پروتکل‌های غربالگری با هدف یافتن سویه‌های جدید کنترل زیستی مدنظر می‌باشد. باکتری‌های سیانوژنیک ممکن است رفتارهای متفاوتی را در مورد گونه‌های مختلف گیاهی نشان دهند. به عنوان نمونه باکتری، *P. fluorescens* سویه WSM3455 رشد ریشه علف هرز ترب وحشی (*Raphanus raphanistrum*) را مهار و رشد ریشه شبدر (*Trifolium subterraneum*) را تحریک می‌کند (زدور، 2015). این رفتار دوگانه، با تأکید بر تفاوت در حساسیت گیاه به سیانید هیدروژن، علاقه به استفاده احتمالی ریزوباکتری‌های سیانوژنیک در برنامه‌های مدیریت علفهای هرز را ایجاد کرده است (زدور، 2015).

متوقف می‌سازند و یا سم تولید شده توسط آنها را تعدیل یا خنثی می‌کنند) (جوگایها، 2021، کیمل و همکاران، 2020).

باکتری‌های محرک رشد گیاه با تحریک سیستم ایمنی گیاه می‌توانند سلامت گیاه را بهبود بخشند. پاسخ سیستم ایمنی گیاه مقاومت سیستمیک القایی (ISR) نامیده می‌شود. بسیاری از باکتریهای محرک رشد از قبیل جنس های *Bacillus* و *Serratia Pseudomonas* باعث تقویت دفاع گیاه توسط مقاومت سیستمیک القایی می‌شوند. مقاومت سیستمیک القایی توسط شبکه پیچیده ای از مسیرهای سیگنالی بهم پیوسته هدایت می‌شود که در آن هورمونهای گیاهی، عمدتاً جاسمونیک اسید / جاسمونات و اتیلن، نقش اصلی تنظیم کنندگی را ایفا می‌کنند (بیترس و همکاران، 2014).

مولکولهای سیگنالی، رونویسی از ژنهای گیاهی مربوط به دفاع را فعال می‌کنند که به نوبه خود منجر به تشکیل موانع دفاعی ساختاری می‌شوند. به عنوان مثال، کومار و همکاران (2012) نشان دادند که یکی از مکانیسم های موجود در محافظت از برگ های *A. thaliaa* در برابر پاتوژن گیاهی، بسته شدن سریع روزنه ها ناشی از القای باکتری *Bacillus subtilis*، سویه FB17 می‌باشد. این فرایند تنها زمانی رخ می‌دهد که پاتوژن وجود داشته باشد. در کاهوی آلوده به قارچ بیماریزای *R. solani* مسیرهای سیگنالی در گیاه توسط باکتری *B. amyloliquefaciens* سویه FZB42 فعال شد. در گیاهان سالم، تلقیح گیاه با سویه FZB42 منجر به افزایش بیان پروتئین پاتوژنز (PR-1) شد، در حالی که در گیاهان آلوده به قارچ *R. solani*، دیفنزین¹ یافت شد. به طور کلی،

¹ Defensin پروتئین کاتیونی غنی از سیستمین که در سلول حیوانات، گیاهان و قارچ ها و... وجود داشته و در واقع پپتیدهای دفاعی هستند که فعالیت ضد میکروبی مستقیم و فعالیت های سیگنال دهی ایمنی یا هر دو را نشان می دهند و در برابر باکتری ها، قارچ ها و بسیاری از ویروس ها فعال هستند.

کنترل زیستی، بیانگر یک استراتژی بالقوه برای بهبود فعالیت کنترل زیستی این سویه‌ها است.

فنازین، که توسط سودوموناسها و همچنین سایر باکتری‌های خاک تولید می‌شود، می‌تواند مانع رشد و تکثیر پاتوژنهای گیاهی شود. ایجاد علائم بیماری در سبب زمینی توسط پاتوژن *Pseudomonas scabies* در نتیجه کاربرد باکتری *Pseudomonas sp* سویه LBUM223 به دلیل تولید فنازین-1-کربوکسیلیک اسید (PCA) کاهش یافت. بیان ژن *txtA* (کدکننده تاکستومین، مولکولی که تولید سلولز را متوقف کرده و دیواره‌های سلولی را ضعیف می‌کند) در باکتری *S. scabies* متوقف شد. بنابراین، در شرایط خاک، PCA آزاد شده توسط باکتری *Pseudomonas sp*، بیماری ناشی از پاتوژن *S. scabies* را با توقف تولید تاکستومین (*thaxtomin*) کاهش می‌دهد (آرسنالت و همکاران، 2013).

آنزیمهای تخریب‌کننده دیواره سلولی

تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی است که توسط PGPB استفاده می‌شود. کیتینازها، سلولازها، $3,\beta-1$ گلوکانازها، پروتئازها و لیپازها می‌توانند دیواره سلولی قارچی را تخریب نموده و از این طریق جمعیت پاتوژنهای گیاهی را محدود نمایند. به طور خاص، تخریب کیتین (که در دیواره‌های سلولی بسیاری از قارچ وجود دارد) برای کنترل زیستی هر دو قارچ و حشرات بیماریزا در گیاه بسیار مهم و ضروری است (ناگپور و همکاران، 2014). کیتینازها توسط طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تولید می‌شوند. در میان گرم مثبت‌ها، *Streptomyces spp.* و باسیلوسها تولیدکنندگان اصلی هستند. به عنوان نمونه، کیتینازهای تولید شده توسط *Streptomyces spp.* و باسیلوسها معمولاً بر علیه قارچهای بیماری‌زا مانند *Candida sp* و *R. solani* فعال هستند. باکتری تولیدکننده کیتیناز به نام *Lysobacter capsici* YS1215، به عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی نامادری به نام *Meloidogyne*

تصور می‌شود که سیانیدهیدروژن ممکن است با آنتی‌بیوتیک‌های کد شده باکتریایی هم‌افزایی داشته باشد و این امر باعث افزایش کارایی آنتی‌بیوتیک می‌شود.

باکتری *Pseudomonas chlororaphis* سویه PA23 تعداد زیادی متابولیت را تولید می‌کند که بسیاری از آنها ممکن است همراه با هیدروژن سیانید، پروتئاز، لیپاز و کیتیناز علیه پاتوژنهای قارچی نقش داشته باشند (سلین و همکاران، 2010). این سویه می‌تواند از گیاه کلزا در برابر *Sclerotinia sclerotiorum*، با تولید پیروولنترین محافظت کند (سلین و همکاران، 2010). بررسی نقش پیروولنترین تولید شده توسط *P. chlororaphis* PA23 در سرکوب نامادری به نام *Caenorhabditis elegans* نشان داده که پیروولنترین باعث کاهش تبدیل تخم ناماد به نوزاد می‌گردد. بعلاوه، پیروولنترین و سیانیدهیدروژن برای ناماد *C. elegans* بسیار سمی هستند. هنگامی که سویه PA23 و ناماد *C. elegans* با هم رشد داده شدند، ژنهای مرتبط با کنترل زیستی (به عنوان مثال، *phzA*، *phzR*، *phzI* و *phzI* کدکننده تولید فنازین و HCN) در سویه PA23 بیش از حد معمول بیان شدند. این نتایج نشان می‌دهد که *P. chlororaphis* PA23 قادر است حضور *C. elegans* را حس نموده و می‌تواند نامادها را از بین ببرد. تعدادی از سویه‌های *P. fluorescens* مولد DAPG-4,2 (عامل مهم در فعالیت‌های کنترلی در برابر بسیاری از پاتوژنهای گیاهی) برای محافظت از محصولات زراعی در برابر انواع پاتوژنهای قارچی یا باکتریایی موجود در خاک گزارش شده‌اند. ژو و همکاران (2014) یک موتانت از باکتری *P. fluorescens* سویه J2 که بیان بیش از حد 2,4-DAPG را داشت، ایجاد کردند. این موتانت سیستم ریشه گوجه‌فرنگی را در مقایسه با سویه‌های نوع وحشی با کارایی بیشتر کلنیزه کرده و سطح بالاتری از سرکوب پاتوژن *Ralstonia solanacearum* را نشان داد. افزایش مقدار DAPG-4,2 (یا سایر آنتی‌بیوتیک‌ها) تولیدی توسط سویه‌های سودوموناسهای فلورسنت عامل

incognita که عامل بیماری تو مور ریشه در گوجه فرنگی استفاده می‌شود (گامالرو و گلیک، 2019).

ترکیبات فرار

باکتریها طیف گسترده ای از ترکیبات آلی فرار (VOC) با وزن کم مولکولی (کمتر از 3000 دالتون) را تولید می‌کنند که شامل الکل‌ها، ترپن‌ها، استرها، کتونها، هیدروکربنها، ترکیبات حلقوی حاوی نیتروژن، مشتقات گوگرد و اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشند (آئودرین و همکاران، 2015). بعلاوه، یک سویه باکتریایی می‌تواند ترکیبات مختلف متعددی را تولید کند. فرمول این ترکیبات با توجه به مواد مغذی موجود و اکسیژن و نیز وضعیت فیزیولوژیکی سلولها می‌تواند متفاوت باشد (اشمیت و همکاران، 2015). ترکیبات آلی فرار پس از آزاد شدن می‌توانند در فواصل طولانی گسترش یافته و در نتیجه منطقه بزرگی را تحت تأثیر قرار دهند. انتشار ترکیبات آلی فرار یکی از استراتژی‌هایی است که با استفاده از آن باکتریها با گیاهان میزبان و سایر گونه‌های میکروبی بصورت درون و بین گونه ای ارتباط برقرار می‌کنند (کانچیسوامی و همکاران، 2015). اشمیت و همکاران، 2015). ترکیبات آلی فرار باکتریایی می‌تواند رشد و نمو و تمایز یکسری از قارچهای پاتوژن گیاهی، مثل *Phytophthora infestans*، *Sclerotinia sclerotium*، *Fusarium oxysporum* و *R. solani* را مهار کنند (الکاهویی و همکاران، 2015). جیورجیو و همکاران، 2015. هانزیکر و همکاران، 2015، تنوری سالگادو و همکاران، 2013، وو و همکاران 2015).

قارچهای مختلف حساسیت‌های متفاوتی نسبت به ترکیبات آلی فرار دارند، بنابراین، اثر بخشی مهار قارچ به نوع باکتری - قارچ و همچنین شرایط محیطی بستگی دارد. ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط باکتریها، علاوه بر فعالیت ضد قارچی، همچنین می‌توانند فعالیت ضد نماتدی را نشان دهند. مجموعه ای از سویه‌های متعلق به جنس *Alcaligenes*، *Pseudomonas*، *Proteus*، *Staphylococcus* *Providencia*، ترکیبات آلی فراری را

تولید می‌کنند که در مقابل نماتدهای *C. elegans* و همچنین *Meloidogyne incognita* فعال هستند. (زو و همکاران، 2015). در یک مطالعه، هفت ترکیب آلی فرار باکتریایی کنترل کننده فعالیت نماتد شامل استوفنون، S-3، متیل تیوبوتیرات، دی متیل دی سولفید، اتیل 3،3-دی متیل آکریلات، نونان-2-یک، 1-متیوکسی-4-متیل بنزن و بوتیل ایزو والرات بررسی شدند. در میان آنها، S-3 متیل تیوبوتیرات خاصیت ضد نماتدی قوی تری از حشره کش شیمیایی دی متیل دی سولفید نشان داد (زو و همکاران، 2015). انتشار ترکیبات آلی فرار توسط بعضی از باکتریها می‌تواند منجر به افزایش رشد مستقیم در بعضی از گیاهان از جمله گیاه شاهی گوش موشی (*A. thaliana*) و نوعی یونجه (*Medicago truncatula*) شود (اوروزکو-موسکوئندا و همکاران 2013، ولازکوئز-بسرا، و همکاران 2011). از طرف دیگر، ترکیبات آلی فراری مانند آمونیاک، دی متیل دی سولفید، HCN (بلام و همکاران 2011) و 3-فنیل پروپیونیک اسید (تولید شده توسط سویه‌های متعلق به *Chromobacterium Burkholderia*، *Pseudomonas*، *Serratia*، و *Stenotrofomonas*) می‌توانند منجر به مسمومیت گیاه و مهار رشد گیاه شوند (بایلی و ویسکوف، 2012). بطورکلی، این نتایج نقش ترکیبات فرار باکتریایی بنام volatilome در برهمکنش باکتریها - باکتریها، باکتریها - قارچها و باکتریها و گیاهان را برجسته می‌کند. ترکیبات فرار یک باکتری ممکن است بر روی یک باکتری، قارچ یا گیاه دیگر بی اثر بوده یا اثر سوء و/ یا اثرات مثبت داشته باشد. این امر به نوع باکتری، قارچ، گیاه و نیز شرایط محیطی بستگی دارد.

اکسایش گوگرد

گوگرد یکی از عناصری است که دارای درجات اکسیداسیون متنوع می‌باشد، بطوریکه اعداد اکسیداسیون آن از +6 در سولفات‌ها تا -2 در سولفیدها متغیر می‌باشد. بخش اندکی از اشکال قابل اکسید شدن گوگرد موجود در خاک به شکل شیمیایی اکسید می‌گردد و اکسایش گوگرد در خاک عمدتاً به شکل زیستی و توسط میکروارگانیسم‌ها

انجام می‌شود. طیف گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌های خاکری توانایی اکسایش ترکیبات احیا گوگرد را دارا می‌باشند که باکتریهای جنس تیوباسیلوس مهمترین اکسیدکنندگان گوگرد در خاک محسوب می‌شوند. استفاده از گوگرد عنصری با هدف تأمین سولفات مورد نیاز گیاه (بویژه در خاکهای سبک مناطق پرباران که کمبود سولفات شایع می‌باشد)، اصلاح خاک (در خاک‌های سدیمی و شورسدیمی) و بهبود وضعیت تغذیه گیاهان (در خاکهای آهکی و خاک‌هایی با pH بالا) در صورتی نافع و اثربخش خواهد بود که ابتدا اکسید گردد. در ریزوسفر گیاهان دلیل تنوع میکروبی و تعداد بیشتر میکروارگانیزمها نسبت به خاک غیر ریزوسفری، اکسیداسیون گوگرد تشدید می‌گردد اما ذکر این نکته ضروری است که باکتریهای تیوباسیلوس یا سایر باکتریهای کمولیتوتروف¹ اکسیدکننده گوگرد نیازی به شرایط ریزوسفری نداشته و در خاک غیر ریزوسفری هم قادر به فعالیت و اکسایش گوگرد می‌باشند. اکسایش گوگرد در خاکهای آهکی ضمن تولید سولفات مورد نیاز گیاه و میکروبیها، با کاهش موضعی pH خاک باعث انحلال ترکیبات حاوی عناصر غذایی و افزایش قابلیت جذب این عناصر می‌گردد که نهایتاً افزایش کمیت و کیفیت محصول را می‌تواند در پی داشته باشد (بشارتی و صالح راستین 1378). تحقیقات زیادی در طی یک دهه گذشته در خصوص کاربرد گوگرد در اراضی آهکی بعضاً بشکل کودزیستی صورت گرفته (ملک زاده و همکاران، 1394، بشارتی و همکاران، 1396، بشارتی و همکاران، 1395، بشارتی 2017) و هم اکنون شرکتهای خصوصی کودزیستی گوگردی را بصورت انبوه تولید و عرضه می‌نمایند.

تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی² پلی‌ساکاریدها کربوهیدرات‌های بزرگی هستند که از اتصال تعداد زیادی مولکول قند کوچک به نام مونوساکاریدها تشکیل شده‌اند. اگر تمام مونوساکاریدها تشکیل دهنده‌ی یک پلی‌ساکارید یکسان باشند، هوموگلیکان³ و اگر از بیش از یک نوع مونوساکارید تشکیل شده باشد به آن هتروگلیکان⁴ گفته می‌شود. پلی‌ساکاریدها دارای فرمول کلی $C_x(H_2O)_y$ هستند که در آن X عدد بزرگی بین 200 الی 2500 است (متیوس و همکاران، 1999). پلی‌ساکاریدها بسته به نوع مونومر و همچنین نوع پیوند مونومرها و نوع ساختار پلی‌ساکارید، می‌توانند نقش‌های متفاوتی داشته باشند. وظیفه‌ی پلی‌ساکاریدها غالباً ذخیره‌ای (نشاسته، گلیکوژن و...) یا ساختاری (سلولز، کیتین و...) است (کمبل، 1996). آگزوپلی‌ساکاریدها، پلی‌ساکاریدهای زنجیره‌ای بلندی هستند که در طی مراحل رشد میکروبی در محیط رها می‌شوند آگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی در دو گروه هموپلی‌ساکاریدها (سلولز، دکستران، موتان، آلتران، پولولان، لوان، کوردلان) و هتروپلی‌ساکاریدها (ژلان و زانتان) قرار می‌گیرند. هموپلی‌ساکاریدها از واحدهای تکراری یک نوع مونوساکارید تشکیل شده‌اند و شامل دو گروه گلوکان و فروکتان هستند. در مقابل هتروپلی‌ساکاریدها از واحدهای متعددی از الیگوساکاریدها ساخته شده‌اند که حاوی سه تا هشت باقیمانده می‌باشد (ولمن و مدوکس، 2009).

پلی‌ساکاریدهای میکروبی بسته به موقعیت قرارگیری آنها به دو گروه تقسیم می‌شوند (لارپین و همکاران 5، 2009). پلی‌ساکاریدهای کپسولی⁶ (که در سطح سلول قرار می‌گیرند و نقش مهمی در حفاظت میکروبیها در برابر حمله‌ی فاژها، فاگوسیتوز، ترکیبات سمی و آنتی بیوتیک‌ها دارند) - پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (که به خارج سلول ترشح می‌شوند). توانایی تولید آگزوپلی‌ساکارید در میان باکتریها بیشتر از قارچها و مخمرها می‌باشد (لارپین و همکاران، 2009). به علت

انجام می‌شود. طیف گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌های خاکری توانایی اکسایش ترکیبات احیا گوگرد را دارا می‌باشند که باکتریهای جنس تیوباسیلوس مهمترین اکسیدکنندگان گوگرد در خاک محسوب می‌شوند. استفاده از گوگرد عنصری با هدف تأمین سولفات مورد نیاز گیاه (بویژه در خاکهای سبک مناطق پرباران که کمبود سولفات شایع می‌باشد)، اصلاح خاک (در خاک‌های سدیمی و شورسدیمی) و بهبود وضعیت تغذیه گیاهان (در خاکهای آهکی و خاک‌هایی با pH بالا) در صورتی نافع و اثربخش خواهد بود که ابتدا اکسید گردد. در ریزوسفر گیاهان دلیل تنوع میکروبی و تعداد بیشتر میکروارگانیزمها نسبت به خاک غیر ریزوسفری، اکسیداسیون گوگرد تشدید می‌گردد اما ذکر این نکته ضروری است که باکتریهای تیوباسیلوس یا سایر باکتریهای کمولیتوتروف¹ اکسیدکننده گوگرد نیازی به شرایط ریزوسفری نداشته و در خاک غیر ریزوسفری هم قادر به فعالیت و اکسایش گوگرد می‌باشند. اکسایش گوگرد در خاکهای آهکی ضمن تولید سولفات مورد نیاز گیاه و میکروبیها، با کاهش موضعی pH خاک باعث انحلال ترکیبات حاوی عناصر غذایی و افزایش قابلیت جذب این عناصر می‌گردد که نهایتاً افزایش کمیت و کیفیت محصول را می‌تواند در پی داشته باشد (بشارتی و صالح راستین 1378). تحقیقات زیادی در طی یک دهه گذشته در خصوص کاربرد گوگرد در اراضی آهکی بعضاً بشکل کودزیستی صورت گرفته (ملک زاده و همکاران، 1394، بشارتی و همکاران، 1396، بشارتی و همکاران، 1395، بشارتی 2017) و هم اکنون شرکتهای خصوصی کودزیستی گوگردی را بصورت انبوه تولید و عرضه می‌نمایند.

تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی² پلی‌ساکاریدها کربوهیدرات‌های بزرگی هستند که از اتصال تعداد زیادی مولکول قند کوچک به نام

³ Homoglycan

⁴ Heteroglycan

⁵ Larpin et al.

⁶ Capsular poly saccharide (CPS)

¹ Chemolithotroph

² Exopolysaccharides

به باکتریهای سیلیکاتی یا باکتریهای حل‌کننده سیلیکات³ موسوم هستند. فعالیت این باکتریها در خاک بویژه در منطقه ریزوسفر در شرایط کمبود پتاسیم خاک، می‌تواند بخشی از نیاز پتاسیمی گیاه را تأمین نماید. باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات (SSB) در خاک، آب، رسوبات و در کانی‌های سیلیکات یافت می‌شوند اما جمعیت آنها رسوبات خیلی بیشتر از خاک است. میزان آزاد شدن پتاسیم به نوع کانی، سویه باکتری و شرایط محیطی بستگی دارد و معمولاً رها شدن پتاسیم از کوارتز و مسکوویت دشوارتر از رسهای لایه ای است (وازانتین و همکاران، 2018). این باکتریها عمدتاً به جنس‌های باسیلوس، سودوموناس، آرتروباکتر و سراسینیا تعلق دارند. کود زیستی پتاسیم⁴ حاوی باکتری سیلیکاتی *Bacillus Circulans* می‌باشد.

تولید فاکتورهای رشد

بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاکزی قادر به تولید تمام متابولیت‌های خود از مواد معدنی، بدون نیاز به مواد مغذی آلی هستند (Prototroph) و برخی ناتوان در تولید یک ترکیب آلی خاص مورد نیاز برای رشد خود هستند (Auxotroph). سلول‌های پروتوتروف تولیدکننده‌های خودکفای همه متابولیت‌های مورد نیاز (مانند اسیدهای آمینه، لیپیدها، کوفاکتورها) هستند، در حالی که اکسوتروف‌ها باید در محیطی با متابولیت‌هایی باشند که نمی‌توانند تولید کنند. مثلاً یک سلول متیونین اکسوتروفیک، باید روی محیطی حاوی متیونین قرار گیرد وگرنه قادر به تکثیر نخواهد بود. درحالی‌که یک پروتوتروف یا یک سلول پروتوتروف متیونین قادر به عملکرد و تکثیر روی یک محیط با یا بدون متیونین است (لارزا، 2001، لینک همکاران، 2003). میکروارگانیسمهای ریزوسفری پروتوتروف با تولید فاکتورهای رشدی، ضمن تأمین نیاز خود می‌توانند در جذب این ترکیبات توسط سایر میکروارگانیسم‌ها و ریشه گیاهان نیز مؤثر باشند.

خواص فیزیکی و شیمیایی، آگزوپلی‌ساکاریدها به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان عوامل ویسکوزیته‌کننده، ژله‌ای‌کننده و قوام‌دهنده استفاده می‌شوند. از دیگر موارد کاربرد آگزوپلی‌ساکاریدها استفاده از آنها به عنوان عوامل حذف فلزات سنگین و در صنایع داروسازی به عنوان عوامل انتقال دارو می‌باشد. پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی بدلیل چسبندگی زیاد موجب اتصال ذرات خاک به یکدیگر شده و با تولید خاکدانه‌های ریز بعنوان Soil Aggregation Agents عمل می‌کنند (شکل 5). پلی‌ساکارید خارج سلولی سیانو باکتری جوانه زنی سه گیاه (ذرت، گندم، برنج) در شرایط شوری را بهبود بخشد. بعلاوه باعث اتصال باکتری به سطوح جامد شده از جمله ریشه گیاه شده و کلونیزاسیون را بهبود می‌بخشند. تولید پلی‌ساکاریدها هم سلول باکتری و هم ریشه‌های گیاه را در مقابل تنش‌های اکولوژیک (گرما، شوری، خشکی، پاتوژنها، آلودگی، ...) محافظت می‌نماید (آرورا و همکاران 1، 2010). تلقیح باکتریهای ریزوسفری مولد پلی‌ساکارید در فتابگردان در شرایط تنش خشکی باعث افزایش خاک چسبیده به ریشه و حجم منافذ بزرگ خاک شد عالمی و همکاران 2 (2000). اثر باکتریهای مولد پلی‌ساکارید خارج سلولی روی خصوصیات فیزیکی ریزوسفر خاک در گندم با خاکدانه‌سازی و پایداری خاک چسبیده به ریشه همراه بوده است (املال و همکاران، 1999).

آزادسازی پتاسیم

گروهی از باکتری‌های خاکزی با مکانیسم‌های مختلفی از قبیل ترشح اسیدهای آلی و معدنی، ترشح پلی-ساکاریدهای برون سلولی، تولید لیگاندهای آلی و ... موجب هوادیدگی و تخریب کانی‌های حاوی پتاسیم و آزاد شدن پتاسیم از آنها می‌شوند. از آنجا که این باکتریها عمدتاً موجب شکسته شدن شبکه ساختمانی کانی‌های آلومینوسیلیکات شده و موجب آزاد شدن عناصر غذایی (بویژه پتاسیم) بلوکه شده در شبکه رسها می‌شوند،

³ Silicate Dissolving Bacteria

⁴ Biological Potassium Fertilizer

¹ Arora et al.

² Alami et al.

سنجش حد نصاب و فروکش¹

Arthrobacter, Bacillus, Rhodococcus, Streptomyces (and *Streptomyces*) که جداسازی و شناسایی شده اند، عمومیت دارد (فتزرنر، 2015). سویه های باکتریایی متعلق به یک جنس می توانند یا تولید کننده AHL یا تجزیه کننده آن باشند؛ در آگروباکتریوم و سودوموناس، یک سویه گاهی می تواند AHL ها را تولید و تجزیه نماید. اگرچه QQ چشم اندازهای جذابی را ارائه می‌دهد، اما بیوکنترول توسط آن، یک عامل بیماری زا را از بین نمی‌برد. در عوض، عمل QQ باعث کاهش بیماری و نیز کشندگی پاتوژن می‌شود. در نتیجه، گیاه بدون علائم بیماری اما آلوده به یک پاتوژن خواهد بود و لذا کانونی برای گسترش پاتوژن احتمالی موجود است. بعلاوه، خاموش بودن ارتباط سلول به سلول غیر انتخابی است، به طوری که عملکردهای غیر هدفمند (مانند جنبه های مفید برای گیاه به عنوان مثال، تولید آنزیم ضد قارچ) نیز ممکن است مختل شوند. گیاهان دارای مکانیزم هایی هستند که به مکالمه متقابل باکتریها در فیتوسفر گوش می دهند و به آن پاسخ می‌دهند. (گامالرو و گلیک، 2019)

کاربردهای باکتریهای محرک رشد گیاه

استفاده برای بهبود پایداری تولید

در چند دهه گذشته، شاهد تقاضای فزاینده مردم برای غذاهای سالم تر و بی خطرتر، که با تأثیر کم بر محیط زیست تولید می‌شوند، بوده ایم. کشت مرسوم محصولات زراعی همچنان بر پایه مصرف کودها و سموم دفع آفات است که بطور بالقوه اثرات منفی بر سلامت انسان و محیط زیست دارند. بنابراین، تحقیقات کلیدی بر روی گزینه های زیستی سازگار با محیط زیست برای کودها و شیوه های مدیریت خاک متمرکز شده است تا باعث کاهش استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی شوند. مجموعه ای از رویکردها و ارگانسیم ها شناسایی شده اند که ممکن است الزامات کشاورزی پایدار را برآورده کند که شامل طیف وسیعی از باکتری های مفید در کنار قارچ ها و موجودات دیگر است. غربالگری و آزمایش باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPB) جدید منجر به تولید

QS (حس حد نصاب) نوعی ارتباط بین سلولی است که شامل مولکولهای سیگنال دهنده است که توسط بعضی از باکتریها در محیط استفاده می‌شود. هنگامی که تراکم سلول های باکتریایی به یک سطح بحرانی خاص برسد، QS سلول ها را قادر می سازد یکسری ژن خاصی را فعال نموده و گروه های باکتری می‌توانند به طور هماهنگ عمل کنند. مجموعه ای از کارکردها، که عمدتاً مربوط به بیان فاکتورهای بیماریزایی موجود در پاتوژن های گیاهی است، توسط QS تنظیم می‌شوند.

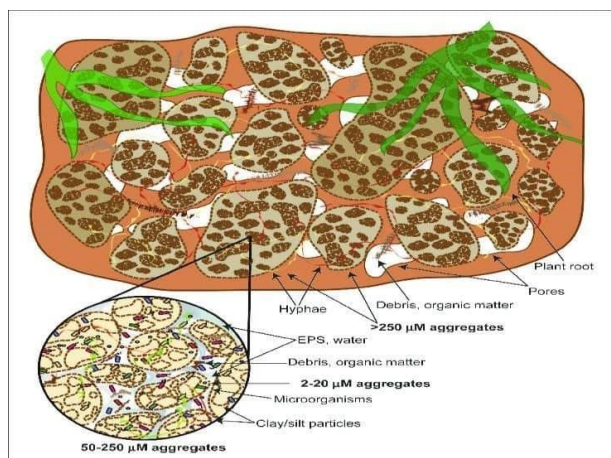
بنابراین، تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور، تشکیل بیوفیلم، تحرک، تراکم جمعیت، تولید آنزیم های تجزیه کننده و انتقال پلاسמיד Ti (در *Agrobacterium tumefaciens*) توسط QS تنظیم می‌شوند. در همه سیستم ها، تراکم سلول و سطح مولکولهای سیگنالی به طور متناسب افزایش می‌یابند. هنگامی که این دو پارامتر به یک سطح آستانه برسند، سلول ها شروع به رفتارهای متفاوتی می‌کنند، و هماهنگی بروز ویژگی های خاص (مانند بیماریزایی) را انجام می‌دهند. در باکتری های گرم منفی، معمولاً ارتباط QS از طریق ان-استیل هموسرین لاکتونها یا لاکتون های N-acyl-homoserine (AHLs) که دارای زنجیره های اسیلی (Acyl) با طول های مختلف هستند، رخ می‌دهد. ابزارهای QS که توسط فیتوپاتوژنها برای بروز بیماریزایی استفاده می‌شوند، اهداف توسعه استراتژی های کنترل زیستی هستند (فتزرنر، 2015).

QQ از طریق مهار تولید ترکیبات سیگنال دهنده، تخریب مولکول سیگنال یا تغییرات در تشخیص دومی (مولکول سیگنال)، باعث ضعیف تر شدن بیماری زایی پاتوژنها می‌گردد. QQ در تعداد زیادی از باکتری تجزیه کننده AHL، متعلق به پروتئوباکترها (*Agrobacterium, Bosea, Comamonas, Delftia, Ochrobactrum, Pseudomonas, Ralstonia, Actinobacteria, Sphingopyxis, Variovorax*)

¹ Quorum sensing and Quenching

گیاهان در مزرعه بکار رفته است. با این حال، در برخی موارد در مزرعه، نتایج با انتظارات مطابقت ندارند، دلیل آن غیرقابل پیش بینی بودن شرایط مزرعه است که به طور بالقوه با مایه تلقیح ها در تضاد بوده‌اند. از این رو، یک چالش اساسی ارائه مقدار کافی از سلولهای فعال در محل گیاه است، جایی که اینها مورد نیاز می‌باشند.

تعداد زیادی از سویه های متعلق به *Agrobacterium*، *Bacillus*، *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Paenibacillus macerans*، *Delftia*، *Burkholderia*، *Serratia*، *Pseudomonas*، *Pantoea agglomerans* و *Rhizobium* شد (رید و گلیک، 2013). آگاهی دقیق از مکانیسم‌های مورد استفاده توسط هر PGPB، به عنوان راهنمایی برای پیش‌بینی رفتار و عملکرد این سویه‌ها در



شکل 5- اتصال ذرات خاک به یکدیگر و با تولید خاکدانه های ریز توسط پلی ساکاریدهای میکروبی (کوستا و همکاران، 2018)

عوامل مهم تعیین کننده نتایج کاربرد باکتری های محرک رشد گیاه

PGPB در نظر گرفته می‌شود (رید و گلیک، 2013) به شرح زیر است:

1- تعیین مکانیسم های بقاء سویه در سیستم خاک / گیاه مربوطه

2- توسعه فرمولاسیونهای مناسب به منظور تقویت و بهبود استقرار و بقای سویه ها

3- تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیولوژیکی مایه تلقیح که می‌تواند در افزایش رشد گیاه، کنترل زیستی و یا در پالایش زیستی خاک تأثیر بگذارد

4- ایجاد ارتباط مستحکم بین نهادهای نظارتی در کشورهای مختلف هم در خصوص قوانین رهاسازی PGPB در محیط زیست و هم در مورد طیف گسترده ای از مسائل ایمنی زیستی

عملکرد سویه های PGPB در شرایط مزرعه، بعضاً، متغیر و فاقد ثبات است. زیرا این باکتری ها به شدت به شرایط زیستگاه خاک / ریزوسفر برای استقرار، بقا و عملکرد شان وابسته هستند. چنین شرایطی تا حد زیادی به شرایط خاک، مدیریت خاک و گونه های گیاه میزبان و فیزیولوژی آن بستگی دارد. علیرغم این واقعیت که ده ها سویه PGPB قبلاً با موفقیت تجاری سازی شده‌اند، هنوز تعدادی از عوامل در سیستم خاک / گیاه / مایه تلقیح وجود دارند که باید بهینه شوند. به نظر می‌رسد که هر سویه مایه تلقیح باید با مجموعه ای از شرایط خاص در خاک، روبرو شود تا بتواند بهینه عمل کند. بنابراین، پارامترهای اصلی که در هنگام تجاری سازی یک سویه

یافت. در حال حاضر، میزان استفاده از کودهای زیستی در بسیاری از کشورها محدود است، که دلیل آن فرمولاسیون نامناسب می‌باشد که منجر به کیفیت پایین و زمان ماندگاری کم مایه تلقیح می‌گردد (گامالرو و گلیک، 2019).

در این راستا، شاخص‌هایی که هنگام فرموله کردن یک محصول تجاری باید مورد توجه قرار گیرند، کیفیت و کارایی حامل‌ها، اختلاط ترکیبات تشکیل دهنده محصول فرموله شده (مقادیر، شرایط و نسبت مواد مخلوط شده) بهبود فرآیندهای مؤثر در تولید آنها، بقاء میکروارگانیسم در مایه تلقیح، ماندگاری محصول فرموله شده، کیفیت و مقدار مواد افزودنی توصیه شده و توسعه فرمولاسیونهای تجاری مبتنی بر مخلوط میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. مخلوط میکروارگانیسم‌ها نیاز به ارزیابی سازگاری سویه‌ها و ارزیابی دقیق رشد آنها هنگامی که بطور همزمان در یک بیورآکتور کشت می‌شوند، دارد. نهایتاً، نقش هزینه بعنوان یک پارامتر محدود کننده آشکار می‌باشد. متأسفانه، برخی کود زیستی / آفت کش زیستی که در حال حاضر در بازار موجود هستند در شرایط مزرعه بی اثر و / یا غیر قابل اطمینان هستند. کنترل کیفیت محصول در اینجا یک مسئله مهم است. ارزیابی خلوص 65 کود زیستی تجاری نشان داد که 63 درصد از آنها توسط سایر سویه های باکتریها آلوده شده اند (هرمن و لسوئر، 2013)، در حالی که 40٪ آنها نه تنها حاوی سویه ادعا شده نبودند، بلکه فقط حاوی باکتریهای آلوده کننده بودند. غالباً اطلاعات ارائه شده در برچسب در مورد میکروارگانیسم‌ها و حامل و همچنین ماندگاری و نگهداری محصول محدود یا غیر شفاف هستند. این امر ضرورت توسعه و اعمال کنترل کیفیت ("فرآیند اندازه گیری پارامترهای کیفی تعریف شده برای مایه تلقیح") و تضمین کیفیت ("ارزیابی همه جانبه روشها و تکنیک های کنترل کیفیت در دستیابی به آنچه می‌خواهند به آن دست یابند") در طی فرمولاسیون کودها و آفت کشهای زیستی را برجسته می‌کند. اگر این نیاز به دقت برآورده نشود،

5- توسعه و ترویج آگاهی و دانش در مورد مزایا و مضرات استفاده از PGPB به جای مواد شیمیایی مختلف
6- انتخاب سویه هایی که تحت شرایط خاص محیطی عملکرد خوبی دارند

7- توسعه روشهای جدید و مؤثرتر برای تلقیح گیاهان با سویه های منتخب باکتری در شرایط کنترل شده یا طبیعی (باشان و همکاران، 2014)

9- درک بهتر و کامل تر از برهمکنش بین سویه های مختلف باکتریایی، گیاه میزبان و سایر ارگانیسم های موجود در اطراف یا داخل بافت های گیاهی

بطور کلی، توان رقابتی بالا در ریزوسفر، توانایی افزایش زیست توده گیاه، بقای طولانی مدت بر روی گیاه، طیفی از صفات فیزیولوژیکی مفید برای گیاه، عدم وجود خطر برای سلامتی انسان و محیط زیست و تحمل زیاد در برابر تنش‌های محیطی موجود در سیستم خاک / گیاه، ویژگی های اساسی هستند که به معرفی PGPB جدید کمک می‌کنند (گامالرو و گلیک، 2019)

ملاحظات کاربرد و بازار

باکتریهای ریزوبیوم اولین باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) بودند که در سال 1895 هم در ایالات متحده و هم در انگلستان به بازار عرضه شدند، ولی هم اکنون بازار به طور عمده به سویه هایی از جنس *Azospirillum* (به دلیل قابلیت تثبیت نیتروژن آنها)، *Bacillus* (توانایی آنها برای حل کردن فسفات یا رفتار به عنوان عوامل کنترل زیستی)، *Streptomyces* (به دلیل توانایی آنها در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و / یا آنزیمی که در کنترل زیستی پاتوژن فعال هستند)، و *Pseudomonas* (برای استفاده بالقوه آنها هم به عنوان کودهای زیستی و هم به عنوان عامل بیوکنترل). تعلق دارد. آثار اقتصادی تجاری سازی PGPB به عنوان کودهای زیستی یا عوامل کنترل کننده زیستی بسیار مهم است. در ارزیابی ها تخمین زده شده است که در کشورهای در حال توسعه مانند ویتنام، قیمت کودهای شیمیایی نیتروژنی بدلیل جایگزینی آنها با PGPB های مختلف، تا 30 برابر کاهش خواهد

هنوز نگران کننده است. دلایل این عدم موفقیت‌ها اغلب این است که تعداد کافی سلول فعال میکروبی در کنار ریشه گیاه، وجود ندارد. لذا با ایجاد درک صحیح و عمیق تر از عوامل محدود کننده محلی، چنین مشکلاتی قابل رفع است. بنابراین فاکتورهای مهم و کلیدی موفقیت، انتخاب سویه های مناسب، مطالعه دقیق شرایط محلی که امکان بقا و فعالیت سویه تلقیحی را فراهم می کند، و نیز استفاده از ترکیب سویه های بهینه شده می‌باشند. در این مورد، ارزیابی مناسب بقا و توانایی کلنیزاسیون باکتری های محرک رشد گیاه¹ بهینه شده مهم و کلیدی است.

کاربرانی مانند کشاورزان اعتماد خود را در استفاده از محصولات زیستی برای کشاورزی از دست خواهند داد (گامالرو و گلپیک، 2019)

نتیجه‌گیری و چشم انداز

دنیا سابقه ای طولانی در استفاده کارآمد از ریزوبیومها در خاک (که بطور ویژه برای تقویت انباشت نیتروژن در خاک های فقیر از لحاظ نیتروژن بکار می-روند) را تجربه کرده است. علاوه بر این، در 30 سال گذشته، محققان در سراسر جهان اطلاعات زیادی راجع به مکانیسم هایی که باکتریهای باکتری های محرک رشد گیاه در تعامل با گیاهان استفاده می کنند، جمع آوری کرده اند، با این وجود هنوز اطلاعات زیادی وجود دارد که باید در زمینه های زیر آموزش داده شود:

- درک جزئیات مکانیسم هایی که PGPB برای تقویت رشد گیاهان و محافظت در برابر پاتوژن های گیاهی استفاده می کنند
- شرح دقیق چگونگی به کارگیری این ارگانیسم ها برای اینکه بیشترین کارایی را داشته باشند.

بر اساس اطلاعات موجود فن آوری باکتری های محرک رشد گیاه این پتانسیل را دارد که در مقیاسی بزرگتر از آنچه در حال حاضر استفاده می شود، توسعه یابد. در حقیقت، استفاده گسترده از PGPB در کشاورزی، باغداری، جنگل کاری و پاکسازی محیط زیست هنوز در مراحل ابتدایی است. با توجه به این واقعیت که میکروارگانیسم‌ها، به ویژه باکتری ها، اغلب با روش های مفید برای ده ها میلیون سال، با گیاهان برهمکنش موفقیت آمیز داشته اند، مخزنی از موجودات سازگار یافته در سراسر خاک در دسترس است. این امر می‌تواند و در آینده نیز خواهد توانست برای بشر گزینه های ایمن و کارآمد را بجای ادامه استفاده گسترده از مواد شیمیایی که بالقوه مشکل ساز و خطرناک هستند، فراهم سازد. با این حال بدلیل تعدد موارد عدم موفقیت تلقیح گیاه با ارگانیسمهایی که بعنوان کودهای زیستی و بیوکنترلی استفاده می‌شوند، عملکرد مناسب آنها در شرایط مزرعه

¹ Plant Growth Promoting Bacteria

فهرست منابع:

1. ابراهیمی، م. و ع. اخگر. 1393. تأثیر تلقیح تلفیقی باکتری سینوریزوبیوم (*Sinorhizobium sp*) و باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه بر تثبیت نیتروژن و رشد یونجه. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار جلد چهارم، شماره اول، ص: 183-199.
2. اخگر، ع. 1387. جداسازی، شناسایی و بررسی باکتری‌های ریزوسفری دارای توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز در کاهش اثرات تنش شوری بر رشد کلزا. رساله دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران. 158 صفحه.
3. ارزانش، م.ح.، ن. بنی عقیل، م. قربانلی و م. شهبازی. 1391. تأثیر باکتریهای محرک رشد گیاه بر پارامترهای رشدی و غلظت عناصر کم مصرف در دو رقم کلزا تحت تنش شوری. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار جلد دوم، شماره دوم، ص. 153-163.
4. اسدی رحمانی ه. 1388. جداسازی و شناسایی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت افزاینده رشد گیاه و اثر آنها در افزایش عملکرد و بهبود خصوصیات کلزا. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، نشریه شماره 1447، نشر مؤسسه تحقیقات خاک و آب.
5. اطرشی، م.، ف. وفادار اصفهان، و ر. عموآقایی. 1394. اثر قارچ میکوریز و ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه بر سرعت رشد، زمان گلدهی و الگوی تجمع استویوزاید در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bert*) دو ماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 31، شماره 2، ص: 220-234.
6. افتخاری س.ق.، فلاح ع.، اکبری غ.ع.، محدثی ع.، الله دادی ا. 1388. اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات و کودهای فسفاته بر چگونگی رشد گیاه برنج. مجله پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب). جلد 23، شماره 2، ص: 229-239.
7. ایرانی‌پور، ر.، ملکوتی م.ج.، عابدی م.ج.، سجادی ا.، غفوریان ح. 1386. اثرات اصلی خاک فسفات و باکتری تیوباسیلوس بر شاخص‌های عملکرد محصول ذرت و اثرات باقی مانده آن بر عملکرد جو. مجله علوم خاک و آب، جلد 21 شماره 2، ص: 191-200.
8. بشارتی ح.، و صالح راستین ن. 1378. بررسی تأثیر کاربرد مایه تلقیح باکتری‌های تیوباسیلوس همراه با گوگرد در افزایش قابلیت جذب فسفر. مجله علوم خاک و آب، جلد 13، شماره 1، ص: 23-39.
9. بشارتی، ح.، ه. خسروی، ک. خاوازی، ع. ضیائیان، ک. میرزاشاهی، ج. قادری، ح. ذبیحی، م. مستشاری، آ. صباح و ن. رشیدی. 1396. بررسی تأثیر اکسیداسیون زیستی گوگرد بر خصوصیات خاک و فراهمی عناصر در برخی از خاکهای ایران. نشریه پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب). جلد 31، شماره 3.
10. بشارتی، ح. 1386. بررسی اکسیداسیون گوگرد و ارتباط آن با آزاد شدن برخی از عناصر غذایی در خاک‌های آهکی زیر کشت گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، نشریه شماره 1352 نشر مؤسسه تحقیقات خاک و آب.
11. بشارتی، ح. ه. خسروی م. مستشاری ک. میرزاشاهی ج. قادری ح. ذبیحی. 1395. بررسی اثر تیوباسیلوس، گوگرد و فسفر بر شاخص‌های رشد ذرت (*L. mays Zea*). در برخی مناطق ایران. تحقیقات کاربردی خاک. جلد 4، شماره 1.
12. بهبود م. ا. گلچین، ح. بشارتی. 1391. تأثیر فسفر و تلقیح با باکتریهای محرک رشد (PGPR) سودوموناس فلورسنتس بر عملکرد، گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) رقم آگریا. نشریه آب و خاک. جلد 26، شماره 02، ص: 260-271.
13. جهان ح. م. م. آریایی، م. ب. امیری و ح. ر. احیایی. 1392. اثر ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه بر خصوصیات کمی و کیفی کنجد (*L. indicum Sesamum*) در شرایط استفاده از گیاهان پوششی خلر (*Lathyrus sp*) و شبدر ایرانی (*Trifolium resopinatum*). نشریه بوم‌شناسی کشاورزی. جلد 5، شماره 1، ص: 1-15.

14. حمیدی، آ.، چوکان ر.، اصغرزاده ا.، دهقان شعار م.، قلاوند ف.ا.، ملکوتی م.ج.، 1388. بررسی اثر کاربرد باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه بر ظهور گیاهچه و استقرار گیاهچه و عملکرد دانه دورگ های دیررس ذرت در مزرعه. مجله به زراعی نهال و بذر، جلد 25 شماره 2 ص: 207-183.
15. حمیدی، آ.، قلاوند، م.، دهقان‌شعار، م.ج.، ملکوتی، ا.، اصغرزاده و ر. چوگان. 1385. اثرات کاربرد باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) بر عملکرد ذرت علوفهای. مجله پژوهش و سازندگی. جلد 19 شماره 1) پی آیند 70 (در زراعت و باغبانی ص: 22-16).
16. خاوازی، ک. 1388. استفاده از باکتری های سودوموناس تولید کننده سیدروفور برای افزایش عملکرد گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، نشریه شماره 1445، نشر مؤسسه تحقیقات خاک و آب.
17. خسروی ه. 1388. دستیابی به دانش فنی تولید کود بیولوژیک از توباکتر برای مزارع گندم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، نشریه شماره 1450. 24 صفحه.
18. خسروی ه. 1392a. کودهای زیستی افزایش دهنده رشد گیاه در ایران: نقاط قوت و ضعف. نشریه مدیریت اراضی، 1(1): 46-33.
19. درزی، م.ت.، م. حاج سیدهادی و ف. رجالی. 1392. تأثیر کاربرد کود دامی و باکتریهای محرک رشد بر برخی ویژگی های مورفولوژیک و عملکرد گیاه دارویی گشنیز (*Coriandrum sativum*). فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. 28 جلد، 3 شماره، ص: 446-434.
20. دست برهان، س. س. زهتاب سلماسی، ص. نصراله زاده؛ ع. توسلی. 1390. تأثیر ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه و مقادیر مختلف نیتروژن شیمیایی بر عملکرد گل و اسانس و کارایی مصرف نیتروژن بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 27، شماره 2، ص: 305-290.
21. ذبیحی، ح.، غ. ثوابی فیروزآبادی، ک. خاوازی و ع. گنج علی. 1388. رشد و عملکرد گندم در پاسخ به تلقیح باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه در سطوح مختلف فسفر. مجله پژوهشهای زراعی ایران جلد 7، شماره 1. ص: 51-41.
22. ذبیحی، ح.، ثوابی غ.، خاوازی ک.، گنجعلی ع. 1388. بررسی تأثیر کاربرد سویه‌هایی از سودوموناسهای فلورسنت بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم در سطوح مختلف شوری خاک، مجله آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد 23، شماره 1، ص: 208-199.
23. رسولی صدقیانی، م.ح.، رحیمیان، ح.، خاوازی، ک.، ملکوتی، م.ج. و اسدی رحمانی، ه. 1384. بررسی تراکم جمعیت و شناسایی سودوموناسهای فلورسنت در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد 19 شماره 2. صفحات - 234-224.
24. رسولی، ز.، س. ملکی فراهانی و ح. بشارتی. 1394. ارزیابی اثر سیستمهای مختلف کودی بر عملکرد زعفران (*Crocus sativus*) فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 31، شماره 2، ص: 219-204.
25. ریحانی تبارع. 1379. بررسی جمعیت پسودوموناسهای فلورسنت در ریزوسفر گندم کشت شده در خاکهای زراعی استان تهران و تعیین پتانسیل آنها برای افزایش رشد گیاهان. پایان نامه کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
26. سادات، ع.، غ. ثوابی، ف. رجالی، م. فرحبخش، ک. خاوازی، م. شیرمردی. 1389. تأثیر چند نوع قارچ میکوریز آربسکولار و باکتری محرک رشد گیاه بر شاخصهای رشد و عملکرد دو رقم گندم در یک خاک شور. نشریه آب و خاک. جلد 24 شماره 1. ص: 62-53.

27. سلطانی طولارود، ع.ا.، پ.عباس زاده دهجی؛ ف. رجالی و ع.اخگر. 1393. بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاکهای زیر کشت لوبیا و تأثیر آنها بر کلونیزاسیون، تعداد اسپور و پتانسیل لوده سازی قارچهای میکوریزی آربوسکولار. مجله زیست شناسی خاک. جلد 2، شماره 1، ص: 65-78.
28. سلطانی طولارود، ع.ا.، عباس زاده دهجی، پ.، خاوازی ک.، اسدی رحمانی، ه.، و شهریاری، م.ح. 1393. بررسی اثرات زیستی قارچکش ویتاواکس R 34 رشد و ماندگاری باکتریهای ریسوسفری محرک رشد گیاه جنس سودوموناس و آزوسپیریولوم. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار جلد چهارم، شماره اول، صفحات: 235-247.
29. سیدشریفی ر.، خاوازی، ک. 1390. تأثیر باکتریهای محرک رشد گیاه بر مولفه های جوانه زنی و رشد گیاهچه
30. سمر، س.م.؛ سماوات، س.؛ تدین، م.س.؛ رضایی ح.؛ طهرانی م.م.؛ اردکانی م.س.؛ بشارتی کلایه ح. و فلاح، ع. 1389. آهن در خاک و گیاه. موسسه تحقیقات خاک و آب.
31. عباس زاده دهجی، پ.، اسدی رحمانی ه.، صالح راستین ن.، خاوازی ک.، سلطانی طولارود ع.ا. 1387. ارزیابی توان تولید اکسین توسط سودوموناس های فلورسنت و اثرات آنها در رشد گیاهچه های کلزا. مجله پژوهشهای خاک (علوم خاک و آب). جلد 23 شماره 2. ص: 216-203.
32. عباس زاده دهجی، پ.، اسدی رحمانی، ه.، ک. خاوازی، سلطانی طولارود، ع.ا.، عبدالرضا اخگر، ع. و امیدواری، م. 1393. تأثیر سودوموناسهای فلورسنت محرک رشد گیاه بر رشد و نمو کلزا. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار جلد 4، شماره 1، صفحات: 201-217.
33. عقیقی شاهرودی، م.، ب. ممیوند و ه. عطایی سماق. 1393. تأثیر پیش تیمار بذر با باکترهای محرک رشد بر شاخصهای جوانه زنی گیاه دارویی ریحان تحت تنش شوری. تحقیقات بذر (علوم و تکنولوژی بذر). جلد 4، شماره 4. ص: 38-5.
34. فلاح، ع. صالح راستین ن.، خاوازی ک. 1378. بررسی باکتری های حل کننده سیلیکات در افزایش پتاسیم قابل جذب برای گیاه ذرت. مجله علوم خاک و آب، جلد 13 شماره 2 ص: 130-120.
35. کشاورزافشار، ر.، م. چایچی، ع. علیپور جهانگیری، م. انصاری جوینی، ح. مقدم، م. احتشامی و ک. خاوازی. 1390. تأثیر محلول پاشی باکتریهای محرک رشد گیاه بر عملکرد علوفه و دانه سورگوم علوفهای رقم اسپید فید (*Sorghum bicolor*) (*var. feed Speed*). مجله علوم گیاهان زراعی ایران (علوم کشاورزی ایران). جلد 42، شماره 3. ص: 575-584.
36. متشع زاده، ب. و غ. ثواقبی. 1390. بررسی پاسخهای آفتابگردان به سمیت کادمیوم و سرب با کاربرد باکتریهای محرک رشد گیاه در یک خاک آهکی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی) جلد 25، شماره 5، ص: 1079-1069.
37. محمدی، ر.، م. علمایی، ر. قربانی نصرآبادی، م. چاکرالاحسینی. 1389. اثرات کود اوره، مواد آلی و باکتریهای محرک رشد گیاه بر جذب نیتروژن و عملکرد گندم رقم الوند در شرایط گلخانه. پژوهشهای تولید گیاهی (علوم کشاورزی و منابع طبیعی). جلد 17، شماره 2. ص: 77-92.
38. ملایی ف. و ح. بشارتی. 1389. بررسی تأثیر باکتریهای محرک رشد گیاه بر خواص کیفی و کمی قارچ در بسترهای مختلف حاصل (*Agaricus bisporus*) دکمه ای از ضایعات صنعتی و کشاورزی مجله پژوهشهای خاک (علوم خاک و آب). جلد 25 شماره 4.
39. ملکزاده، ط. ح. بشارتی و غل. ثواقبی. 1394. تأثیر مصرف گوگرد و باکتریهای *Thiobacillus* بر فراهمی برخی عناصر غذایی در خاکهایی با ظرفیت بافری مختلف. نشریه زیست شناسی خاک، جلد 3 شماره 2.
40. ملکوتی، م.ج.؛ رجالی ف.، خاوازی ک.، خوگر ز.، شهابی ع.ا.، کشاورز پ. و وکیل ر. 1383. بررسی نقش مایه تلقیح ازتوباکتر (PGPR) در افزایش عملکرد گندم آبی و دیم در چند استان کشور، صفحات 167-159 از کتاب مجموعه

- مقالات "روش‌های نوین تغذیه گندم" ملکوتی و همکاران، 1383. وزارت جهاد کشاورزی، دفتر طرح خودکفایی گندم، 851 صفحه.
41. نظارت، س. و ا. غلامی. 1390. بررسی تأثیر باکتریهای محرک رشد گیاه (*Pseudomonas* و *Azospirillum*) بر رشد و عملکرد گیاه ذرت (*Zea mays*). مجله زراعت (پژوهش و سازندگی). جلد 24 شماره 2- پی‌اچ‌اچ: 51-44.
42. نعمتی، ا. ا. گلچین؛ ح. بشارتی. 1394. بررسی اثرات کودهای زیستی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه گوجهرنگی در یک خاک آلوده به کادمیوم. مجله پژوهشهای خاک. جلد 29، شماره 1، ص: 23-36.
43. نکیسا، ن. ح. بشارتی و ح. دورودیان. 1394. اثر باکتری باسیلوس سوبتلیس و مقادیر کودشیمیایی سوپرفسفات تریپل بر عملکرد و اجزای عملکرد دو رقم برنج (علی کاظمی و هاشمی). مجله پژوهشهای خاک. جلد 29، شماره 3، ص: 259-268.
44. نورقلی پور، ف.، خاوازی ک.، بشارتی ح.، فلاح ع. 1385. بررسی تأثیر کاربرد خاک فسفات، گوگرد و باکتری تیوباسیلوس بر عملکرد کمی و کیفی سویا و اثرات باقی مانده آن بر ذرت. 20(1): 122-132.
45. Ali, S.S. and N.N. Vidhale. 2012. Characterization and antifungal activity of siderophore produced by rhizospheric *Pseudomonas fluorescens* against fungal pathogen of soybean and groundnut. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6: 439-443.
46. Arora M, Kaushik A, Rani N, Kaushik CP. 2010. Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *Journal of Environmental Biology*, 31(5): 701-704.
47. Arsenault, T., Goyer, C. and M. Fillion. 2013. Phenazine production by *Pseudomonas* sp LBUM223 contributes to the biological control of potato common scab. *Phytopathology* 103: 995-1000.
48. Ashraf M, Hasnain S, Berge O. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 157-162.
49. Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.-M. and J.M. Ghigo. 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Review* 39: 222-233.
50. Aznar, A. and A. Dellagi. 2015. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: What can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany* 21: 3001-3010.
51. Bailly, A. and L. Weiskopf. 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: Current knowledge and future challenges. *Plant Signalling Behaviour* 7: 79-85.
52. Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. and J.P. Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil* 378: 1-33.
53. Besharati, H. 2017. Effects of sulfur application and Thiobacillus inoculation on soil nutrient availability, wheat yield and plant nutrient concentration in calcareous soils with different calcium carbonate content. *Journal of Plant Nutrition*. 40(3): 447-456.
54. Bhattacharyya, P.N. and D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
55. Blom, D., Fabbri, C., Eberl, E. and L. Weiskopf. 2011. Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacterial volatiles is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1000-1008.
56. Braun, V. and K. Hantke. 2011. Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 15: 328-334.

57. Campbell NA. 1996. Biology. 4th edn, New York: Benjamin, Cumming Publishing Company INC, 1488 p.
58. Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriss, R. and A. Hartmann. 2015. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 subsp. *Plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defence responses towards the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 28: 984–995.
59. Djavaheri, M., Mercado-Blanco, J., Versluis, C., Meyer, J.M., Van Loon, L.C. and P.A.H.M. Bakker. 2012. Ironregulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Microbiology Open* 1: 311–325.
60. Elkahoui, S., Djebali, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R. and F. Limam. 2015. Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 175–185.
61. Fetzner, S. 2015. Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology* 201: 2–14.
62. Frampton, R.A., Pitman, A.R. and P.C. Fineran. 2012. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology* 2012, 11, Article ID 326452. doi:10.1155/2012/326452
63. Gamalero, E. and B.R. Glick. 2015. Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology* 169: 13–22.
64. Gamalero, E., Berta, G., Massa, N., Glick, B.R. and G. Lingua. 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 459–467.
65. Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P. and N.S. Iacobellis. 2015. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* 6: Article ID 1056.
66. Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V. and S. Yaron. 2015. Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 91. doi:10.1093/femsec/fiv074.
67. Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169: 30–39.
68. Gopala Krishnan, S., Sathya, R., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L. and L. Krishnamurthy. 2015. Plant growth promoting rhizobia: Challenges and opportunities. *Biotechnol* 5: 355–377.
69. Herrmann, L. and D. Lesueur. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 8859–8873.
70. Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. and F.O. Pedrosa. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 3: 413–425.
71. Hunziker, L., Bonisch, D., Groenhagen, U., Bailly, A., Schulz, S. and L. Weisskopf. 2015. *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 821–830.
72. Jogaiah, S. 2021. Biocontrol Agents and Secondary Metabolites. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03577-7>

73. Kamle M., Borah R., Bora H., Jaiswal A.K., Singh R.K., Kumar P. 2020. Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR): Role and Mechanism of Action Against Phytopathogens. In: Hesham AL., Upadhyay R., Sharma G., Manoharachary C., Gupta V. (eds) *Fungal Biotechnology and Bioengineering*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41870-0_20.
74. Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M. and M.E. Maffei. 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science* 6: 151. doi:10.3389/fpls.2015.00151
75. Khan, M.S., Zaidi, A. and P.A. Wani. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy and Sustainable Development* 27: 29–43.
76. Kudoyarova, G.R., Melentiev, A.I., Matirtynenko, E.V., Timergalina, L.N., Arkhipova, T.N., Shendel, G.V., Kuzmina, L.Y., Dodd, I.C. and S.Y. Veselov. 2014. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 285–291.
77. LaRossa, R.A. (2001). "Nutritional Mutations". *Encyclopedia of Genetics*. pp. 1362–1363.
78. Larpin S, Sauvageot Ns, Pichereau V, Laplace JM, Auffray Yk. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Bacillus licheniformis* strain isolated from Ropy Cider. *International Journal of Food Microbiology*, 77:1–9.
79. Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S. and J.F. Briat. 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* 321: 513–535.
80. Link, James; Mock, Marissa; Tirrell, David (2003). "Non-canonical amino acids in protein engineering". *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (6): 603–609.
81. Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. and B. Ma. 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9155–9154.
82. Liu, X., Yang, G.M., Guan, D.X., Ghosh, P. and L.Q. Ma. 2015. Catecholate-siderophore produced by As-resistant bacterium effectively dissolved FeAsO₄ and promoted *Pteris vittata* growth. *Environmental Pollution* 206: 376–381.
83. Matthews CE, Van Holde KE, Ahern KG. 1999. *Biochemistry*. 3rd edn. New York: Benjamin, Cumming Publishing Company INC.
84. Mimmo, T., Del buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Pinton, R., Zocchi, G. and S. Cesco. 2014. Rhizospheric organic compounds in the soil–microorganism–plant system: Their role in iron availability. *European Journal of Soil Science* 65: 629–642.
85. Munmun, N., Selin, C., Brassinga, A.K.C., Belmonte, M.F., Fernando, W.G.D., Loewen, P.C. and T.R. de Kievit. 2015. Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematicidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0123184
86. Nagata, T., Oobo, T. and O. Aozasa. 2013. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115: 686–690.
87. Nagpure, A., Choudhary, B. and R.K. Gupta. 2014. Chitinases: In agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology* 34: 215–232.
88. Nascimento, F.X., McConkey, B.J. and B.R. Glick. 2014. New insights into ACC deaminase phylogeny, Evolution and evolutionary significance. *PLoS One* 9 (6): e99168.

89. Orozco-Mosqueda, M.D.C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, R. and E. Valencia-Cantero. 2013. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. *Plant and Soil* 362: 51–66.
90. Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J. and D.N. Dowling. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology* 6: 745 doi:10.3389/fmicb.2015.00745
91. Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C. and P.A. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347–375.
92. Reed, M.L.E. and B.R. Glick. 2013. Applications of plant growth-promoting bacteria for plant and soil systems. In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Maki, M., Tuohy, M. and Mazutti, M.A. (eds.), *Applications of Microbial Engineering*, Taylor and Francis: Enfield, CT, 181–229.
93. Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J. and P. Garbeva. 2015. Volatile affairs in microbial interactions. *ISME Journal* 9: 2329–2335.
94. Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N., Fernando, D. and T.R. de Kievit. 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology* 7: 73–83.
95. Seo, S., Lee, S., Hong, Y. and Y. Kim. 2012. Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperate* subsp. *temperata*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3816–3823.
96. Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K. and J. Vanderleyden. 2014. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist* 201: 850–861.
97. Stearns, J.C., Woody, O.Z., McConkey, B.J. and B.R. Glick. 2012. Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression measured with an *Arabidopsis thaliana* microarray. *Molecular Plant-Microbes Interactions* 25: 668–676.
98. Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K.S. and M.S. Jisha. 2015. Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. *3 Biotech* 5: 831–837.
99. Sulochana, M.B., Jayachandra, S.Y., Kumar, S.A., Parameshwar, A.B., Reddy, K.M. and A. Dayanand. 2014. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174: 297–308.
100. Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J. and E. Perez-Rueda. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4: 236–243.
101. Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. and J. Vangronsveld. 2015. Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports* 7: 40–50.
102. Tudzynski, B., Studt, L. and Rojas, M.C. 2016. Gibberellins in fungi, bacteria and lower plants: Biosynthesis, function and evolution. *Annual Plant Reviews* 49. doi:10.1002/9781119210436.ch5
103. Ullah, I., Khan, A., Park, G.-S., Lim, J.-H., Waqas, M., Lee, I.-J. and J.-H. Shin. 2013. Analysis of phytohormones and phosphate solubilization in *Photorhabdus* spp. *Food Science and Biotechnology* 22: 25–31.

104. Ullah, I., Khan, A.R., Jung, B.K., Khan, A.L., Lee, I.J. and J.H. Shin. 2014. Gibberellins synthesized by the entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* M1021 as one of the factors of rice plant growth promotion. *Journal of Plant Interactions* 9: 775–782.
105. Vasanthi N. L. M. Saleena, and S. Anthoni Raj. 2018. Silica Solubilization Potential of Certain Bacterial Species in the Presence of Different Silicate Minerals. *Silicon* .10, :267–275.
106. Velazquez-Becerra, C., Macias-Rodriguez, L.I., Lopez-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Flores-Cortez, I. and E. Valencia-Cantero. 2011. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant and Soil* 339: 329–340.
107. Welman AD, Maddox IS. 2009. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6): 268-274.
108. Wu, Y.C., Yuan, J., Yaoyao, E., Raza, W., Shen, Q.R. and Q.W. Huang. 2015. Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZSA2 on growth of two fungal pathogens. *Journal of Basic Microbiology* 55: 1104–1117.
109. Xu, Y.Y., Lu, H., Wang, X., Zhang, K.Q. and G.H. Li. 2015. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. *Chemistry and Biodiversity* 12: 1415–1421.
110. Zdor, R.E. 2015. Bacterial cyanogenesis: Impact on biotic interactions. *Journal of Applied Microbiology* 118: 267–274.
111. Zhou, T.T., Li, C.Y., Chen, D., Wu, K., Shen, Q.R. and B. Shen. 2014. phlF(-) mutant of *Pseudomonas Fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt. *Biological Control* 78: 1–8.
112. Bona, E., Lingua, G., Manassero, P., Cantamessa, S., Marsano, F., Todeschini, V., Copetta, A., D'agostino, G., Massa, N., Avidano, L., Gamalero, E. and G. Berta. 2015. AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza* 25: 181–193.
113. Elisa Gamalero, E., and B. R. Glick. 2019. Plant Growth-Promoting Bacteria in Agricultural and Stressed Soils. In: Elsas J. D. and et al (Ed.) *Modern Soil Microbiology*. Pp:361-380. CRC Press ,Taylor & Francis Group.
114. <https://biologyreader.com/rhizosphere.html>.
115. Costa , O.Y.A., J. M. Raaijmakers¹ and E. E. Kuramae. 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>.
116. Alami Y, Achouak W, Marold C, Heulin T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing Rhizobium sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3393-3398.
117. Amellal N, Bartoli F, Villemin G, Talouizte A, Heulin T. 1999. Effects of inoculation of EPS producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant and Soil*, 211: 93-101.
118. Xu, Y.Y., Lu, H., Wang, X., Zhang, K.Q. and G.H. Li. 2015. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. *Chemistry and Biodiversity* 12: 1415–1421.

جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های ایران و بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی در آنها

لاله فریدیان، ژیلای بهارلوئی¹، علیرضا فلاح نصرت آباد و حسین کاری دولت‌آباد

دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان): laleh.faridian@gmail.com

استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان): jbahar5411@yahoo.com

دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: rezafayah@yahoo.com

استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: hossein.kari@gmail.com

ص 163 - 176

دریافت: 1400/5/31 و پذیرش: 1401/9/16

چکیده

کاربرد قارچ‌های حل‌کننده فسفات روشی بیولوژیک و دوست‌دار محیط زیست جهت افزایش فسفر قابل استفاده خاک از منابع نامحلول آن است. هدف این مطالعه دستیابی به قارچ‌های حل‌کننده فسفات است که قابلیت ارائه به عنوان مواد بیولوژیک افزاینده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاه را داشته باشند. در ابتدا 144 جدایه قارچ‌های حل‌کننده فسفات از عمق صفر تا سی سانتی‌متری مزارع ذرت در استان‌های فارس، کرمانشاه و خراسان رضوی در ایران جدا شد. 27 جدایه بیشترین توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را داشتند. براساس آنالیزهای مولکولی، جدایه‌ها متعلق به گونه‌های مختلف چهار جنس‌های قارچ *Aspergillus* (7/5 درصد)، قارچ *Talaromyces* (44/4 درصد)، قارچ *Penicillium* (44/4 درصد) و قارچ *Cladophialophora* (3/7 درصد) بودند. این اولین گزارش از توانایی انحلال فسفر معدنی در جنس قارچ *Cladophialophora* است. بیشترین توانایی انحلال فسفر در محیط جامد را قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA داشت (نسبت قطر هاله به پرگنه 4/11 میلی‌متر) در حالیکه در محیط مایع به ترتیب و بدون اختلاف معنی‌دار قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 (8/23 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA (72/20 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 (50/20 میلی‌گرم در لیتر) و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB (04/20 میلی‌گرم در لیتر)، بیشترین توانایی تولید اکسین (2/9 میلی‌گرم در لیتر) و سیدروفور (نسبت قطر هاله به پرگنه 4/44 میلی‌متر) را به ترتیب قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB نشان دادند. بیشترین مقدار سیانید هیدروژن (درجه 4) توسط قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF 83-1 تولید شد. این نتایج بتانسیل قارچ‌های حل‌کننده فسفات جدا شده از خاک‌های ایران به ویژه قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA، قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB را در کاربرد به عنوان مواد بیولوژیک افزاینده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاه تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بهبود رشد گیاه، قابلیت دسترسی فسفر و مواد بیولوژیک، قارچ‌های حل‌کننده فسفات

¹ نویسنده مسئول، آدرس: گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)

مقدمه

محلول خاک عملکرد کلی گیاهان را بهبود می‌بخشند. این در حالیست که این قارچ‌ها همچنین به واسطه نشان دادن ویژگی‌های دیگری مانند توانایی تولید اکسین، سیدروفور و سیانید هیدروژن که می‌تواند منجر به بهبود رشد گیاه شود نیز شناخته شده‌اند (نازیا و همکاران، 2020؛ وایرول و همکاران، 2011). اکسین یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه است که نقش چشم‌گیری در افزایش زیتوده ریشه و جذب عناصر تغذیه‌ای گیاه دارد (کوهاد و همکاران، 2011). توانایی تولید اکسین در قارچ‌های خاک‌زی به ویژه گونه‌های حل‌کننده فسفات قبلاً به دفعات گزارش شده است (ایناجی و همکاران، 2020؛ منتز و همکاران، 2019 و پراساد و همکاران، 2017). سیدروفورها، ترکیبات زیستی بسیار کوچکی‌اند که برخی از یون‌های فلزی موجود در خاک را به فرم کلات‌های محلول قابل جذب گیاهان تبدیل می‌کنند (ایندیراگانندی و همکاران، 2008). سیدروفورها همچنین با خارج کردن یون فلز مورد نظر از دسترس عوامل بیمارگر گیاهی و سرکوب این عوامل باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (کتی‌یار و همکاران، 2018). برخی قارچ‌ها از طریق تولید آنتی بیوتیک، سیانید هیدروژن و یا القای مقاومت سیستمیک از گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند (پوتشانام و همکاران، 2017). سیانید هیدروژن به واسطه محدود کردن سنتز ATP (Adenosine triphosphate) و تغییر سیتوکروم اکسیداز رشد و فعالیت عوامل بیماری‌زای گیاهی را کاهش داده و رشد گیاه را بهبود می‌دهد (ریجاوک و لاپانجه، 2016). توانایی تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در قارچ‌های حل‌کننده فسفات نیز قبلاً گزارش شده است (دباسیس و همکاران، 2020 و کاری دولت آباد و همکاران، 1398).

وجود قارچ‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های مناطق مختلف جهان به طور گسترده مطالعه شده است، اما تا به حال مطالعات گسترده‌ای در رابطه با وجود آنها در خاک‌های زراعی ایران صورت نگرفته است (بیگلری و

فسفر عنصر زیستی ضروری در روند رشد رویشی و زایشی گیاه است (چن و لیو، 2019). فسفر از اجزای تشکیل‌دهنده DNA (Deoxyribonucleic acid) و RNA (Ribonucleic acid) و مولکول‌های حامل انرژی در گیاهان است و در فرآیندهای بیوشیمیایی آن نقش اساسی دارد (نسمه و همکاران، 2018). مصرف مکرر کودهای شیمیایی فسفات‌ه رایج‌ترین روش تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان در کشاورزی سنتی است. درحالی‌که بررسی‌ها نشان می‌دهد مصرف کودهای شیمیایی فسفات‌ه نه تنها منجر به افزایش هزینه تولید و آلودگی‌های محیطی شده است، بلکه راندمان استفاده از آن در خاک‌های زراعی بسیار کم (10-25 درصد) و فسفر قابل استفاده برای گیاه با این روش ناچیز است (بونونی و همکاران، 2020). کاهش راندمان مصرف کودهای شیمیایی فسفات‌ه در خاک‌های زراعی ناشی از واکنش‌پذیری زیاد فسفر با برخی عناصر خاک مانند کلسیم و آهن و تشکیل کانی‌های نامحلول فسفر است (مندز، 2014). الیاس و همکاران (2016) گزارش کردند که 95-99 درصد فسفر خاک به صورت کانی‌های نامحلول و خارج از دسترس گیاهان است.

برخی ریزجانداران خاک قادر به انحلال کانی‌های نامحلول فسفر و افزایش فسفر قابل استفاده در خاک می‌باشند (تیان و همکاران، 2021). از بین این ریزجانداران، توانایی قارچ‌های حل‌کننده فسفات به دلیل داشتن ساختار هیف مانند و گسترش در عمق بیشتری از خاک بیش از باکتری‌هاست (کوهادت و همکاران، 2011). قارچ‌های حل‌کننده فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی، کانی‌های نامحلول فسفر در خاک را حل کرده، قابلیت دسترسی گیاهان به فسفر را بهبود می‌دهند (جین و همکاران، 2017؛ دویلوم و همکاران، 2020). برخی از این قارچ‌ها همچنین قادرند از طریق تولید آنزیم‌های فسفاتاز فسفر آلی خاک را به شکل معدنی و قابل جذب گیاه تبدیل کنند. قارچ‌های حل‌کننده فسفات با افزایش فسفر

معدنی نامحلول استفاده شد. پلیت‌ها در دمای 27 درجه سلسیوس به مدت 7 روز انکوبه شد. تشکیل هاله در اطراف پرگنه جدایه‌ها نشان دهنده توانایی انحلال تری کلسیم فسفات بود (وونگ و همکاران، 2018). نسبت قطر هاله به قطر پرگنه طی 6 روز اندازه‌گیری و محاسبه شد. جدایه‌های دارای بیشترین نسبت قطر هاله به قطر پرگنه به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و آزمایشات بعدی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی جدایه‌ها از کشت تازه استفاده شد. استخراج DNA جدایه‌ها به روش CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) انجام شد (دویلی و دویلی، 1987). آغازگرهای ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCGTCGCTTATTGATATGC-3') برای تکثیر ناحیه rDNA هسته‌ای به‌کار گرفته شد (وایت و همکاران، 1990). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chane reaction, PCR)، با استفاده از دستگاه ترموسایکر (Techne, Genius FGEN02TP, USA) صورت گرفت. ترکیب واکنش PCR شامل (میکرولیتر) بافر تکثیر: 5 DNA Taq، 1، polymerase: 5/1، dNTP: 1، $MgCl_2$: 1 آغازگرها هر کدام: 1 و آب دیونیزه سترون تا حجم 50 میکرولیتر بود. واکنش واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و برنامه حرارتی شامل 30 چرخه واسرشته سازی DNA در دمای 94 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 50 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، توسعه DNA در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 60 ثانیه و توسعه نهایی در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصول PCR از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (1X) (Tris-Borate-EDTA) عبور داده شد. به منظور تعیین اندازه قطعه DNA تکثیر شده، از نشانگر DNA 100bp Ladder RTU سیناژن استفاده شد. جهت خلص سازی و

همکاران، 2016). مطالعه حاضر با هدف جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از برخی خاک‌های زراعی ایران و بررسی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها صورت گرفت. امید که بتوان به جدایه‌های کارآمدی دست یافت که قابلیت ارایه به عنوان مواد زیستی افزایش دهنده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاهان را داشته باشند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک

خاک مورد آزمایش از عمق صفر تا سی سانتی-متری مزارع ذرت در استان‌های فارس، کرمانشاه و خراسان رضوی نمونه‌برداری شد. مزارع به گونه‌ای انتخاب شد که خاک آن‌ها از لحاظ فسفر زیر حد بحرانی مورد نیاز گیاه باشد. نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس تا زمان جداسازی قارچ‌ها نگهداری گردید.

جداسازی قارچ‌ها

از نمونه‌های خاک سری رقت ده تایی (10^{-2}) تا 10^{-5} تهیه شد. یک دهم میلی‌لیتر از هر رقت (در سه تکرار) به پلیت‌های حاوی محیط کشت (Potato PDA Dextrose Agar) حاوی 0/02 درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین (کاری دولت آباد و همکاران، 1398) با pH 8/5 منتقل شد. پلیت‌ها هفت الی 15 روز در دمای 25 درجه سلسیوس انکوبه شدند (دورواد و همکاران، 2009). قارچ‌های رشد یافته بر اساس تفاوت‌های ظاهری از یکدیگر تفکیک و به پلیت جدید منتقل شدند. به منظور دسترسی به ایزوله‌های کاملاً خالص، هر پلیت سه بار خلص سازی شد.

قابلیت انحلال فسفر معدنی در محیط جامد

یک قرص میسلیمومی پنج میلی‌متری از کشت تازه هر جدایه به پلیت‌های محیط اسپربر (اسپربر، 1985) منتقل شد. ترکیبات محیط اسپربر شامل (گرم بر لیتر): $C_6H_{12}O_6$ (10)، Yeast extrac (0/5)، $CaCl_2$ (0/1)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0/25) و آگار (15) بود. 5/2 گرم در لیتر تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)_2$) به عنوان منبع فسفر

میلی‌لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ نیم مولار) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه در محفظه تاریک نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 535 نانومتر قرائت شد. میزان تولید اکسین جدایه‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد اکسین محاسبه شد (گوردون و وبر، 1951).

ارزیابی قابلیت تولید سیدروفور

توانایی قارچ‌ها در تولید سیدروفور در محیط کشت CAS (Chrome Azurol S) بررسی شد. برای تهیه محیط مورد نظر چهار محلول معرف Fe-Cas، محلول غذایی، محلول کازآمینواسید و محلول بافر به روش الکساندر و زوبرر (1991) تهیه و پس از استریل با یکدیگر مخلوط شد. یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر از کشت تازه جدایه‌ها روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت 17 روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شد. تشکیل هاله نارنجی در اطراف پرگنه نشان‌دهنده توانایی جدایه در تولید سیدروفور بود (راوال و دسای، 2015). نسبت قطر هاله به قطر پرگنه هر جدایه در روزهای 2، 4، 6، 9، 12 و 17 انکوباسیون اندازه‌گیری و محاسبه شد.

ارزیابی قابلیت تولید سیانید هیدروژن

توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن در پلیت‌های شامل محیط TSA (Tryptic Soy Agar) غنی شده با گلايسين (4/4 گرم در لیتر) به روش دونات-کورآ و همکاران (2004) سنجش شد. به این منظور کاغذ صافی آغشته به محلول معرف پیکرات سدیم ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) 0.5% و 2% Na_2CO_3 در قسمت داخلی درب پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت 120 ساعت در 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (تولید بسیار کم)، نارنجی (تولید کم)، قهوه-ای روشن (تولید زیاد) و آجری (تولید بسیار زیاد) که به ترتیب از 0 تا 4 درجه بندی شدند، تعیین شد. دو سویه قارچ حل‌کننده فسفات، تهیه شده از کلکسیون میکروبی

تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از ابزار جستجو BLAST (Basic Local Alignment Search Tool، (آلتشول و همکاران، 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. درخت تبارزایی با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی (ساتو و نای، 1987) توسط نرم افزار MEGA 6 رسم شد.

ارزیابی قابلیت انحلال فسفر معدنی در محیط مایع

برآورد کمی توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در 150 میلی‌لیتر محیط رشد (National Botanical NBRIP Research Institute's phosphate growth medium) در ارلن‌های تلقیح شده با دو قرص پنج میلی‌متری از هر جدایه انجام شد (ونگ و همکاران، 2018). ترکیبات محیط کشت NBRIP شامل (گرم بر لیتر): $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (10)، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5/0)، NaCl (3/0)، KCl (3/0)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3/0)، FeSO_4 (3/0)، MnSO_4 (1/0). 5 گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات به عنوان منبع فسفر معدنی نامحلول استفاده شد. pH محیط کشت بر روی حدود 7 تنظیم شد. محیط تلقیح نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ارلن‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس انکوبه شد. مقدار فسفر محلول نمونه‌ها 2، 3، 6، 10، 13 و 16 روز پس از شروع انکوباسیون با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1600 در طول موج 470 نانومتر قرائت شد.

ارزیابی قابلیت تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین، ابتدا سه قرص میسلومی پنج میلی‌متری از کشت تازه هر جدایه به 25 میلی‌لیتر محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی صفر و 50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال‌تریپتوفان (L-tryptophane) منتقل گردید. پس از 24 ساعت، سوسپانسیون قارچ به مدت 15 دقیقه در 10000 دور سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 4 میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5

به دست آمد. بر اساس بررسی شباهت توالی DNA جدایه‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی، جدایه‌ها به طور متوسط با 7/99 درصد شباهت متعلق به گونه‌های مختلف چهار جنس قارچ *Aspergillus* (7/5 درصد)، قارچ *Talaromyces* (44/4 درصد)، قارچ *Penicillium* (44/4 درصد) و قارچ *Cladophialophora* (3/7 درصد) بودند. توانایی انحلال فسفر در جنس‌های قارچ *Aspergillus* (ونگ و همکاران، 2018)، قارچ *Talaromyces* (دویلیم و همکاران، 2020) و قارچ *Penicillium* (کیاو و همکاران، 2019) قبلاً گزارش شده است. این اولین گزارش از توانایی انحلال فسفر معدنی در جنس *Cladophialophora* است.

حل‌کنندگی فسفر معدنی در محیط کشت

اسپربر جامد نسبت قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها بیانگر معیار توانایی آن‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد بود (جدول 2). نسبت قطر هاله به پرگنه در اکثر جدایه‌ها با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. هفت روز پس از انکوباسیون بیشترین نسبت قطر هاله به پرگنه به ترتیب و با اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) توسط قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA (4/11) و قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 (75/1) ایجاد شد. توانایی سایر جدایه‌ها در انحلال فسفر در شرایط مشابه با اختلاف معنی‌دار تقریباً یک چهارم قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA بود. تفاوت در توانایی انحلال فسفر جدایه‌ها بر اساس فاکتور نسبت قطر هاله به پرگنه احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع، مقدار و سرعت انتشار اسید آلی تولید شده توسط هر جدایه در محیط جامد بوده است (سلوی و همکاران، 2017).

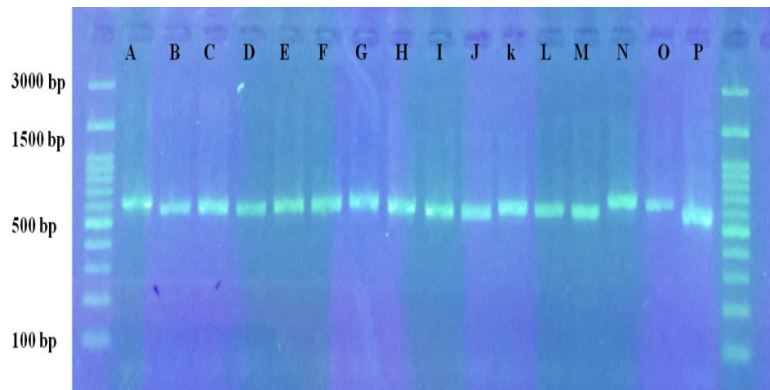
موسسه تحقیقات خاک و آب کرج، به ترتیب به عنوان شاهد مثبت (دارای توان تولید سیانید هیدروژن) و شاهد منفی (عدم توان تولید سیانید هیدروژن) در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید. مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون (Least LSD Significant Difference) در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

فسفر از عناصر زیستی ضروری برای رشد گیاهان است. قارچ‌های حل‌کننده فسفات نقش مهمی در افزایش قابلیت دسترسی گیاهان به فسفر در خاک دارند. در مطالعه حاضر، 384 جدایه قارچ از نمونه‌های خاک سه استان خراسان رضوی، کرمانشاه و فارس جداسازی شد. تشکیل هاله شفاف اطراف پرگنه اثبات کننده توانایی جدایه در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد بود که بر این اساس تنها 144 جدایه (5/37 درصد) حل‌کننده فسفر بودند. از این بین 27 جدایه بیشترین توانایی را در انحلال فسفر نشان دادند (نسبت قطر هاله به پرگنه ≤ 0.5). ارزیابی محصولات حاصل از تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و باند موجود در ژل، تکثیر بخشی از ژنوم به طول تقریبی 600 الی 700 جفت باز را در 27 جدایه برتر را نشان داد (شکل 1). جدول 1، نام، محل جداسازی، خصوصیات پرگنه، نزدیکترین شباهت فیلوژنتیکی و شماره دسترسی این جدایه‌ها را در پایگاه جهانی (NCBI National Center for Biotechnology Information) نشان می‌دهد. اکثر جدایه‌ها (15/48 درصد) از نمونه‌های خاک استان فارس

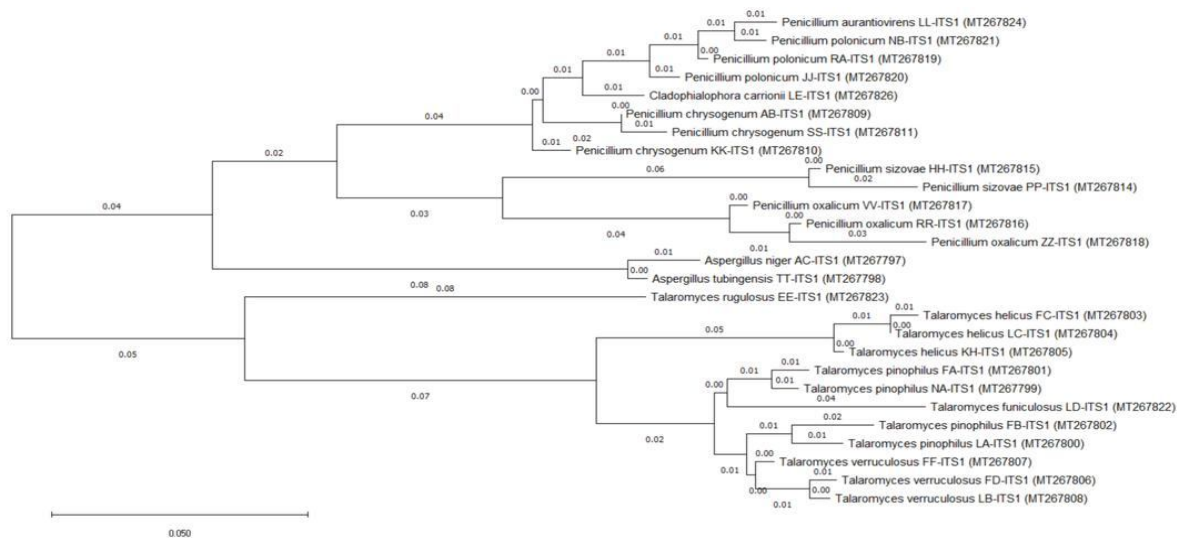


شکل 1 - باند DNA مربوط به تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای جدایه‌های قارچی به کمک آغازگر ITS1 و ITS4 در ژل آگارز یک درصد

A: *Aspergillus niger* (PF198), B: *Aspergillus tubingensis* (PF 140-2), C: *Talaromyces pinophilus* (MFA), D: *Talaromyces pinophilus* (PF174), E: *Talaromyces pinophilus* (1FB), F: *Talaromyces pinophilus* (PF 140-1), G: *Talaromyces helicus* (PF136-2), H: *Talaromyces helicus* (PF101-1), I: *Talaromyces helicus* (PF 121-2), J: *Talaromyces verruculosus* (PF 157-2), K: *Talaromyces verruculosus* (15FI1), L: *Talaromyces verruculosus* (PF105 II), M: *Talaromyces funiculosus* (PF 48), N: *Talaromyces rugulosus* (46 FA), O: *Penicillium chrysogenum* (48 FA), P: *Penicillium sizovae* (PF 40-2).

جدول 1- نام، محل جداسازی، نزدیکترین شباهت فیلوژنتیک، درصد شباهت و شماره ثبت جدایه‌ها در پایگاه جهانی NCBI

ردیف	قارچ	جدایه	شماره ثبت	درصد شباهت	استان محل جداسازی	کد
1	<i>Aspergillus niger</i>	PF198	MT267797	100	کرمانشاه	AC-ITS1
2	<i>Aspergillus tubingensis</i>	PF140-2	MT267798	100	خراسان رضوی	TT-ITS1
3	<i>Talaromyces pinophilus</i>	MFA	MT267799	99	فارس	NA-ITS1
4	<i>Talaromyces pinophilus</i>	PF174	MT267800	100	کرمانشاه	LA-ITS1
5	<i>Talaromyces pinophilus</i>	1FB	MT267801	99	فارس	FA-ITS1
6	<i>Talaromyces pinophilus</i>	PF140-1	MT267802	100	خراسان رضوی	FB-ITS1
7	<i>Talaromyces helicus</i>	PF136-2	MT267803	100	خراسان رضوی	FC-ITS1
8	<i>Talaromyces helicus</i>	PF101-1	MT267804	100	خراسان رضوی	LC-ITS1
9	<i>Talaromyces helicus</i>	PF121-2	MT267805	100	خراسان رضوی	KH-ITS1
10	<i>Talaromyces verruculosus</i>	PF157-2	MT267806	100	کرمانشاه	FD-ITS1
11	<i>Talaromyces verruculosus</i>	15FAI	MT267807	99	فارس	FF-ITS1
12	<i>Talaromyces verruculosus</i>	PF105II	MT267808	100	خراسان رضوی	LB-ITS1
13	<i>Talaromyces funiculosus</i>	PF48	MT267822	99	فارس	LD-ITS1
14	<i>Talaromyces rugulosus</i>	46FA	MT267823	100	فارس	EE-ITS1
15	<i>Penicillium chrysogenum</i>	48FA	MT267811	100	فارس	SS-ITS1
16	<i>Penicillium sizovae</i>	PF40-2	MT267814	99	فارس	PP-ITS1
17	<i>Penicillium sizovae</i>	PF37-1	MT267815	100	فارس	HH-ITS1
18	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF104	MT267816	100	خراسان رضوی	RR-ITS1
19	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF83-1	MT267817	100	خراسان رضوی	VV-ITS1
20	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF81-2	MT267818	100	خراسان رضوی	ZZ-ITS1
21	<i>Penicillium polonicum</i>	PF16	MT267819	100	فارس	RA-ITS1
22	<i>Penicillium polonicum</i>	PF45-2	MT267820	99	فارس	JJ-ITS1
23	<i>Penicillium polonicum</i>	18FB	MT267821	100	فارس	NB-ITS1
24	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PF58-1	MT267809	99	خراسان رضوی	AB-ITS1
25	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PF44-1	MT267810	99	فارس	KK-ITS1
26	<i>Penicillium aurantiovirens</i>	48FA	MT267824	100	کرمانشاه	LL-ITS1
27	<i>Cladophialophora carrionii</i>	PF8	MT267826	100	فارس	LE-ITS1



* از نرم افزار MEGA6 جهت ترسیم درخت تبارزایی استفاده شد.
 شکل 2- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 نشان دهنده موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

جدول 2- مقایسه میانگین توان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت اسپربر جامد

ردیف	جدایه	زمان (بر حسب روز)					نسبت قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها
		8	5	4	3	2	
1	PF 198	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1 e
2	PF 140-2	1.17 df	1.17 dg	1.17 df	1 ef	1 e	1 e
3	MFA	4.11 a	4.11 a	4.11 a	4.11 a	4.11 a	3.33a
4	PF 174	1.32 ce	1.32 bf	1.23 cf	1.23 ce	1.19 de	1.22 cd
5	1FB	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1 e
6	PF 140-1	1.4 cd	1.4 bd	1.4 bc	1.4 bc	1.4 cd	1.33 c
7	PF 136-2	0.79 g	0.62 i	0.63 h	0.34 g	1 e	0 g
8	PF 101-1	1.26 df	1.37 be	1.12 dg	1.2 ce	1.07 e	1 e
9	PF 121-2	1.07 eg	1.1 eh	1.04 fg	0 h	0 g	0 g
10	PF 157-2	1.75 b	1.59 b	1.52 b	1.41 bc	1.6 bc	1.6 b
11	15 FAI	1.04 fg	1.04 fg	1.04 fg	1.09 ef	1.08 e	1.09 de
12	PF 105 II	1.3 df	1.14 dh	1.09 eg	1.23 ce	1.24 de	1 e
13	PF 48	1.11 df	1.06 fg	1 fg	1 ef	1 e	1 e
14	46 FA	1.19 df	1.37 be	1.35 bd	1.19 ce	1 e	0 g
15	48 FA	1 fg	1 gh	1.07 eg	1.53 b	1.86 b	b 1.6
16	PF 40-2	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1 e
17	PF 37-1	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1 e
18	PF 104	1 fg	0.94 h	0.84 gh	0.83 f	0.5 f	0.51 f
19	PF 83-1	1.3 df	1.49 bc	1.5 bc	1.38 bd	1.12 de	1 e
20	PF 81-2	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1 e
21	PF 16	1.25 df	1.25 cg	1.24 cf	1.06 ef	1 e	1 e
22	PF 45-2	1.25 df	1.25 cg	1 fg	1 ef	1 e	0 g
23	18 FB	1 fg	1 gh	0.97 fg	1 ef	1 e	1 e
24	PF 58-1	1.29 df	1.24 cg	1.24 cf	1.23 ce	1.08 e	1.05 de
25	PF 44-1	1.25 df	1.25 cg	1.15 df	1 ef	1 e	0 g
26	PF 146	1.64 bc	1.57 b	1.52 b	1.41 bc	1.1 e	1 e
27	PF 8	1.17 df	1.16 dg	1.16 df	1.16 de	1 e	1 e

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

حل‌کنندگی فسفر معدنی در محیط کشت مایع (NBRI Broth)

بیشترین مقدار فسفر محلول به ترتیب و بدون اختلاف معنی‌دار ($p < 05/0$) توسط قارچ *verruculosus* *Talaromayces* جدایه PF 157-2 (8/23 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Talaromayces pinophilus* جدایه MFA (72/20) 140-2 (5/20 میلی‌گرم در لیتر) و قارچ *pinophilus* PF (9/11 میلی‌گرم در لیتر) تولید شد. کمترین مقدار فسفر محلول (9/11 میلی‌گرم در لیتر) نیز در محیط تلقیح شده با قارچ *Talaromyces helicus* جدایه PF 136-2 سنجش شد. بر اساس نتایج جدایه‌هایی که بیشترین نسبت قطر هاله به پرگنه را در محیط جامد ایجاد کردند اغلب بیشترین توانایی انحلال فسفر را نیز در محیط مایع نشان دادند چیزی که با نتایج جمشیدی و همکاران (1397) مطابقت و با نتایج الیاس و همکاران (2016) و آلم و همکاران (2002) در تضاد بود.

توانایی انحلال فسفر معدنی جدایه‌ها با سنجش مقدار فسفر محلول در محیط مایع غنی شده با تری کلسیم فسفات تأیید گردید (جدول 3). با افزایش زمان انکوباسیون مقدار فسفر محلول تمام جدایه‌ها افزایش یافت. شانزده روز پس از انکوباسیون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع بین 23-8/9/11 میلی‌گرم در لیتر متغییر بود ($p < 05/0$). جیان و همکاران (2017) و الیاس و همکاران (2016) این توانایی را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات به ترتیب بین مقدارهای 1114-69 میلی‌گرم در لیتر و 728-514 میکروگرم در لیتر گزارش کردند.

جدول 3- مقایسه میانگین توان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت مایع (NBRI Broth)

مقدار فسفر محلول (میلی‌گرم در لیتر) تولید شده توسط جدایه‌ها						جدایه	ردیف
زمان (بر حسب روز)							
16	13	10	6	3	2		
17.36 b	16.4 fi	14.91 ij	13.67 cd	13.01 cd	3.74 gi	PF 198	1
20.50 a	20.4 b	20.03 a	14.03 b	12.79 ef	4.55 bc	PF140-2	2
20.72 a	16.51 fi	16.38 df	13.62 cd	13.53 c	5.28 a	MFA	3
16.59 c	15.51 ik	14.09 jk	11.91 e	6.66 m	2.84 mn	PF 174	4
20.04 a	19.74 c	18.01 c	8.24 n	6.64 mo	2.68 n	1FB	5
17.02 bc	17.44 eh	16.94 d	13.93 c	7.26 lo	3.27 kl	PF 140-1	6
11.9 ij	11.89 mn	11.05 mn	9.75 j	5.7 o	4.07 ce	PF 136-2	7
18.01 b	17.97 ef	16.14 dh	14.91 a	7.24 lo	3.66 gi	PF 101-1	8
16.26 cd	15.03 jk	10.4 n	9.15 k	8.19 kn	3.97 eg	PF 121-2	9
23.8 a	21.57 a	19.16 b	14.93 a	14.83 a	3.66 gi	PF 157-2	10
16.97 bc	16.55 fi	15.32 di	14.87 a	5.32 o	3.89 fg	15 FAI	11
16.51 c	16.1 ij	14.17 ik	11.67 ef	4.17 p	3.45 il	PF 105 II	12
17.63 b	17.53 eh	16.64 de	15.1 a	13.91 b	3.24 kl	PF 48	13
19.03 b	19.01 d	16.91 d	14.99 a	9.32 k	5.43 a	46 FA	14
13.9 fh	13.28 lm	11.75 ln	6.18 o	4.96 op	4.65 b	48 FA	15
15.49 ce	14.33 kl	13.92 hl	12.61 ce	11.43 j	3.55 ik	PF 40-2	16
14.07 eh	13.27 lm	12.16 kn	10.23 h	4.08 p	2.89 mn	PF 37-1	17
16.94 bc	15.56 ik	12.74 jm	10.59 gh	3.92 pq	3.53 ik	PF 104	18
18.06 b	17.92 ef	16.23 dg	13.81 c	12.22 fi	4.24 cd	PF 83-1	19

17.9 b	17.79 eg	10.26 n	6.17 o	5.73 o	4.3 cd	PF 81-2	20
17.67 b	17.54 eh	12.22 n	9.13 kl	6.57 n	4.69 b	PF 16	21
13.64 fh	12.56 m	11.3mn	10.48 gh	8.31 km	3.14 lm	PF 45-2	22
12.88 hi	12.07 m	10.8 mn	8.99 m	7.25 lo	4.64 b	18 FB	23
16.91 bc	15.01 jk	12.71 jm	10.01 hi	9.01 k	3.62 hi	PF 58-1	24
14.71 dg	13.22 lm	12.5 kl	10.55 gh	7.04 lo	2.86 mn	PF 44-1	25
16.78 bc	13.62 lm	13.61 il	12.86 d	8.4 kl	3.72 gi	PF 146	26
14.76 dg	14.52 kl	11.28 mn	10.99 g	5.6 o	3.58 hj	PF 8	27

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

تولید اکسین

یکی از روش‌های تأثیر قارچ‌ها بر بهبود رشد گیاهان تولید هورمون اکسین است. اسیدآمینو ال-تریپتوفان پیش‌نیاز تولید اکسین در اغلب ریزجانداران می‌باشد (وارالاکشیم و مالیجا، 2012). بر اساس نتایج، اضافه کردن اسیدآمینو ال-تریپتوفان به محیط توانایی تولید اکسین را در 74 درصد جدایه‌ها افزایش و در دیگر جدایه‌ها کاهش داد (جدول 4). این نتیجه با یافته‌های اصغر و همکاران (2004) و اسکوپ و بلواسکی (2013) مطابقت داشت. ایشان گزارش کردند که برخی از ریزجانداران دارای مسیرهای مستقل از ال-تریپتوفان در سنتز اکسین هستند به طوری که اضافه کردن ال-تریپتوفان به محیط کشت با تأثیر منفی بر سرعت تشکیل اکسین، مقدار این هورمون را در این موجودات کاهش می‌دهد. بیشترین مقدار اکسین (2/9 میلی‌گرم در لیتر) توسط قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و در محیط حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر ال-تریپتوفان تولید شد که 1/47 درصد بیش از متوسط اکسین تولید شده توسط سایر جدایه‌ها در این شرایط بود. این جدایه همچنین یکی از مؤثرترین جدایه‌ها در انحلال فسفر در محیط مایع بود (بدون اختلاف معنی‌دار با جدایه برتر در این ویژگی). در تأیید این نتیجه یاداو و همکاران (2011) تولید 52-85 میلی‌گرم در لیتر اکسین توسط قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* را گزارش کردند. میرخانی و همکاران

(1395) نیز توانایی تولید اکسین را در دو جدایه قارچ

Trichoderma حل‌کننده فسفات T77-3 و T48-2 به ترتیب به میزان 9/39 و 40/7 میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند.

تولید سیدروفور

سیدروفورها ترکیبات زیستی آلی‌ای هستند که با جذب یون‌های فلزی نامحلول به ویژه آهن آن را به فرم قابل جذب گیاهان تبدیل می‌کنند (ایندیراگاندی و همکاران، 2008). توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور متفاوت و تنها 16 جدایه (59 درصد) قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول 4). با افزایش زمان انکوباسیون توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور (نسبت قطر هاله به پرگنه) افزایش یافت که با گزارش فریرا و همکاران (2019) مبنی بر افزایش توانایی تولید سیدروفور در ریزجانداران با افزایش زمان انکوباسیون و ورود آن‌ها به فاز ثابت رشد، مطابقت داشت. بیشترین نسبت قطر هاله به پرگنه (4/44) هفده روز پس از انکوباسیون توسط قارچ *Talaromayces pinophilus* جدایه IFB ایجاد گردید. این جدایه همچنین یکی از مؤثرترین جدایه‌ها در انحلال فسفر در محیط مایع بود (بدون اختلاف معنی‌دار با جدایه برتر در این ویژگی). تفاوت در نوع سیدروفور تولیدی هر جدایه و مقدار آن احتمالاً علت اصلی تفاوت در قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها می‌باشد (سیلوا و همکاران، 2020؛ آمین و همکاران، 2019 و طهماسبی و همکاران 1393).

جدول 4- مقدار اکسین (میلی‌گرم بر لیتر در روز) و سیدروفور (قطر هاله به قطر پرگنه) جدایه‌ها

ردیف	جدایه	اکسین						ال-تریپتوفان (میلی‌گرم بر لیتر)	جدایه	ردیف	
		سیدروفور زمان (بر حسب روز)									
		17	12	9	6	4	2				
		50						صفر			
		1/38 f	1/38 gh	1/38 f	1/37 fg	1/33 e	1/3 f	6/25 df	8/94 a	PF198	1
		2/2 e	1/69 f	1/6 ef	0 i	0 g	0 g	9/2 a	2/95 hi	PF140-2	2
		3/2 b	2/78 bc	2/1 d	1/7 e	0 g	0 g	2/8 n	4/44 ed	MFA	3
		2/64 c	2/64 cd	2/58 ab	2/58 ab	2/56 a	1/66 e	4/44 lk	2/51 ij	PF174	4
		4/44 a	4/1 a	2/77 a	2/76 a	2/62 a	2/5 a	4/95 ik	0/2 l	1FB	5
		2/62 c	3/06 b	2/49 bc	2/29 b	2/22 b	2/06 b	7/69 b	3/37 gh	PF140-1	6
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/64 fh	4/57 d	PF136-2	7
		3/11 b	3/07 b	1/91 e	1/84 d	1/8 d	1/8 d	3/75 m	2/ 62 ij	PF101-1	8
		2/5 d	2/29 de	1/83 e	1/74 ed	1/72 d	1/72 e	6/87 c	2/24 jk	PF121-2	9
		2/26 e	2/21 e	2/2 d	2/13 c	2/04 c	1/94 c	4/56 k	0.8 l	PF157-2	10
		1 i	1/01 h	1 h	1 h	1 f	0 g	6/84 cd	8/64 a	15FAI	11
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	1/9 o	3/56 gf	PF105II	12
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/74 jk	1/77 k	PF48	13
		1/44 f	1/43 gh	1/41 f	1/29 g	1/27 e	1/23 f	5/94 eg	7/02 b	46FA	14
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/74 jk	1/77 k	48FA	15
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	8/66 a	6/3 c	PF40-2	16
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/25 hj	3/9 eg	PF37-1	17
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/47 k	2/16 jk	PF104	18
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/44 lk	0/74 l	PF83-1	19
		1/26 fg	1/26 gh	1/26 fg	1/26 g	1/22 e	0 g	8/82 a	3/37 gh	PF81-2	20
		1/16 gh	1 h	1 h	1 h	1 f	0 g	1/23 p	0/23 l	PF16	21
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	6/29 ce	8/9 a	PF45-2	22
		1/07 gi	1/07 h	1/07 gh	1/02 h	1 f	0 g	5/21 hj	4/05 df	18FB	23
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/38 hg	7/05 b	PF58-1	24
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	1/2 p	2/29 jk	PF44-1	25
		1 i	1 h	0 i	0 i	0 g	0 g	0/69 p	0/23 l	PF146	26
		1/06 hi	1 h	1 h	1 h	0 g	0 g	3/84 lm	0/78 l	PF8	27

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

تولید سیانید هیدروژن

مربوط به قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF83-1 بود. قابل ذکر است که توانایی قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF83-1 در انحلال فسفر، تولید اکسین و به ویژه سیدروفور در مقایسه با جدایه‌های برتر در این زمینه‌ها اغلب بسیار کمتر بود چیزی که قابلیت کاربری آن را جهت بهبود رشد گیاه به شدت کاهش می‌دهد. نهایتاً مقایسه توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفر و تولید متابولیت‌های بهبود دهنده رشد گیاه نشان داد که

توانایی تولید سیانید هیدروژن جدایه‌ها به ترتیب از 0 (عدم تولید) تا 4 (تولید بسیار زیاد) درجه بندی شد (جدول 5). 6/92 درصد جدایه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن داشتند. همچنان که پراساد و همکاران (2017) و شارما و چادهاری (2020) توانایی تولید سیانید هیدروژن را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات گزارش کرده بودند. بیشترین توانایی تولید سیانید هیدروژن (درجه 4)

توانایی زیاد در انحلال فسفر به ویژه در محیط مایع و بیشترین توانایی به ترتیب در تولید اکسین و سیدروفور مزیت‌هایی هستند برای کاربرد این جدایه‌ها به عنوان مواد زیستی افزایش دهنده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود رشد گیاه.

ویژگی‌های قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA و قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 شامل: بیشترین توانایی انحلال فسفر در محیط جامد و مایع ضمن تولید اکسین و سیدروفور و ویژگی‌های قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB شامل:

جدول 5- مقدار کیفی سیانید هیدروژن تولید شده توسط جدایه‌ها در 120 ساعت

ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن	ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن	ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن
1	PF 198	0	10	PF 157-2	1	19	PF 83-1	4
2	PF140-2	0	11	15 FAI	1	20	PF 81-2	0
3	MFA	1	12	PF 105 II	0	21	PF 16	1
4	PF 174	2	13	PF 48	1	22	PF 45-2	1
5	1 FB	1	14	46 FA	1	23	18 FB	1
6	PF 140-1	1	15	48 FA	1	24	PF 58-1	0
7	PF 136-2	3	16	PF 40-2	2	25	PF 44-1	0
8	PF 101-1	1	17	PF 37-1	1	26	PF 146	0
9	PF 121-2	1	18	PF 104	1	27	PF 8	1

* درجه‌های 0، 1، 2، 3 و 4 به ترتیب بیانگر: عدم تولید، تولید بسیار کم، تولید کم، تولید زیاد و تولید بسیار زیاد سیانید هیدروژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بهبود رشد گیاه مانند تولید اکسین، سیدروفور و سیانید هیدروژن نیز بودند. کاربرد این جدایه‌ها به ویژه قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA، قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB احتمالاً گام مؤثری در جهت افزایش فسفر قابل استفاده خاک و متعاقباً بهبود رشد گیاه خواهد بود.

واکنش‌پذیری زیاد فسفر با خاک و تشکیل فرم‌های نامحلول آن راندمان مصرف کودهای شیمیایی فسفره را در اراضی کشاورزی به شدت کاهش داده است. هدف این مطالعه دستیابی به قارچ‌های حل‌کننده فسفات دارای ویژگی‌های محرک رشد گیاه جهت افزایش حلالیت فسفر در خاک و بهبود رشد گیاهان بود. این مطالعه به جدایه‌هایی از قارچ حل‌کننده فسفات دست یافت که ضمن توانایی انحلال فسفر دارای ویژگی‌های

فهرست منابع:

1. طهماسبی، ف.، لکزبان، الف.، خاوازی، گ و پاکدین پاریزی، ع. 1393. جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید سیدروفور در باکتری‌های سودوموناس و تأثیر آن بر رشد ذرت در محیط آبکشت. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد 7. شماره 1.
2. کاری دولت‌آباد، ح.، اسدی رحمانی، ه و رجالی، ف. 1398. شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی و بیوکنترلی قارچهای اندوفیت جدا شده از برگ و میوه پسته.
3. میرخانی، ف.، علایی، ح.، محمدی، ا.ح. و حقدل، م. 1395. شناسایی گونه‌های غالب تریکودرما در باغات پسته‌ی استان کرمان. نشریه حفاظت گیاهان 30 (1): 82-91.
4. Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. Rashid, M. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. 4, pp. 454-458.
5. Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12 (1):39-45.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402.
7. Ameen, F., AlYahya, S. A., AlNadhari, S., Alasmari, H., Alhoshani, F. and Wainwright, M. 2019. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in desert soils: species, limitations and mechanisms. *Archives of Agronomy and Soil Science* 65:1446-1459. doi.org/10.1080/03650340.2019.1566713.
8. Asghar, H. N., Zahir, Z. A. and Arshad, M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural research*. 55: 187-194.
9. Biglari, N., Hassan, H. M. and Amini, J. 2016. The ability of *Streptomyces spp.* isolated from Iranian soil to solubilize rock phosphate. *Advances in Bioscience & Clinical Medicine* 4 (3).
10. Bononi, L., Chiaramonte, J. B., Pansa, C. C. and et al. 2020. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma spp.* from Amazon soils improve soybean plant growth. *scientific reports* 10, 2858. doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8.
11. Chowdhary, K. and Sharma, S. 2020. Plant growth promotion and biocontrol potential of fungal endophytes in the inflorescence of *Aloe vera* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 90:1045-1055. doi.org/10.1007/s40011-020-01173-3.
12. Debasis, M., Snežana, A., Panneerselvam, P., Ansuman, S., Tanja, V., Ganeshamurthy, A. N., Manisha, Ch., Navendra, U., Bhaswatimayee, M and Radha, T. K. 2020. Phosphate-Solubilizing Microbes and Biocontrol Agent for Plant Nutrition and Protection: Current Perspective. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* .Volume 51, Issue 5. doi.org/10.1080/00103624.2020.1729379.
13. Doilom, M., Guo, J-W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., Liao, C-F., Yan, K., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., Lumyong, S. and Xu, J-C. 2020. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in microbiology* 11:585215. doi: 10.3389/fmicb.2020.585215.

14. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, Mand Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil* 266:261-272.
15. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry* 19:11-15.
16. Durowade, K. A., Kolawole, O. M., Uddin, R. O and Enonbun, K. I. 2009. Isolation of Ascomycetous Fungi from a Tertiary Institution Campus Soil. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, Vol. 12 (4): 57-61.
17. Elias, F., Woyessa, D. and Muleta, D. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*.
18. Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, A., Sousa, C. A, Soares, H. M. V. M. and Soares. E. V. 2019. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express* 9 (78).
19. Gordon, S. A. and Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology* 26(1): 192–195.
20. Inaji, A., Okazawa, A., Taguchi, T., Nakamoto, M., Katsuyama, N., Yoshikawa, R., Ohnishi, T., Waller, F. and Ohta, D. 2020. Rhizotaxismodulation in *arabidopsis* induced by diffusible compounds produced during the cocultivation of *Arabidopsis* and the endophytic fungus *Serendipita indica*. *Plant and Cell Physiology* 61:838–850.
21. Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M. and Sa, T. M. 2008. Characterization of plant growth- promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* 56:327–333.
22. Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. 2017. The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycology* 8 (2) :104 – 110 <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1314389>.
23. Katiyar, D., Hemantaranjan, A. and Dwivedi, P. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria and their roles as fungal biocontrol agents: An overview. *Journal of Plant Science and Research* 34:127–136.
24. Kuhad, R. C., Singh, S., Lata. and Singh, A. 2011. Phosphate-solubilizing microorganisms. In: Singh A, Parmar N, Kuhad RC, editors. *Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol*. chapter 4. Berlin, Heidelberg: Springer. 65-84.
25. Meents, A. K., Furch, A. C. U., Almeida-Trapp, M., Özyürek, S., Scholz, S. S., Kirbis, A., Lenser, T., Theißen, G., Grabe, V., Hansson, B., Mithöfer, A. and Oelmüller, R. 2019. Beneficial and pathogenic arabidopsisroot-interacting fungi differently affect auxin levels and responsive genes during early infection. *Frontiers in microbiology* 10:380. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00380.
26. Mendez, J. 2014. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from the arid soils of a semi-desert region of north-east Mexico. *Biological Agriculture & Horticulture* 30(3):211–217.
27. Naziya, B., Murali, M. and Amruthesh, K. N. 2020. Plant growth-promoting fungi (PGPF) instigate plant growth and induce disease resistance in *Capsicum annuum* L. upon infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby. *Biomolecules* 10(41). [doi:10.3390/biom10010041](https://doi.org/10.3390/biom10010041).
28. Nesme, T., Metson, G. S. and Bennett, E. M. 2018. Global P flows through agricultural trade. *Global Environmental Change* 50:133–141. [doi: 10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004).
29. Prasad, M. R., Sagar, B. V., Devi, G. U., Triveni, S., Rao, S. R. K. and Chari, K. D. 2017. Isolation and Screening of Bacterial and Fungal Isolates for Plant Growth Promoting Properties from Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6 (8):753-761.

30. Potshangbam, M., Dev, S. I., Sahoo, D. and Strobel, G. A. 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in Microbiology* 8:325.
31. Qiao, Huan., Sun, Xiao-Rui., Wu, Xiao-Qin., Li, Gui-E., Wang, Zao. and Li, De-Wei. 2019. The phosphate-solubilizing ability of *Penicillium guanacastense* and its effects on the growth of *Pinus massoniana* in phosphate-limiting conditions. *Biology Open* 8 (11): bio046797. doi.org/10.1242/bio.046797.
32. Raval, A. and Desai, P. 2015. Screening and characterization of several siderophore producing bacteria as plant growth promoters and biocontrolling agents. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 6(10):4803-4811.
33. Rijavec, T. and Lapanje, A. 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontier in Microbiology* 7:1785. doi: 10.3389/fmicb.2016.01785.
34. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.
35. Selvi, K. B., Paul, J. A., Vijaya, V. and et al. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology* 3:1.
36. Silva, M. G., de Curcio, J. S., Silva-Bailão, M. J. and et al. 2020. Molecular characterization of siderophore biosynthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. *IMA Fungus* 11:11. doi: 10.1186/s43008-020-00035-x.
37. Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9:778-781.
38. Szkop, M. and Bielawski, W. 2013. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103:683–691.
39. Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S. and Liu, X. 2021. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology* 10, 158.
40. Varalakshmi, P. and Malliga, P. 2012. Evidence for production of Indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) on the growth of *H. annus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(3):1-15.
41. Viruel, E., Lucca, M. E. and Siñeriz, F. 2011. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology* 193:489–496.
42. Wang, X., Wang, C., Sui, J., Liu, Z., Li, Q., Ji, C. and et al. 2018. Isolation and characterization of phosphofungi, and screening of their plant growth-promoting activities. *Amb Express* 8, 63. 10.1186/s13568-018-0593-4.
43. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18(1):315-322.
44. Yadav, J., Verma, J. P. and Tiwari, K. N. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian Journal of Biological Sciences* 4:291-299.

اثر کاربرد باکتری محرک رشد مولد بیوفیلیم و اسید آمینه تریتوفان بر عملکرد و غلظت کادمیوم در اندام‌هوایی گیاه چاودار

اسماعیل کریمی¹، شکوفه محمدی و عزت‌اله اسفندیاری

استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه؛ sm_ka80@yahoo.com

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه مراغه؛ mohammadi.ms@yahoo.com

استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه؛ esfand1977@yahoo.com

ص 177 - 191

دریافت: 1400/2/26 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

با توجه به اجتناب‌ناپذیر بودن ورود عنصر کادمیوم به خاک‌ها و سمیت این عنصر، لازم است که از ورود آنها به زنجیره غذایی به‌ویژه از طریق جذب توسط گیاهان جلوگیری نمود. باکتری‌های محرک رشد گیاهان با قابلیت تولید بیوفیلیم و تولید اکسین می‌توانند مانع ورود عناصر سنگین به اندام‌های هوایی گیاهان زراعی گردند. در این راستا آزمایشی در قالب طرح فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به روش هیدروپونیک طراحی و اجرا شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل سطوح کادمیوم (صفر، 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر)، مایه‌زنی باکتریایی (مایه‌زنی باکتری *Bacillus atrophaeus* 54-1 و عدم مایه‌زنی) و سطوح تریتوفان (عدم کاربرد و کاربرد با غلظت 100 میلی‌گرم تریتوفان در لیتر) بود. نتایج نشان دادند که افزودن تریتوفان و مایه‌زنی باکتریایی منجر به افزایش 19 درصدی عملکرد ماده خشک چاودار در مقایسه با شاهد شد. همچنین، کاربرد تلفیقی تریتوفان در غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم در لیتر به‌همراه مایه‌زنی باکتریایی به ترتیب سبب کاهش 100 و 62 درصدی غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی چاودار گردید. کاربرد تریتوفان میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن را در مقادیر 50 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر به ترتیب 30 و 42 درصد و در شرایط 100 میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم به میزان 34 و 32 درصد کاهش داد که حاکی از بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی چاودار در اثر کاربرد تریتوفان می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد با مطالعات تکمیلی‌تر بتوان از این تیمارها جهت افزایش عملکرد و کاهش ورود کادمیوم به زنجیره غذایی از طریق گیاهان در شرایط خاک‌های مبتلا به آلودگی کادمیوم بهره‌برداری کرد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور انتقال، فاکتور تغلیظ زیستی، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

¹ نویسنده مسئول، آدرس: مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی خاک

مقدمه

انتقال و توزیع اکسین در گیاه بوده و در اثر اختلال در بیوسنتز آن توزیع هورمون یاد شده با اشکال مواجه می‌گردد (راجکومار و همکاران، 2013). از دیگر اثرات منفی تجمع کادمیوم در گیاه افزایش غلظت اکسید نیتریک⁴، بازدارنده تولید و انتقال اکسین، می‌باشد (یوان و هونگ، 2016). کاربرد اکسین خارجی می‌تواند کاهش بیوسنتز اکسین در گیاه را در اثر تجمع کادمیوم برطرف کرده و با رفع اختلال مسیرهای متابولیسمی ایجاد شده، شرایط را به نفع گیاه تغییر دهد. افزایش ماده خشک ریشه و اندام‌های هوایی آفتابگردان در خاک آلوده به سرب پس از افزودن فیتوهورمون اسید ایندول استیک مشاهده شده است (لیپادزی و همکاران، 2006). همچنین، تأثیر مثبت اسید ایندول استیک خارجی بر رشد خردل در مقادیر بالای آرسنیک گزارش شده است (سریواستاوا و همکاران، 2013).

توان ریزوباکتری‌ها در تولید اکسین و بهره‌برداری از مزایای آن، به‌عنوان پتانسیل طبیعی در خاک، می‌تواند راهگشای مشکلات مطرح شده باشد. بخش قابل توجهی از تریپتوفان مورد نیاز ریزوباکتری‌ها از هیدرولیز پروتئین‌های موجود در ماده آلی خاک و بخش کمی نیز از ترشحات ریشه تأمین می‌شود. همچنین، نوع باکتری و گیاه میزبان به‌همراه میزان وجود تریپتوفان بر مقدار تولید اکسین اثر گذار هستند. مصطفی و همکاران (2018) گزارش نمودند که بین میزان تریپتوفان موجود و اکسین تولید شده ارتباط مستقیم وجود دارد. دسوزا و همکاران (2015) گزارش نموده‌اند که افزودن تریپتوفان به خاک می‌تواند منجر به افزایش تولید اکسین توسط PGPR⁵ شود. پائین بودن ماده آلی خاک و یا هر فاکتور اثرگذار بر تأمین کافی تریپتوفان می‌تواند تولید اکسین توسط ریزوباکتری را با محدودیت مواجه نماید.

کادمیوم جزو فلزات سنگین بوده و در صورت ورود به سیستم‌های بیولوژیکی به دلیل هدف قرار دادن آنزیم‌های کلیدی سبب بروز اختلالات شدید متابولیسمی در موجودات زنده می‌گردد. از سوی دیگر با توجه به نیازهای صنعتی رو به رشد جوامع بشری مانند تصفیه، استخراج و تولید پلاستیک و کودهای شیمیایی که مهمترین منبع تولید آلودگی هستند، این فلز سنگین در خاک‌ها رها شده و در اثر ورود مستمر، تجمع و افزایش غلظت آن در محیط‌زیست اتفاق خواهد افتاد؛ بنابراین لازم است راهکارهای جلوگیری از ورود آن به زنجیره غذایی به‌صورت جدی مورد بررسی قرار گیرند (رحمن و همکاران، 2020). پژوهش‌های انجام یافته بیانگر کارآمدی بالای پتانسیل میکروبی خاک به‌ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاهان در راستای کاهش ورود عناصر سنگین از جمله کادمیوم به اندام‌های هوایی گیاهان در خاک‌های آلوده می‌باشد (آبدی و مجیری، 2020). خانا و همکاران (2019) گزارش کردند که تلقیح گیاهان خردل، کدو و سورگوم با باکتری باسیلوس مگاتریوم¹ توانست جذب و انتقال نیکل را کاهش دهد.

همچنین، این محققین اظهار نمودند که تلقیح با باکتری نئوریزوبیوم هایوتلنز² سویه T1-17، ضمن بهبود رشد تربچه و کلم چینی در حضور کادمیوم، جذب و تجمع آن را در گیاهان یاد شده کاهش داد. مکانیسم‌های عمل باکتری‌ها برای انجام اینکار متعدد بوده و تولید هورمون اکسین توسط گونه باکتری یاد شده یکی از آنها می‌باشد (راجکومار و همکاران، 2013). اکسین با دخالت در ساخت لیگاندهایی که می‌توانند با اتصال به فلز باعث ترسیب آن در ریشه گردند، مانع انتقال کادمیوم به اندام هوایی می‌شود. کادمیوم بر تولید و توزیع هورمون اکسین اثر گذاشته و مقدار بالای آن، بیوسنتز و عملکرد پروتئینی به نام پاین³ را دچار اختلال می‌کند. این پروتئین مسئول

¹. *Bacillus megaterium*

². *Neorhizobium huautlense*

³. PIN

⁴. Nitric oxide

⁵. Plant growth promoting rhizobacteria

شرایط آزمایشگاهی می‌باشد که حاکی از توانایی جذب کادمیوم توسط پلی‌ساکاریدهای حاضر در ساختار بیوفیلم است. در ایران اگرچه مطالعات جامعی در خصوص پراکنش و میزان کادمیوم در خاک‌های زراعی انجام نگرفته است، اما بالا بودن میزان این عنصر، بیش از مقدار استاندارد تعیین شده، در برخی از تولیدات گیاهی مانند برنج و کاهو گزارش شده است (گلچینی و همکاران، 2018).

باتوجه به اثرات منفی کادمیوم بر بدن انسان و ضرورت ممانعت از ورود آن به رژیم غذایی، مطالعات اندکی در خصوص اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد به‌ویژه آن دسته که مولد بیوفیلم می‌باشند، با هدف جلوگیری از ورود کادمیوم به زنجیر غذایی انجام شده است. با در نظر گرفتن موارد مذکور، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر باکتری محرک رشد *Bacillus atrophaeus*، که از دسته مولد بیوفیلم می‌باشد، و اضافه نمودن تریپتوفان، به‌عنوان پیش‌ساز اکسین، به خاک با هدف کنترل جذب کادمیوم و ممانعت از انتقال آن به بخش هوایی چاودار⁶ به به مرحله اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری

در این مطالعه باکتری *Bacillus atrophaeus* 1-54، با ویژگی‌های محرک رشدی (جدول 1)، جدا شده از ریزوسفر گرامینه‌های علفی و غیر زراعی منطقه هشت‌رود از توابع استان آذربایجان شرقی، استفاده گردید (کریمی و همکاران، 1398).

علاوه بر اکسین، یکی دیگر از ویژگی‌های مهم مطرح در باکتری‌ها که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، تولید بیوفیلم است. باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از این ویژگی برای مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند تنش فلزات سنگین و کم‌آبی بهره‌برداری می‌کنند. تشکیل بیوفیلم باکتریایی در سطح ریشه گیاهان می‌تواند با جذب فلزات مانع ورود آنها به ریشه گیاه شود. لذا، می‌توان از این گونه باکتری‌ها جهت تلقیح به گیاهان در شرایط آلودگی برای جلوگیری از ورود فلز به اندام‌های هوایی بهره‌برداری نمود (وربورگن و همکاران، 2009). به اجتماع یا ماتریکس پیچیده از میکروپها و تولیدات میکروبی که به سطح بی‌جان یا جاندار مانند سطح ریشه گیاهان متصل شده باشند، بیوفیلم¹ می‌گویند. مواد پلیمری خارج سلولی (EPS)² عمدتاً کمپلکس پلی‌ساکاریدی بوده ولی ممکن است پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نیز در آن یافت شوند (استودلی و همکاران، 2002).

باکتری *Bacillus atrophaeus* که سابقاً بنام *Bacillus subtilis* واریته نیجر³ شناخته می‌شد، یکی از باکتری‌های بسیار مفیدی است که پتانسیل کاربردی زیادی برای آن در حوزه‌های صنعتی، سلامت انسان، سلاح‌های بیولوژیک، محرک رشدی گیاه و تصفیه فاضلاب قبلاً گزارش شده است (سلا و همکاران، 2015). مهدی و همکاران (2021) گزارش کردند که باکتری *Bacillus atrophaeus* GQJK17 S8 یک باکتری تولید کننده بیوفیلم بوده و می‌تواند باعث افزایش مقاومت به فلزات سنگین کادمیوم، نیکل و مس در گیاهچه‌های کینوا⁴ گردد. لکزین و همکاران (2008) با جداسازی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از باکتری *Ensifer meliloti*⁵ گزارش کرده‌اند که این پلی‌ساکاریدها قادر به حذف مقادیر قابل توجهی از عناصر سنگین سرب، نیکل و روی از محلول‌های آلوده در

1. Biofilm

2. Extracellular polymeric substances

3. *Bacillus subtilis* var. niger

4. Quinoa

5. *Ensifer meliloti*

6. *Secale cereale* L.

جدول 1- خصوصیات محرک رشدی باکتری 54-1 <i>Bacillus atrophaeus</i> (کریبی و همکاران، 1398)	
شاخص تشکیل بیوفیلم	3/75
میزان تولید اکسین (میلی گرم در لیتر در حضور تریپتوفان)	14/43
توانایی تجزیه ACC (میکرومولار در 36 ساعت)	0/61

مطالعات گلخانه‌ای

به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد خارجی تریپتوفان به‌همراه حضور باکتری محرک رشد بر خصوصیات عملکردی و فیزیولوژیکی چاودار، آزمایش گلدانی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه مراغه اجرا شد. در این پژوهش بستر کشت هیدروپونیک بود و بوته‌ها تا مرحله ظهور سنبله در شرایط کنترل شده از نظر دما، رطوبت و شدت نور به ترتیب 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، 60 ± 5 درصد و 20 هزار لوکس نگهداری گشتند.

تیمارهای مورد مطالعه شامل سطوح کادمیوم (صفر، 50 و 100 میلی‌گرم در لیتر)، تیمار باکتریایی (مایه-زنی باکتری 54-1 *Bacillus atrophaeus* و عدم مایه‌زنی) و کاربرد خارجی تریپتوفان (عدم کاربرد و کاربرد با غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر، بر اساس یافته‌های اعتصامی و همکاران (2009) بود. لازم به‌ذکر است که جهت ممانعت از ورود هر نوع باکتری به محیط کشت، پرلیت (اتوکلاو شدن در دمای 120 درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت) استریل و بذور چاودار (به‌مدت 10 دقیقه در وایتکس 2 درصد و سپس 40 ثانیه در الکل 70 درصد) ضدعفونی و پس از مایه‌زنی با باکتری‌ها کشت گردید. برای آبیاری و تغذیه بوته‌ها از محلول هوگلند استفاده گردید. پس از ظهور و استقرار گیاهچه‌ها و یکسان-سازی تعداد بوته‌ها در تمامی گلدان‌ها (هفت روز پس از شروع آزمایش) تیمارهای مربوطه با افزودن کادمیوم و تریپتوفان همراه با محلول هوگلند اعمال شد. رطوبت گلدان‌ها با استفاده از ترازو و به روش وزنی هر روز کنترل و تنظیم شد.

اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های گیاه

اندام‌های مختلف گیاه (برگ، ساقه و ریشه) تفکیک شده و در دمای 70 70 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 48 ساعت خشک و توزین گردیدند.

اندازه‌گیری مساحت برگ پرچم

بزرگ‌ترین برگ پرچم در هر گلدان برداشت شده و پس از تثبیت آن بر روی برگه A4 عکس برداری شد. در ادامه مساحت برگ پرچم با استفاده از نرم افزار ArcMap 10.6.1 محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان کادمیوم در ریشه و اندام‌هوایی

از بافت خشک ریشه و اندام‌های هوایی 0/5 گرم به‌صورت جداگانه برداشت و پس از هضم با روش تر، غلظت کادمیوم با دستگاه جذب اتمی (مدل دستگاه) اندازه‌گیری گردید. همچنین، به‌منظور ارزیابی و بررسی توانایی گیاه انتخاب شده در پاکسازی محیط از فلز سنگین، دو فاکتور تغلیظ زیستی برای اندام‌هوایی (رابطه 1) و فاکتور انتقال (رابطه 2) به ترتیب محاسبه شدند. رابطه 1

$$BCF = \frac{A}{D} - 2 \quad \text{و} \quad TF = \frac{A}{B} -$$

A غلظت فلز سنگین در اندام‌هوایی، B غلظت فلز سنگین در محلول هیدروپونیک و D غلظت فلز سنگین در ریشه می‌باشد.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول

پراکسیداز

جهت استخراج آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، 0/5 گرم از نمونه برگ‌گی با استفاده از هاون چینی سرد و نیتروژن مایع هموژن شد. سپس، به آن 5 میلی‌لیتر بافر فسفات سرد با pH 7/5 محتوی 0/5

میکرولیتر محلولی که حاوی تری کلرو استیک اسید 20 درصد و تیوباریتوریک اسید 0/5 درصد بود، مخلوط گردید. مخلوط حاصل 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد در حمام آبی قرار داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شده و دوباره به مدت 10 دقیقه با دور 15000 سانتریفیوژ گردید. میزان جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 532 نانومتر، خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در 600 نانومتر تعیین و از مقدار حاصل کسر گردید. برای محاسبه میزان مالون دی آلدئید، از ضریب خاموشی معادل 1 Mm^{-1} 155 Cm^{-1} استفاده شد.

نتایج و بحث

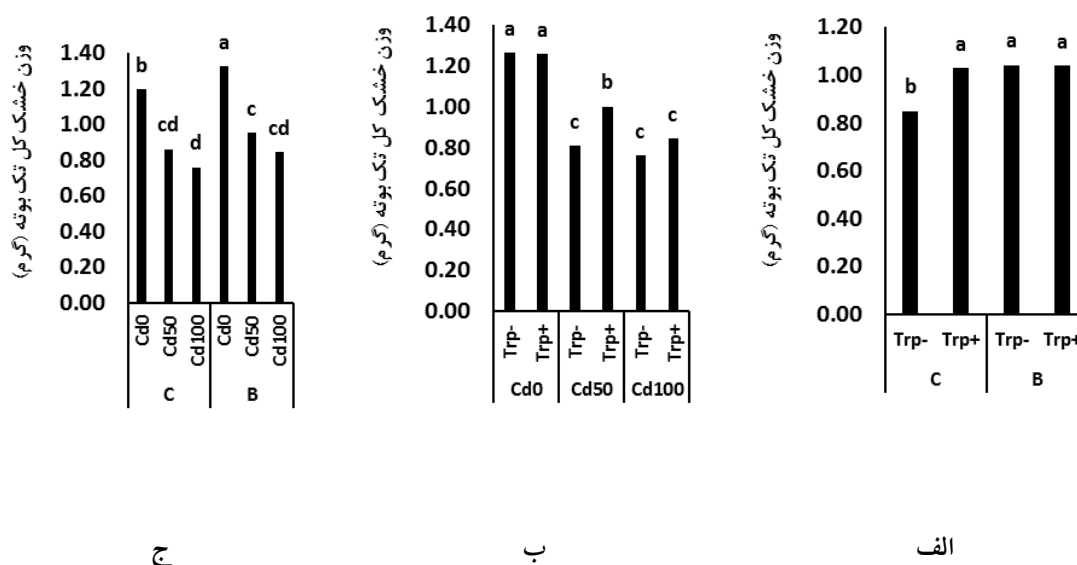
عملکرد ماده خشک چاودار

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی نشان داد که اثر متقابل تریپتوفان×کادمیوم، مایه‌زنی باکتریایی×کادمیوم و مایه‌زنی باکتریایی×تریپتوفان بر وزن خشک کل تک بوته چاودار در گلدان معنی‌دار بود (جدول 2). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها کاربرد تریپتوفان چه همراه با مایه‌زنی باکتریایی چه بدون آن توانست باعث افزایش 18 درصدی عملکرد ماده خشک چاودار در مقایسه با تیمار شاهد گردند (شکل 1-الف). در مقایسه با شاهد در هر غلظت از کادمیوم، افزودن تریپتوفان در غلظت‌های صفر و 100 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر بر این صفت بی‌تاثیر ولی در غلظت 50 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر باعث افزایش 19 درصدی گردید (شکل 1-ب). مایه‌زنی باکتریایی در غلظت صفر میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر باعث افزایش 10 درصدی ماده خشک چاودار گردید در حالی که در سایر غلظت‌ها تأثیری بر ماده خشک چاودار نداشت (شکل 1-ج).

میلی‌مولار EDTA اضافه گشت. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در 15000 دور در دقیقه و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند (سایرام و همکاران، 2002). اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب طبق روش ابی (1984)، تانک و نوتون (2005) انجام گردید. همچنین، میزان پروتئین محلول با روش برادفورد (1976)، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌های فوق در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه مراغه انجام گردید. داده‌های به دست آمده از این تحقیق پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه شده و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن

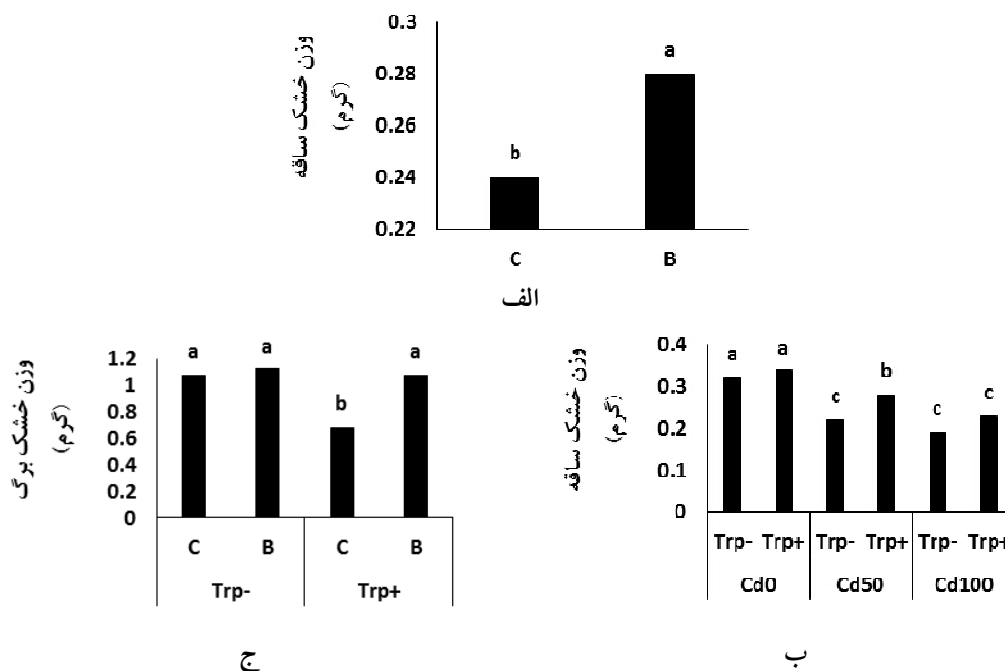
برای تعیین محتوی پراکسید هیدروژن، از روش سرگیو و همکاران (1997) با اندکی تغییر استفاده شد. 0/2 گرم از بافت تازه برگ با 3 میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید 0/1 درصد در هاون چینی سابیده شده و عصاره‌ی حاصل در 12000 دور، به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. 0/5 میلی‌لیتر از مایع رویی برداشت شده و به 0/5 میلی‌لیتر بافر فسفات 0/2 مولار و 1 میلی‌لیتر یدید پتاسیم 1 مولار اضافه گردید. جذب آن در طول موج 390 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد و در نهایت میزان پراکسید هیدروژن با لحاظ نمودن ضریب خاموشی 1 Mm^{-1} 128 cm^{-1} به صورت نانومول بر گرم وزن تر بیان گردید. اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) با روش هیس و پکر (1968) انجام شد. برای این منظور 0/1 گرم برگ تازه در هاون چینی حاوی 5 میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید 0/1 درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل به مدت 10 دقیقه با دور 15000، سانتریفیوژ شد. 250 میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ با 750



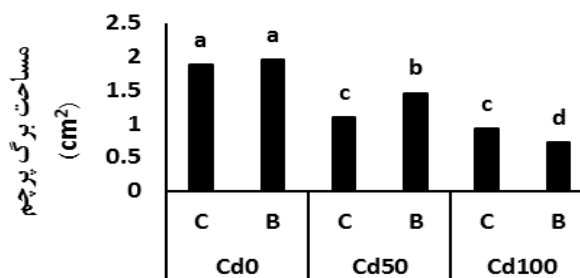
شکل 1- مقایسه میانگین اثرات متقابل کادمیوم×تریپتوفان (الف)، مایه‌زنی باکتریایی×تریپتوفان (ب) و مایه‌زنی باکتری×کادمیوم (ج) بر عملکرد ماده خشک چاودار. Cd0، Cd50، Cd100 به ترتیب بیانگر غلظت‌های صفر، 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر، (Trp0) و (Trp+) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و 100 میلی‌گرم تریپتوفان در لیتر، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی و B باکتری (*Bacillus atrophaeus* 54-1) می‌باشد. میانگین‌های دارای حد اقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنادار در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.

کادمیوم بر وزن خشک ساقه بی تأثیر بوده ولی در غلظت 50 کادمیوم توانست 22 درصد آن را افزایش دهد (شکل 2- ب). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که سطح برگ بطور معنی‌داری تحت تأثیر کادمیوم و اثر متقابل باکتری×کادمیوم در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول 2). تنش کادمیوم سبب کاهش سطح برگ نسبت به شاهد گردید. در کادمیوم 50 و 100 میلی‌گرم در لیتر تلقیح با باکتری محرک رشد به ترتیب سبب افزایش 33 درصدی و کاهش 23 درصدی سطح برگ نسبت به عدم تلقیح گردید (شکل 3). تلقیح باکتریایی در شرایط 50 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر تأثیر مثبت و در شرایط 100 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر تأثیر منفی بر این صفت ایجاد کرد.

تفکیک ماده خشک به عملکرد ساقه و برگ نشان داد که تأثیر مایه‌زنی باکتریایی و اثر متقابل کادمیوم×تریپتوفان بر عملکرد ماده خشک ساقه و اثر مایه‌زنی باکتریایی و اثر متقابل تریپتوفان×باکتری بر عملکرد ماده خشک برگ معنی‌دار گردید (جدول 2). بر اساس نتایج مقایسه میانگین مایه‌زنی باکتریایی موجب افزایش 15 درصدی وزن خشک ساقه (شکل 2- ب) و موجب افزایش 19 درصدی وزن خشک برگ (شکل 2- ج) در مقایسه با تیمار شاهد بدون مایه‌زنی گردید. کاربرد تریپتوفان به تنهایی باعث افت 59 درصدی وزن خشک برگ چاودار گردیده ولی در تلفیق با مایه‌زنی باکتریایی این تأثیر منفی از بین رفت (شکل 2- ج). همچنین، کاربرد تریپتوفان در غلظت صفر و 100 میلی‌گرم بر لیتر



شکل 2 - تأثیر مایه‌زنی باکتری بر میانگین وزن خشک ساقه (الف)، اثر متقابل کادمیوم × تریتوفان بر میانگین وزن خشک ساقه (ب) و اثر متقابل تریتوفان × مایه‌زنی باکتریایی بر میانگین وزن خشک برگ (ج). Cd100 و Cd50، Cd0 به ترتیب بیانگر غلظت‌های صفر، 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر، (Trp+) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و 100 میلی‌گرم تریتوفان در لیتر، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی و B باکتری (*Bacillus atrophaeus* 54-1) می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنادار در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.



شکل 3- مقایسه میانگین تأثیر مایه‌زنی باکتریایی بر مساحت برگ پرچم در سطوح مختلف کادمیوم، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی و B باکتری (*Bacillus atrophaeus* 54-1) و Cd0، Cd50، Cd100 به ترتیب بیانگر غلظت‌های صفر، 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنادار در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.

برگ به معنی افزایش توان فتوسنتزی و ترغیب بیشتر تولید و توزیع آسیمیلات‌ها می‌باشد و به نظر می‌رسد که افزایش وزن خشک برگ‌ها (شکل 2-ب) در اثر افزایش سطح برگ کلی گیاه می‌باشد. کاربرد تریتوفان چه به

بتول و همکاران (2020) گزارش کردند که مایه‌زنی گیاه نوعی گیاه دارویی بنام سانتا¹ کاهش سطح برگ ناشی از تنش را تعدیل نموده و مانع از افت شدید آن در مقایسه با شاهد بدون مایه‌زنی بود. افزایش سطح

¹ Santae

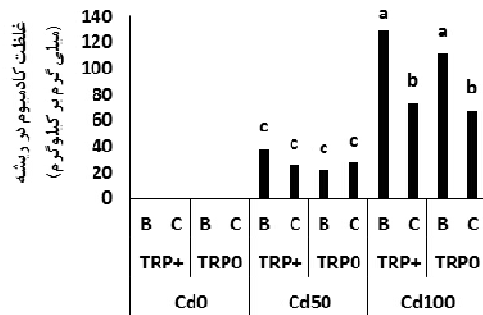
میلی گرم کادمیوم بر لیتر غلظت عنصر یاد شده در ریشه در همه تیمارهای آزمایشی یکسان بود. با این حال کمترین غلظت کادمیوم در سطح مذکور در تیمار باکتری به همراه تریپتوفان بود. در غلظت 100 میلی گرم کادمیوم بر لیتر بیشترین میزان کادمیوم در ریشه در تیمارهای باکتریایی مشاهده گردید که بیشترین آن در حضور تریپتوفان مشاهده شد. نظیر آنچه که در سطح 50 میلی گرم کادمیوم بر لیتر در اندام هوایی چاودار مشاهده شد، کمترین میزان کادمیوم باز متعلق به تیمار باکتری در حضور تریپتوفان اتفاق افتاد.

تنهایی و چه کاربرد تلفیقی آن با باکتری تأثیری بر این صفت نداشت.

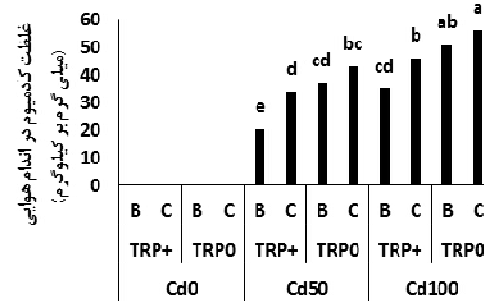
غلظت کادمیوم در ساقه و ریشه چاودار و فاکتور انتقال

کادمیوم از ریشه به اندام هوایی

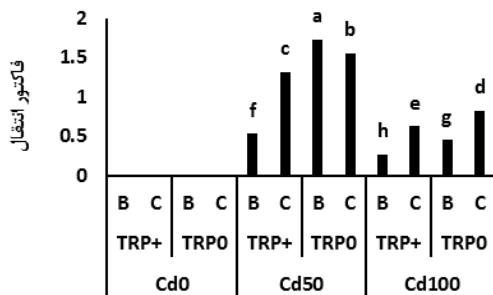
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت کادمیوم در ریشه و ساقه معنی دار بودند (جدول 2). بر اساس نتایج مقایسات میانگین (شکل 4) با توجه شرایط آزمایش و استفاده از مواد خالص، غلظت این عنصر در شاهد، صفر بوده و کادمیوم در ریشه و اندام هوایی مشاهده نشد. در تیمار 50



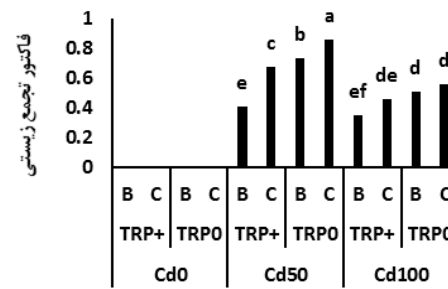
ب



الف

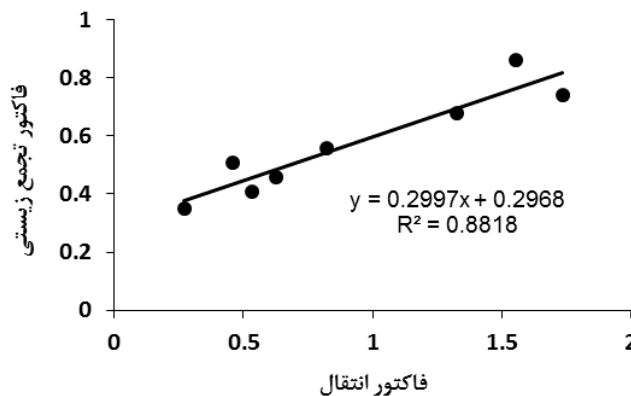


د



ج

شکل 4- تأثیر مایه‌زنی باکتریایی و کاربرد تریپتوفان در غلظت‌های مختلف کادمیوم بر تجمع آن در ریشه (الف)، اندام هوایی چاودار (ب)، فاکتور تجمع زیستی (ج) و فاکتور انتقال (د). Cd0، Cd50 و Cd100 به ترتیب بیانگر غلظت‌های صفر، 50 و 100 میلی گرم کادمیوم در لیتر، (Trp+) و (Trp0) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و 100 میلی گرم تریپتوفان در لیتر، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی و B باکتری (*Bacillus atrophaeus* 54-1) می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنادار در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.



شکل 5- رابطه رگرسیونی بین فاکتور انتقال (TF) و فاکتور تجمع زیستی (BF) کادمیوم در گیاه چاودار

لادویگی⁴ استفاده کردند. احمد و کبیرت (2019) گزارش کرده است که از ریزوبیوم، بردی ریزوبیوم، سودوموناس و استروفوتوموناس⁵ می‌توان در کاهش تجمع فلز در گیاهان استفاده کرد. نتایج نیز نشان دادند که در سطح کادمیوم 50 میلی‌گرم در لیتر تیمارهای تلقیح باکتریایی، تریپتوفان، باکتری به‌همراه تریپتوفان به‌ترتیب تجمع کادمیوم در چاودار را 14، 21 و 53 درصد کاهش می‌دهند. این مقادیر در تیمار 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر به‌ترتیب برابر بود با 9، 18 و 37 درصد. فاروق و همکاران (2015) اظهار داشتند که افزودن سطوح مختلف تریپتوفان، به محیط اطراف ریشه بوته‌های برنج سبب رشد بهتر و تولید بیشتر این گیاه در خاک‌های آلوده به کادمیوم شده و باعث افزایش رشد گیاه و عملکرد تحت تنش کادمیوم همراه با کاهش انتقال عنصر به بخش هوایی شده است. تریپتوفان پیش‌ماده ساخت اکسین در گیاهان و باکتری‌های موجود در ریزوسفر آنها است (دال کورسو و همکاران، 2019). بنابراین به نظر می‌رسد، بهبود اثرات فیزیولوژیکی متاثر از اکسین که در بخش مقدمه ذکر گردیده است، در این امر دخیل است. علاوه بر این، صرف‌نظر از سایر مکانیسم‌های احتمالی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها، طبق نتایج کریمی و همکاران (1398) باکتری باسیلوس آتروفائوس 1-54 یک باکتری بیوفیلمی بوده و قادر به تولید بیوفیلم در ریزوسفر گیاهان حین فرآیند کلنیزاسیون ریشه گیاه می‌باشد. لذا، می‌تواند فلز را در سطح ریشه جمع نموده و مانع ورود آن به داخل گیاه گردد که بیانگر توجیه کادمیوم زیاد ریشه در مقایسه با شرایط کنترلی این آزمایش باشد (1/8 برابر).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی نشان داد که فاکتور انتقال کادمیوم از ریشه به اندام هوایی بطور معنی‌داری تحت تأثیر مایه‌زنی باکتری و غلظت کادمیوم قرار گرفت (جدول 2). با توجه به شکل 4، مایه‌زنی باکتریایی سبب کاهش 17/2 درصدی فاکتور انتقال کادمیوم از ریشه به اندام‌هوائی چاودار گردید. همچنین، فاکتور انتقال کادمیوم از ریشه به اندام هوایی، در غلظت 50 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر بالاتر از غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر این فلز سنگین بود. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 2) اثرات متقابل کادمیوم × تریپتوفان × باکتری بر این ویژگی معنی‌دار شد. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی نشان داد که کاربرد تریپتوفان و مایه‌زنی باکتریایی هر دو می‌توانند باعث کاهش این فاکتور گردند. بعلاوه، کاربرد تلفیقی این دو تیمار نتیجه مطلوب‌تری داشت (شکل 4). رابطه بین فاکتور انتقال و تجمع زیستی مستقیم و از نوع خطی با ضریب تبیین بالا 0/88 بود. بطوریکه با کاهش فاکتور انتقال، غلظت فلز در اندام هوایی کاهش پیدا کرد (شکل 5).

وانگ و همکاران (2018) کاهش 12 تا 32 درصدی کادمیوم در اندام‌هوائی گندم و همچنین کاهش 15 تا 28 درصدی کاهش دسترسی کادمیوم در خاک ریزوسفری را توسط تلقیح باکتری‌های *Ralstonia eutropha* یوتروفا¹ و *Exiguobacterium aurantiacum* آراتیاگوم² گزارش کرده‌اند. جان و همکاران (2019) برای کاهش تجمع کادمیوم در برنج از باکتری‌های *Exiguobacterium indicum* اندیاکوم³ و *Enterobacter*

¹ *Ralstonia eutropha* Q2-8

² *Exiguobacterium aurantiacum* Q3-11

³ *Exiguobacterium indicum* SA22

⁴ *Enterobacter ludwigii* SAK5

⁵ *Stenopothomonas acidaminiphila*

جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمارهای (کادمیوم، باکتری، تریپتوفان و اثرات متقابل آنها) بر عملکرد و صفات فیزیولوژیکی

چاودار							
میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه- آزادی	وزن خشک کل اندام هوایی	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ	مساحت برگ پرچم	غلظت کادمیوم در ریشه	غلظت کادمیوم در اندام هوایی
باکتری	1	0.124**	0.011**	0.062**	0.075 ^{ns}	281**	56.4 ^{ns}
تریپتوفان	1	0.095**	0.008*	0.049**	0.129*	808**	276*
کادمیوم	2	0.925**	0.057**	0.525**	4.73**	11697**	8758**
تریپتوفان×باکتری	1	0.097**	0.004 ^{ns}	0.063**	0.003 ^{ns}	18.0 ^{ns}	38.9 ^{ns}
کادمیوم×باکتری	2	0.002**	0.001 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.319**	134**	208*
تریپتوفان×کادمیوم	2	0.039**	0.006**	0.015 ^{ns}	0.028 ^{ns}	822**	237**
کادمیوم×تریپتوفان×باکتری	2	0.018 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.012 ^{ns}	0.014 ^{ns}	42.5*	102 ^{ns}
باقیمانده	36	0.007	0.001	0.005	0.021	12.2	40.0
ضریب تغییرات (%)		14.7	12.4	9.69	11.08	13.57	23.93

** معنی داری در سطح آماری یک درصد، * معنی داری در سطح آماری پنج درصد و ^{ns} از لحاظ آماری غیر معنی دار

ادامه جدول 2 -

میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	فاکتور انتقال از ریشه به اندام هوایی	فاکتور تجمع زیستی	مالون دی- آلدئید	پراکسید هیدروژن	آنزیم کاتالاز	آنزیم گایاکول پراکسیداز
باکتری	1	0.26*	0.037*	1340**	0.014**	0.011**	0.03 ^{ns}
تریپتوفان	1	0.013 ^{ns}	0.03*	512**	0.006**	0.0007 ^{ns}	0.23 ^{ns}
کادمیوم	2	9.74**	2.00**	4764**	0.011**	0.046**	6.85**
تریپتوفان×باکتری	1	0.001 ^{ns}	0.022 ^{ns}	64.4**	0.001 ^{ns}	0.001 ^{ns}	45.5**
کادمیوم×باکتری	2	0.102 ^{ns}	0.067**	332 ^{ns}	0.014**	0.002 ^{ns}	0.98 ^{ns}
تریپتوفان×کادمیوم	2	0.023 ^{ns}	0.022*	543**	0.003**	0.001 ^{ns}	8.55*
کادمیوم×تریپتوفان×باکتری	2	0.009 ^{ns}	0.034*	51.0 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	0.0003 ^{ns}	3.99 ^{ns}
باقیمانده	36	0.042	0.006	42.4	0.0003	0.001	2.01
ضریب تغییرات (%)		25.79	21.4	17.6	16.67	12.7	20.18

شاخص های تنش اکسیداتیو

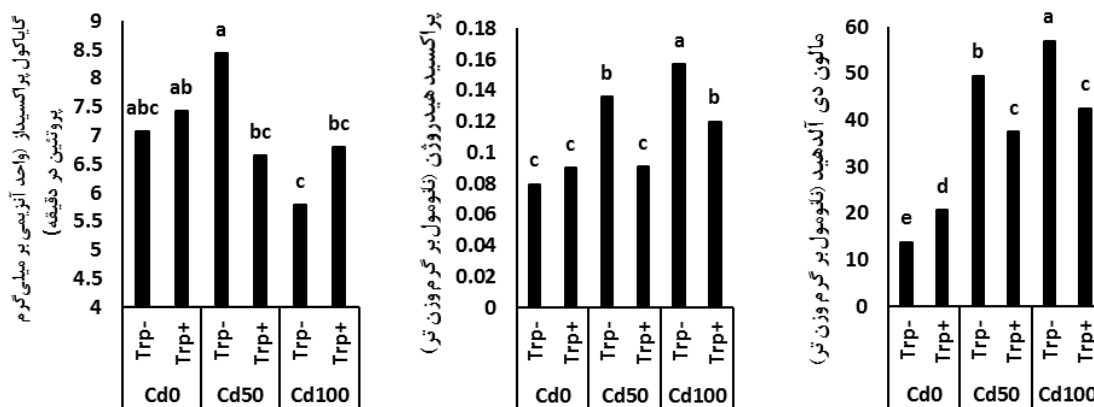
گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی دار گردیدند (جدول 2). فعالیت کاتالاز فقط تحت تأثیر باکتری و کادمیوم در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت و هیچ یک از اثرات متقابل در این تیمار معنی دار نبود (جدول 2). بر اساس مقایسات میانگین، کاربرد تریپتوفان در شرایط بدون کادمیوم باعث افزایش 44 درصدی مالون دی آلدئید (شکل 6-الف)، افزایش 14

با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر متقابل تریپتوفان×کادمیوم بر غلظت مالون دی آلدئید، میزان پراکسید هیدروژن و آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول 2). همچنین اثر متقابل باکتری×کادمیوم در سطح احتمال یک درصد بر غلظت مالون دی آلدئید و میزان پراکسید هیدروژن و اثر متقابل تریپتوفان×مایه زنی باکتریایی بر فعالیت آنزیم

یکی از مهمترین دلایل سمیت کادمیوم در گیاهان تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو است، افزایش تولید H_2O_2 و پیامد آن افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید که به‌عنوان یک بیومارکر برای تعیین شدت وقوع تنش اکسیداتیو کاربرد دارد (چن و همکاران، 2007)، بیانگر وقوع این تنش در گیاه بوده و همانگونه که در شکل 6 (الف، ب، د و ه) نشان داده شده است، بروز چنین حالتی در خصوص چاودار قابل مشاهده است که در نهایت افت عملکرد چاودار را نیز در پی داشت (شکل 1).

گزارش شده که در این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه از جمله گایاکول‌پراکسیداز و کاتالاز افزایش یافته (ژانگ و همکاران، 2010) و برخی از باکتری‌های مفید ریشه از جمله سودوموناس‌ها مقاومت در گیاه با بهبود این سازوکار مقاومت به تنش فلزات سنگین را افزایش داده و از غشاهای سلولی و آوندها محافظت می‌کنند (یان و همکاران، 2020). بر طبق نتایج این پژوهش، کاربرد تریپتوفان (شکل 6-ج) و همچنین مایه‌زنی باکتریایی (شکل 6-و) توانستند با افزایش فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز نقش حمایتی داشته باشند و کاربرد تلفیقی در این خصوص مؤثرتر از اثرات یک جانبه آنها بود. علاوه بر این افزایش فعالیت کاتالاز نیز در اثر مایه‌زنی باکتریایی نیز در تیمارها مشاهده شد.

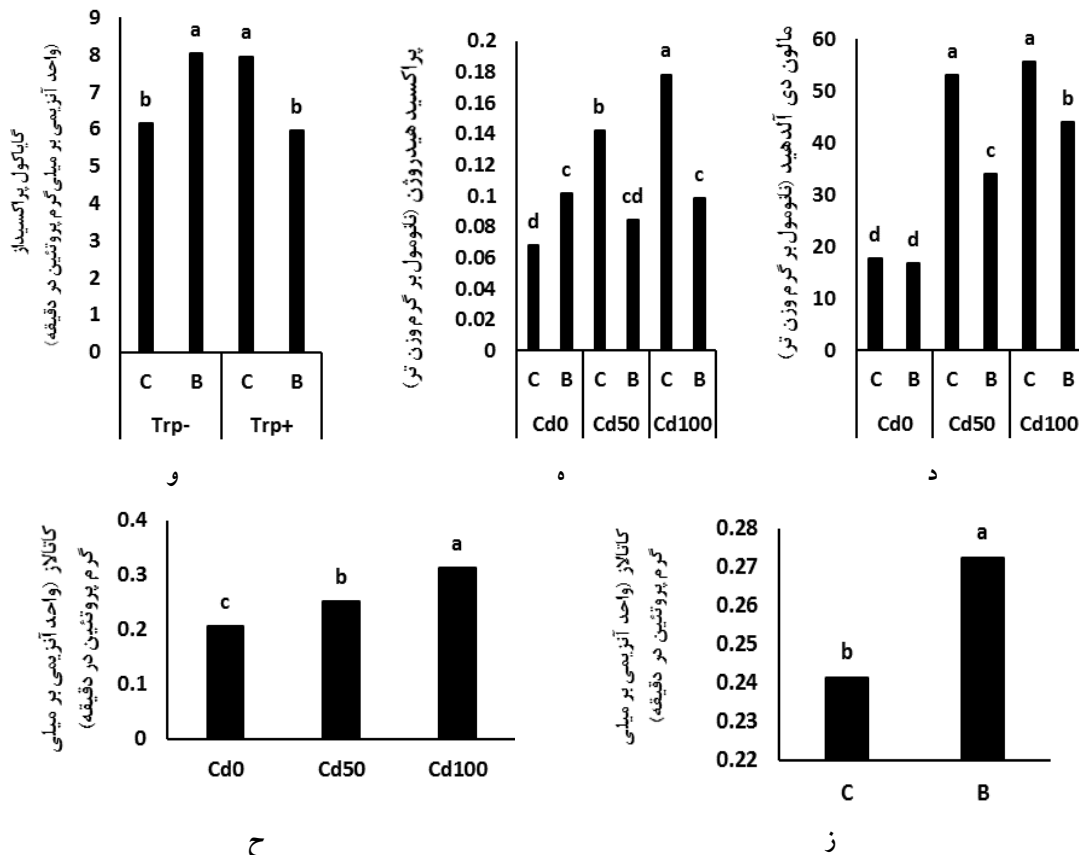
درصدی میزان پراکسید هیدروژن (شکل 6-ب) و افزایش 5 درصدی فعالیت گایاکول‌پراکسیداز (شکل 6-ج) و مایه‌زنی باکتریایی باعث کاهش 5 درصدی میزان مالون‌دی‌آلدئید و افزایش 67 درصدی پراکسید هیدروژن شد. در غلظت 50 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر کاربرد تریپتوفان باعث کاهش 30 درصدی مالون‌دی‌آلدئید، کاهش 42 درصدی میزان پراکسید هیدروژن و کاهش 26 درصدی فعالیت گایاکول‌پراکسیداز و مایه‌زنی باکتریایی باعث کاهش 55 درصدی میزان مالون‌دی‌آلدئید، کاهش 75 درصدی پراکسید هیدروژن گردیدند. کاربرد تریپتوفان در غلظت 100 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر باعث کاهش 34 درصدی میزان مالون‌دی‌آلدئید، کاهش 32 درصدی پراکسید هیدروژن و افزایش 15 درصدی فعالیت گایاکول‌پراکسیداز و مایه‌زنی باکتریایی این صفات به‌ترتیب ذکر شده گردید. در شرایط بدون کادمیوم و در غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم بر لیتر باعث کاهش 28 درصدی میزان مالون‌دی‌آلدئید، کاهش 81 درصدی پراکسید هیدروژن گردید (شکل 6). در سطوح 50 و 100 کادمیوم در مقایسه با شرایط بدون کادمیوم فعالیت کاتالاز به‌طور متوسط به ترتیب 20 و 64 درصد افزایش داشت (شکل 7-ز) که مایه‌زنی باکتریایی توانست فعالیت کاتالاز را 12 درصد در همه شرایط افزایش دهد (شکل 6-و).



ج

ب

الف



شکل 6- تأثیر اثر متقابل تریپتوفان×کادمیوم بر میزان مالون دی‌آلدئید (الف)، میزان پراکسید هیدروژن (ب) و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (ج). تأثیر اثر متقابل مایه‌زنی باکتریایی×کادمیوم بر میزان مالون‌دی‌آلدئید (د) و میزان پراکسید هیدروژن (ه). تأثیر اثر متقابل تریپتوفان× مایه‌زنی باکتریایی بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (و). تأثیر مایه‌زنی باکتریایی بر فعالیت آنزیم کاتالاز (ز) و غلظت کادمیوم (ح) بر فعالیت آنزیم کاتالاز. Cd0، Cd50، Cd100 به ترتیب بیانگر غلظت‌های صفر، 50 و 100 میلی‌گرم کادمیوم در لیتر، (Trp0) و (Trp+) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و 100 میلی‌گرم تریپتوفان در لیتر، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی و B باکتری *(Bacillus atrophaeus 54-1)* می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنادار در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.

همکاران، 2020) و همچنین کاهش فعالیت‌های متابولیکی ناشی از مسمومیت سلول‌های گیاهی و کاهش جذب فعال کادمیوم از محلول خاک به ریشه‌ها از دلایل احتمالی این امر می‌باشند. قابل ذکر است که هر چه غلظت کادمیوم موجود در خاک افزایش یافت، چه در حضور باکتری و چه در شرایط نبود باکتری، فاکتور انتقال کاهش یافته و گیاه چاودار تمایل به انباشت کادمیوم در ریشه‌های خود نشان داد که می‌تواند به‌عنوان نکته‌ای مهم در فرآیند گیاه تثبیتی¹ مورد توجه قرار گیرد. مایه‌زنی باکتری به‌همراه

با اینحال مایه‌زنی باکتریایی در شرایط تنش کادمیوم تأثیری بر عملکرد ماده خشک چاودار نداشت (شکل 1-ج). دلیل این امر را می‌توان با تغلیظ کادمیوم در ریشه در اثر مایه‌زنی باکتریایی عنوان نمود که احتمالاً به اختلالات ناشی از حضور کادمیوم در ریشه برمی‌گردد (شکل 4). امانی‌فر و همکاران (2010) گزارش کردند که با افزایش غلظت سرب در خاک شاخص انتقال از ریشه به اندام هوایی کاهش یافت که منطبق با یافته این تحقیق است (شکل 4). کاهش رشد گیاهان در اثر افزایش غلظت کادمیوم و به تبعیت از آن کاهش میزان تبخیر و تعرق و کاهش میزان انتقال کادمیوم در آوندهای چوبی (رازا و

¹ Phytostabilization

نتیجه‌گیری کلی

تیمارهای مورد بررسی اگر چه نتوانستند تاثیر چشمگیری بر رشد و عملکرد چاودار در شرایط تنش کادمیوم داشته باشند ولی تأثیر آنها بر نقل و انتقال این فلز به طور چشمگیری مشهود بود. با توجه به شاخص‌های انتقال و تجمع زیستی کادمیوم، کاربرد تلفیقی باکتری باسیلوس آتروفائوس 1-54 به همراه تربیتوفان جهت جلوگیری از انتقال کادمیوم به بخش‌های هوایی چاودار توصیه می‌گردد. به بیان دیگر گیاه چاودار به همراه عوامل تیمار برتر این مطالعه می‌توانند به‌عنوان گیاه تثبیتی فلز کادمیوم در خاک‌های آلوده به این عنصر مد نظر قرار گیرد.

کاربرد تلفیقی تربیتوفان این ویژگی را افزایش داد. به نظر می‌رسد توان ایجاد بیوفیلم توسط باکتری و بهبود ویژگی‌های ریشه با کاربرد تربیتوفان، در این امر دخیل باشند. علاوه بر این موارد باکتری باسیلوس آتروفائوس 1-54 قادر به کاهش غلظت اتیلن گیاه از طریق فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز و دآمیناسیون اسید 1-آمینو سیکلو پروپان-کربوکسیلیک بوده و مانع تولید اتیلن تنشی می‌گردد (جدول 1). کادمیوم القاکننده تولید اتیلن در گیاه می‌باشد که از دیگر عوامل کاهش دهنده تولید اکسین در گیاه به-شمار می‌آید (راجکومار و همکاران، 2013).

فهرست منابع:

1. کریمی، ا. علی‌اصغرزاد، ن. نیشابوری م. و اسفندیاری. 1398. جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم از ریزوسفر گیاهان غیرزراعی در شمالغرب ایران. مجله تحقیقات کاربردی خاک 7(2): 14-28
2. Abedi, T. and Mojiri, A. 2020. Cadmium Uptake by Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview. *Plants* 9: 1-14.
3. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
4. Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University Science* 26:1-20.
5. Amanifar, S. Aliasghar zad, N. Najafi, N. Oustan, S.H. and Bolandnazar, S. 2012. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on lead phytoremediation by sorghum (*Sorghum bicolor* L). *Water and Soil Science* 22(1): 155-170.
6. Batool, T. Ali, S. Seleiman, M.F. Huma, N.N. and Ali, A. 2020. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports* 10: 16975.
7. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
8. Chen, J. Zhu, C. Lin, D. and Sun, Z.X. 2007. The effects of Cd on lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. *Canadian Journal of Plant Science* 87(1) 49-57.
9. DalCorso, G. Fasani, E. Manara, A. Visioli, G. and Furini, A. 2019. Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Science* 20:3412.
10. Desouza, R. Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. 2015. Growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38(4):S1415.
11. Etesami, H. Alikhani, H.A. Akbari, A.A. 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Applied Science Journal* 6(11): 1576-1584.

12. Farooq, H. Asghar, H.N. Khan, M.Y. Saleem, M. and Zahir, Z.A. 2015. Auxin-mediated growth of rice in cadmium-contaminated soil. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39:272-276.
13. Ghoochani, M. Rastkari, N. Yunesian, M. Nabizadeh, R. Mesdaghinia. A. Houshiarrad, A. Shamsipour, M. and Dehghani, M.H. 2018. What do we know about exposure of Iranians to cadmium? Findings from a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 1–11.
14. Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
15. Jan, R. Khan, M.A. Asaf, S. Lubna, N. Lee, I.J. and Kim, K.M. 2019. Metal Resistant Endophytic Bacteria Reduces Cadmium, Nickel Toxicity, and Enhances Expression of Metal Stress Related Genes with Improved Growth of *Oryza Sativa*, via Regulating Its Antioxidant Machinery and Endogenous Hormones. *Plant* 8: 363.
16. Khanna, K. Jamwal, V.L. Gandhi, S.G. Ohri, P. and Bhardwaj, R. 2019. Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity *Scientific Reports* 9: 5855.
17. Lakzian, A. Berenji A.R. Karimi E. and Razavi, S. 2008. Adsorption Capability of Lead, Nickel and Zinc by Exopolysaccharide and Dried Cell of *Ensifer meliloti*. *Asian Journal of Chemistry* 20(8): 6075-6080
18. Liphadzi, M.S. Kirkham, M.B. and Paulsen, G.M. 2006. Auxin-enhanced root growth for phytoremediation of sewage-sludge amended soil. *Environmental Technology* 27:695-704.
19. Moe, L.A. 2013. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany* 100: 1692–1705.
20. Mustafa, A, Imran, M. Ashraf, M. and Mahmood, K. 2018. Perspectives of using L-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. *Pedosphere* 28(1): 16–34.
21. Ostonen, U. Tsepp, P.U. and Biel, C. 2007. Specific root length as an indicator of environmental change. *Plant Biosystems* 141 (3): 426-442.
22. Rajkumar, M. Ma, Y. and Freitas, H. 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal Environmental Management* 128: 973–980.
23. Raza, A. Habib, M. Kakavand, S.N. Zahid, Z. Zahra, N. Sharif, R. Hasanuzzaman, M. 2020. Phytoremediation of Cadmium: Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms. *Biology* 9(7):177.
24. Rehman, M.Z.U. Zafar, M. Waris, A.A. Rizwan, M. Ali, S. Sabir, M. Usman, M. Ayub, M.A., Ahmad, Z. 2020. Residual effects of frequently available organic amendments on cadmium bioavailability and accumulation in wheat. *Chemosphere* 244:125548.
25. Sairam, R., Veerabhadra K. R. and Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
26. Sella, S.R., Vandenberghe, L.P. and Soccol, C.R. 2015. *Bacillus atrophaeus*: Main characteristics and biotechnological applications—A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 35: 533–545.
27. Sergiev, I. Alexieva, V. and Karanov, E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus Academic Bulgare Science* 51: 121-124.
28. Srivastava, S. Chiappetta, A. and Beatrice, M. 2013. Identification and profiling of arsenic stress-induced miRNAs in *Brassica juncea*. *Journal of Experimental Botany* 64:303-315.

29. Stoodley, P. Sauer, K. Davies, D.G. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Reviews of Microbiology 56:187–209.
30. Tang, W. and Newton, R.J. 2005. Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. Plant Growth Regulation 46(2): 31-43.
31. Verbruggen, N. Hermans, C. and Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. Current Opinion in Plant Biology 12(3):364-72.
32. Yan, A., Wang, Y., Swee N.T. Lokman, M.Y.M. Ghosh, S. and Chen1, Z. 2020. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. Frontier in Plant Science
33. Younesi, O. and Moradi, A. 2014. Effects of plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) on antioxidant enzyme activities in salt-stressed bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Agriculture 60(1): 10-21.
34. Zhang, H.H. Tang, M. Chen, H. Zheng, C.L. and Niu, Z.C. 2010. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. European Journal of Soil Biology 46(5): 306-311.

پیامد کاربرد پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر فراوانی و سوخت و ساز باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین

زیبا نجف زاده نوبر¹ و علی‌اکبر صفری سنجانی

دانشجوی دکتری، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان؛ z_najfzadeh2002@yahoo.com

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان؛ aa-safari@basu.ac.ir

ص 193 - 213

دریافت: 1400/12/23 و پذیرش: 1401/8/11

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی پیامد سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر ویژگی‌های زیستی چون تنفس پایه و برانگیخته، و شمار همه باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین است. آزمایش با طرح کامل تصادفی به گونه فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای این پژوهش، خاک در سه گونه (خاک آلوده معدن، خاک چراگاه نزدیک معدن و خاک ناآلوده کشاورزی)، پادزیست در هفت تیمار (گواه بدون پادزیست، آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول هر یک به اندازه 100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک) و زمان در سه بازه (گرماگذاری کوتاه مدت (صفر تا 7 روز)، میان مدت (15 و 30 روز) و بلندمدت (60 و 90 روز)) بودند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که در بازه زمانی میان مدت، کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم از پادزیست‌های آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی و مترونیدازول در خاک معدن، به دنبال هم بیش‌ترین (8/4958) و کم‌ترین (4/4594) لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک را نشان دادند. خاک چراگاه در گرماگذاری کوتاه مدت بیش‌ترین اندازه تنفس پایه (0/1066) میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) و خاک کشاورزی در هر دو بازه زمانی بلندمدت (0/0144) و میان مدت (0/0172) کم‌ترین اندازه تنفس پایه را داشت. کاربرد 100 میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه مدت بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته خاک (0/0251) میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت) و کاربرد 100 میلی‌گرم آموکسی‌سیلین در کیلوگرم خاک کشاورزی در بازه زمانی میان مدت کم‌ترین تنفس برانگیخته خاک (0/0027) را نشان داد. به بیان دیگر می‌توان گفت خاک کشاورزی بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و خاک معدن بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را نشان داد. خاک چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس پایه را داشت و با خاک کشاورزی در فراوانی باکتری‌ها و خاک معدن در اندازه تنفس برانگیخته ناهمبندی معنی داری نداشت. خاک معدن کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها و خاک کشاورزی کم‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته را نشان داد. کاربرد مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته، و کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها را در پی داشت. کاربرد آموکسی‌سیلین و سفیکسیم به دنبال هم بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را نشان داد. گرماگذاری در بازه زمانی کوتاه مدت بیش‌ترین اندازه‌های تنفس پایه و برانگیخته را داشت. بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در زمان میان مدت دیده شد. بازه زمانی بلندمدت کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین اندازه تنفس پایه را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پادزیست، تنفس پایه و برانگیخته، شمار باکتری‌ها

¹ نویسنده مسئول، آدرس: گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

مقدمه

بر ریزجانداران زیستگاه به گونه گسترده گزارش شده است (دسوزا و همکاران، 2006).

بسیاری از بررسی‌ها نشان دادند که اثر متقابل پادزیست‌ها و فلزهای سنگین به گونه بالقوه برای باکتری‌ها و دیگر موجودهای زنده در زیستگاه خطرناک است. از زمان کشف پنی‌سیلین توسط الکساندر فلمینگ در سال 1928، پادزیست‌ها به سنگ بنای سیستم ایمنی ما دگرگون شده‌اند (کومر، 2009). پادزیست‌ها یا به طور طبیعی یافت می‌شوند یا مواد شیمیایی ساخته شده به وسیله انسان هستند. منبع اصلی پادزیست‌ها در محیط، تخلیه فاضلاب، کود و آبی‌پروری است (کومر، 2009). بر اساس بررسی زانگ و همکاران (2015)، در سال 2013 برآورد شد که 54000 تن پادزیست به وسیله انسان و جانوران دفع شده و در کل 53800 تن از آن‌ها پس از تصفیه‌های گوناگون فاضلاب وارد زیستگاه شده است. به دلیل جذب ضعیف در دستگاه گوارش جانوران، درسد بالایی از داروهای دام‌پزشکی بیش‌تر به شکل ترکیب اصلی یا متابولیت‌های آن‌ها دفع می‌شوند (تیله برون، 2003). اندازه دفع داروها بین 10 تا 90 درصد دوز تجویز شده متفاوت است (هیرش و همکاران، 1999؛ مونتفورتس و همکاران، 1999؛ سوکول و همکاران، 2009).

با روش معمول ذخیره کودهای حیوانی در مزرعه، پادزیست‌های دام‌پزشکی در معرض فرآیندهای گوناگون تخریب مانند کانی شدن، جذب، هیدرولیز و تبدیل شیمیایی قرار می‌گیرند (لامشوف و همکاران، 2010). برای مثال بلک ول و همکاران (2005) نیمه عمر 79 روز را برای اکسی‌تتراسایکلین در کود خوک گزارش کردند. الکسی و همکاران (2004) آزمایشی برای ارزیابی تجزیه آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون (سفیکسیم تزریقی) و مترونیدازول انجام دادند و مشخص شد که پس از 28 روز انکوباسیون، تنها 5 درصد از آموکسی‌سیلین و 1 درصد از مترونیدازول تجزیه می‌شود. بنابراین، نتیجه‌گیری

ریزجانداران خاک بخش مهم بوم‌سازه هستند. ویژگی‌ها و فعالیت ریزجانداران خاک مانند تنفس خاک، معمولاً به عنوان شناسه‌های کیفیت خاک بهره‌گیری می‌شوند (یوت و همکاران، 2008). تنفس واقعی (تنفس پایه خاک) و پتانسیل تنفس ریزجانداران (تنفس برانگیخته با سوپسترا) روش‌های شناخته شده و گسترده‌ای برای اندازه‌گیری متابولیسم کربن توسط ریزجانداران خاک هستند (آنانیوا، 2008). بررسی توسط سیرا و همکاران (2012) نشان داده است که فرآیندهای تنفس حساس به آلودگی هستند. فعالیت تنفس خاک در غلظت بالای مس به شدت به خطر می‌افتد و محدود می‌شود (رومرو-فریر و همکاران، 2016). بررسی‌ها نشان داده‌اند که آلودگی درازمدت خاک با فلزهای سنگین نشانه‌های زیان‌آور بر فعالیت ریزجانداران خاک، به ویژه تنفس ریزجانداران دارد (دولمن و هانسترا، 1984). برخی از فلزهای سنگین و متالوئیدها (به عنوان مثال، مس، روی، کبالت، آهن، منگنز و سلنیوم) به گونه گسترده در خوراک دام و طیور برای حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی گوناگون و جلوگیری از نارسایی سلامت دام بهره‌گیری می‌شوند.

از آنجایی که تمام این عناصر افزوده شده در جیره توسط دام ربایش نمی‌شوند، غلظت فزاینده‌ای از این عناصر در کوددामी دیده شده است (ساگر، 2007). بهره‌گیری از کود در زمین به گونه فزاینده‌ای به عنوان منبع اصلی ورود فلزهای سنگین به خاک شناخته می‌شود، که کاربردهای مکرر منجر به افزایش غلظت فلزهای سنگین در خاک شده است (زو و همکاران، 2013). توبر-کاپیون و همکاران (2005) نشان دادند که در شرایط تنش فلزهای سنگین، ریزجانداران پایدارتر تنفس خاک را افزایش می‌دهند زیرا کاربرد اکسیژن در طی فرآیند ضد عفونی افزایش می‌یابد، درحالی‌که ریزجانداران آسیب‌پذیر تنفس خاک را به دلیل مسمومیت کاهش می‌دهند. اثر متقابل فلزهای سنگین و آلاینده‌های آلی نیز

دگرگونی در سودوموناس‌ها و پروتئوباکتری‌ها کم‌تر از باکتری‌ها بود که احتمالاً به دلیل پایداری درون‌زاد سویه‌ها در این دو گروه است. هم ویژگی‌های شیمیایی درون‌زاد پادزیست‌ها و هم پارامترهای محیطی می‌توانند بر پیامد واقعی پادزیست‌ها بر جامعه ریزجاندارانی اثر بگذارند (دینگ و هی، 2010). از طرفی وجود فلزهای سنگین می‌تواند پایداری پادزیستی باکتری‌ها را القا کند و بر رشد آن‌ها در بوم‌سازه اثر بگذارد. (تای و همکاران، 2022). با این حال، تبادل ژن‌های پایدار به پادزیست بین ریزجاندارها از محیط در زمان‌های اخیر به روشنی ثبت شده است (سیلر و برندونک، 2012). قرار گرفتن در معرض فلزهای سنگین مایه پیدایش پایداری پادزیستی می‌شود. برای مثال، مس (Cu)، نیکل (Ni) و کادمیوم (Cd) پایداری آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین را القا می‌کنند (اوس و حسین، 2016). وجود نیکل (Ni)، کادمیوم (Cd)، کروم (Cr) و کبالت (Co) مایه تحریک پایداری باکتری‌ها به طیف گسترده‌ای از پادزیست‌ها مانند کاناماسین، آمپی‌سیلین و متی‌سیلین شد (سامانتا و همکاران، 2012).

بنابراین پژوهش‌های انجام شده در دنیا کاربرد پادزیست‌ها می‌تواند پیامدهای چشم‌گیری بر ویژگی‌های گوناگون زیستی خاک داشته باشد که بزرگی این پیامدها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به گونه هم‌زمان کم‌تر بررسی شده است. این پژوهش با بررسی پیامد بهره‌گیری از سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر برخی از ویژگی‌های زیستی خاک با هدف نشان دادن پیامد آلودگی خاک با فلزهای سنگین بر پایداری پادزیستی خاک انجام شد و برای رسیدن به آن از شناسه‌های تنفس پایه و برانگیخته، و فراوانی باکتری‌های خاک استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جایگاه و چگونگی نمونه‌برداری خاک

برای انجام این پژوهش نیاز به دو گونه خاک آلوده و ناآلوده با فلزهای سنگین بود. خاک ناآلوده

شد که این پادزیست‌ها به گونه مؤثری در تصفیه خانه‌های فاضلاب‌ها تجزیه نمی‌شوند. خاک‌ها مخزن برجسته‌ای برای پادزیست‌ها هستند، زیرا بیش‌تر پادزیست‌ها به شدت در خاک ربایش می‌شوند و به راحتی تجزیه نمی‌شوند. پادزیست‌های مانده در خاک‌های کشاورزی معمولاً در اندازه‌های بالایی شناسایی می‌شوند که تا حد میکروگرم در کیلوگرم یا میلی‌گرم در کیلوگرم می‌رسند (ژو و همکاران، 2015). بررسی توسط لیو و همکاران (2009) نشان داد که سولفونامیدها و تری‌متوپریم مایه کاهش معنی دار کوتاه‌مدت در تنفس خاک کشاورزی می‌شوند. کنگ و همکاران (2006) گزارش کردند که پادزیست اکسی‌تتراسایکلین و فلز سنگین مس پیامد منفی معنی داری بر کارکرد اجتماع ریزجانداران خاک دارند، به ویژه هنگامی که هر دو آلاینده در زیستگاه ارائه می‌شوند. کنکل و وایت (2012) دریافتند سیپروفلوکساسین و سولفامتوکسازول توانایی کاهش تنفس خاک را دارند. با این وجود، هنگامی که پادزیست‌ها و فلزهای سنگین در خاک وجود دارند، مشخص نیست که کدام یک کارایی غالب را در پیدایش اختلال در فعالیت ریزجانداران دارد.

بنابراین، بررسی پیامد بالقوه پادزیست‌ها و فلزهای سنگین بر اختلال در کارکرد ریزجانداران خاک در غلظت‌های مرتبط با زیستگاه مهم است (تانگ و همکاران، 2020). روی هم‌رفته پادزیست‌ها، حتی آن‌هایی که به عنوان داروهای طیف گسترده طراحی شده‌اند، پیامدهای گزینشی خود را بر روی گروه‌های گوناگون ریزجاندارها دارند. در پی پیامدهای گزینشی پادزیست، فراوانی نسبی گونه‌های ریزجاندار دگرگون می‌شود و به دنبال آن در تعامل بین گونه‌های گوناگون تداخل ایجاد می‌شود (دینگ و هی، 2010). به گونه معنی داری، پیامد بر فراوانی ریزجاندارها به ویژگی‌های اصلی خاک (چرماک و همکاران، 2008)، گروه‌های ریزجاندارها (هامسفر و همکاران 2008)، و دوز پادزیست افزوده شده بستگی دارد (زیلزنای و همکاران 2006). در پژوهش هامسفر و همکاران (2008) درباره پیامد سولفادیازین،

کشاورزی با بافت لوم شنی از ژرفای 0-30 سانتی‌متری کشتزار پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان برداشت شد که در پنج سال گذشته کود دارای پادزیست دریافت نکرده بود، و خاک آلوده به فلزهای سنگین از معدن سرب و روی آهنگران در 23 کیلومتری شرق شهرستان ملایر در جنوب شرقی استان همدان با طول جغرافیایی "48°59'52" شرقی، عرض جغرافیایی "34°10'23" شمالی و بلندی 2029 متر و از چراگاه پیرامون معدن با طول جغرافیایی "49°00'10" شرقی، عرض جغرافیایی "34°09'30" شمالی و بلندی 2009 متر به گونه مرکب در سه تکرار نمونه‌برداری شد. هر یک از خاک‌ها جداگانه به خوبی آمیخته شد، بخشی از خاک‌ها هوا خشک و کوبیده شد و سپس از الک دو میلی‌متری گذرانده شد و برای بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن نگهداری شد و بخشی دیگر از خاک کوبیده و از الک دو میلی‌متری گذرانده شد و برای بررسی ویژگی‌های زیستی آن به ریخت تازه و با همان نم خود نگهداری شد.

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها

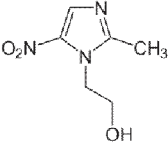
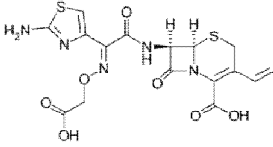
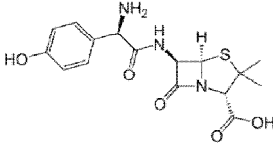
سنجش بافت خاک بر پایه قانون استوکس و به روش هیدرومتری انجام شد (گی و بادر، 1986). رسانایی الکتریکی در عصاره 1:2 خاک به آب، به کمک دستگاه هدایت سنج جن‌وی 4510 در دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (رودز، 1996). پ-اچ خاک در عصاره 1:2 خاک به آب به کمک دستگاه پ-اچ متر ایستک 25 آن اندازه‌گیری شد (توماس و همکاران، 1996). کربنات کلسیم معادل خاک به روش تیتراسیون برگشتی با هیدروکسید سدیم اندازه‌گیری شد (لوپپرت و اسکوراز، 1996). گنجایش تبادل کاتیونی خاک به روش استات آمونیوم یک نرمال اندازه‌گیری شد (باور و همکاران،

1952). اندازه‌گیری کربن‌آلی خاک به روش اکسایش‌تر انجام گرفت (واکلی و بلاک، 1934). پتاسیم فراهم به روش استات آمونیوم و با دستگاه فلیم فتومتر جن‌وی پی‌اف‌پی 7 اندازه‌گیری شد (کلوت، 1986). فسفر فراهم (در عصاره بی‌کربنات سدیم با پ-اچ هشت و نیم) به روش مورفی و ریلی (1962) و با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی کری 100 اندازه‌گیری شد. و غلظت همه فلزهای سنگین در خاک به روش هضم با اسیدنیتریک با دستگاه جذب اتمی واریان 220 اف‌اس اندازه‌گیری شد (هلریچ، 1990).

فراهم و آماده‌سازی پادزیست‌ها

سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین (بتالاکتام)، سفیکسیم (سفالوسپورین) و مترونیدازول (نیتروایمیدازول) که ویژگی‌های آن‌ها در جدول 1 آمده است از داروخانه همدان خریداری شد. کپسول آموکسی‌سیلین (500 میلی‌گرم) و قرص سفیکسیم (400 میلی‌گرم) هر دو ساخت شرکت داروسازی دانا تبریز-ایران و قرص مترونیدازول (500 میلی‌گرم) ساخت پارس دارو تهران-ایران بودند. در آغاز قرص و محتوی درون کپسول (آموکسی‌سیلین بدون رویه‌ی کپسول آن بهره‌گیری شد) برای هر سه پادزیست به دقت وزن شدند، وزن هم‌سنگ ماده ناب پادزیست به دست آمد. سپس در هاون کوبیده و همگن شدند و پس از آن وزن مورد نیاز برای آماده‌سازی محلول‌هایی برای غلظت‌های 100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک به‌کار رفتند. برای جلوگیری از دگرگونی ناخواسته در کیفیت داروها، محلول آن‌ها در همان روز آزمایش ساخته شد. هم‌چنین همه مواد شیمیایی بهره‌گیری شده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان فراهم شد.

جدول 1- برخی ویژگی‌های پادزیست‌های بکار رفته در پژوهش

مترونیدازول Metronidazole	سفیکسیم Cefixime	آموکسی سیلین Amoxicillin	فرمول
<chem>C6H9N3O3</chem>	<chem>C16H15N5O7S2</chem>	<chem>C16H19N3O5S</chem>	
			ساختار شیمیایی
نیتروایمیدازول‌ها	سفالوسپورین‌ها نسل سوم باکتری‌های G ⁻	بتالاکتام‌ها خانواده پنی‌سیلین بسیاری از باکتری‌های G ⁺ و G ⁻	دسته‌بندی پادزیستی
باکتری‌های بی‌هوازی احیاء شدن پس از جذب در درون یاخته و دگرگون شدن به متابولیت سمی و آسیب رساندن به DNA یاخته	مانند بتالاکتام‌ها پیامد بر دیواره یاخته باکتری	جلوگیری از ساخت پپتیدوگلیکان دیواره یاخته و تخریب دیواره یاخته باکتری	مکانیسم پیامد
443-48-1	79350-37-1	26787-78-0	شماره CAS
171/156	453/44	365/40	وزن مولکولی (گرم در مول)
pKa ₁ =2.58 pKa ₂ =14.48 سپهر و همکاران (2017)	pKa ₁ =2.10 pKa ₂ =2.92 pKa ₃ =3.45 سیگراوگلو و همکاران (2021)	pKa ₁ =2.74 pKa ₂ =7.4 pKa ₃ =9.01 pKa ₄ =10.29 پاسامونتس و کالاتو (2006)	اندازه‌های pK _a

آماده‌سازی تیمارها

چهار زمان آغازین به گونه جداگانه گرماگذاری شدند و از زمان پانزده روز تا پایان نود روز یک‌جا گرماگذاری شدند که در زمان‌های یاد شده از خاک انکوبه شده نمونه‌برداری شد و تنفس پایه و برانگیخته آن‌ها با روش‌های ویژه خود اندازه‌گیری شد. در زمان 90 روز گرماگذاری هر 10 روز یک‌بار نم خاک به روش وزنی کنترل و در نزدیک گنجایش زراعی با افزودن آب مقطر سترون نگهداری شد (پس از هر بار نمونه‌برداری نیز وزن کم شده در این محاسبه به دقت به کار رفت). هم‌زمان با افزودن آب مقطر سترون نمونه‌های خاک به خوبی هم‌زده می‌شدند تا زیستگاه هوازی در همه جای خاک فراهم گردد.

اندازه‌گیری تنفس پایه و برانگیخته

تنفس پایه خاک برآوردی از تندی کانی شدن ماده آلی خاک می‌باشد که با کمی دگرش به روش

محلول‌های آبی سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول با آب مقطر آماده شد و به گونه جداگانه برای هر زمان گرماگذاری به وزن معادل خاک خشک افزوده شد و به خوبی به هم زده شد. سپس آب مقطر سترون به نمونه‌های خاک افزوده شد تا به نزدیک رطوبت گنجایش زراعی برسد. برای هر تیمار از پادزیست‌ها 100 و 200 میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک، به همراه تیمار گواه (بدون پادزیست) در سه تکرار آزمایش شد (سرهم 63 نمونه). نمونه‌های خاک تیمار شده در تاریکی و در دمای آزمایشگاه (نزدیک 25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

زمان گرماگذاری

تنفس پایه و برانگیخته در هشت زمان: صفر (بدون گرماگذاری)، 1، 3، 7، 15، 30، 60 و 90 روز پس از گرماگذاری اندازه‌گیری شد. برای امکان انجام آزمایش

مایه‌زنی شد. سپس پتری دیش‌ها به گونه وارونه در گرم‌خانه در دمای 28/2 درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. در این بررسی بهترین رقت‌ها برای شمارش ریزجاندارها در خاک با تکرار در هر 8 مرحله زمانی به دست آمد.

فراوانی باکتری‌ها به روش کلنی‌شماری در کشتگاه پایه نوترینت آگار (N.A) که در بردارنده همه نیازهای غذایی رشد برای بیش‌تر باکتری‌ها است، شمارش شد. این کشتگاه جامد و دارای عصاره گوشت، ماده پروتئینی پپتون، ژلاتین گوارشی و آگار می‌باشد (صفری سنجانی و همکاران، 1389؛ آلف و نانی پیری، 1995).

تجزیه و تحلیل آماری

همان‌گونه که یادآور شد این پژوهش به ریخت فاکتوریل با سه فاکتور: خاک در سه گونه (خاک نآلوده کشاورزی، خاک آلوده معدن و خاک چراگاه نزدیک معدن)، پادزیست در هفت تیمار (گواه یا بدون پادزیست، آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، و مترونیدازول هر یک به اندازه 100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک) و زمان در سه بازه (کوتاه‌مدت، میان‌مدت و بلندمدت) با طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. گرماگذاری در هشت مرحله زمانی (صفر، 1، 3، 7، 15، 30، 60 و 90 روز) انجام گرفت و سپس میانگین دیتاهای سه بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز)، میان‌مدت (15 و 30 روز) و بلندمدت (60 و 90 روز) در زمان گرماگذاری 90 روزه پردازش و آنالیز شد. برای پردازش داده‌های هر آزمایش و رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL 2010 و برای آزمون آماری از نرم افزار SPSS 20 بهره‌گیری شده است. نرمال بودن دیتاها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. پیامد کاربرد هر یک از تیمارها و اثر متقابل آن‌ها با انجام تجزیه واریانس ارزیابی شد. آزمون میانگین هر یک از ویژگی‌های یاد شده در تیمارهای به‌کار رفته به دلیل شمار زیاد میانگین‌ها با روش توکی در پایه پنج درسد انجام شد. در جدول‌ها میانگین دیتاها \pm انحراف معیار آورده شده است.

مارابوتینی و همکاران (2013) بر پایه میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن پدید آمده از یک گرم خاک در یک روز اندازه‌گیری شد. همچنین تنفس برانگیخته به روش امینیان و همکاران (2018) با اندازه‌گیری میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن پدید آمده در یک ساعت از یک گرم وزن خشک خاک در درون ظرف دربسته پلاستیکی اندازه‌گیری و برآورد شد. ظرف پلاستیکی پیش از آغاز آزمایش برای آب‌بندی کامل آن کنترل شد. برای اندازه‌گیری تنفس پایه $\text{mg CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dry soil} \cdot \text{day}^{-1}$ ، 25 گرم از نمونه‌های خاک با آب مقطر سترون تا نزدیک گنجایش زراعی مرطوب شده و درون ظرف‌های پلاستیکی گفته شده در بالا به همراه ظرف شایسته دارای 25 میلی لیتر سود 0/25 نرمال گذاشته شد و برای 7 روز در دمای آزمایشگاه در تاریکی گرماگذاری شدند. دی‌اکسیدکربن پدید آمده سود را ختنی کرده و اندازه سود مانده در روز هفتم با اسیدکلریدریک 0/25 نرمال تیترا شد. همچنین سه نمونه گواه به همان روش بالا و در ظرف پلاستیکی بدون خاک آماده و آزمون شد. ناهمانندی میان سود مانده در ظرف گواه و نمونه نشانگر دی‌اکسیدکربن پدید آمده از نمونه خاک می‌باشد. برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته $\text{mg CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dry soil} \cdot \text{h}^{-1}$ ، آمیخته‌ای از 0/5 گرم گلوکز، 0/01 گرم دی پتاسیم فسفات و 0/07 گرم کلرید آمونیوم به 25 گرم خاک افزوده شد و به خوبی هم زده شد. آن‌گاه با آب مقطر سترون به نم نزدیک گنجایش زراعی رسانده شد، و پس از 16 ساعت نگهداری در تاریکی و دمای آزمایشگاه سود درون ظرف تیترا شد.

شمار همه باکتری‌های خاک

برای آماده‌سازی سوسپانسیون از خاک‌ها، یک گرم از خاک را در لوله آزمایش دارای 9 میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و لوله آزمایش تکان داده شد و سری‌های رقت تا رقت‌های موردنیاز آماده شد. از هر رقت به اندازه 100 میکرولیتر به کمک سرسمپلر سترون برداشته و بر محیط کشت با کمک پی‌بت پاستور آماده شده سترون در کنار شعله پخش شد. از هر تیمار سه تکرار در سه پتری

نتایج

برخی از ویژگی‌های خاک‌های نمونه‌برداری شده

فسفر فراهم می‌باشد. خاک چراگاه دارای بیش‌ترین اندازه pH، گنجایش تبادل کاتیونی، پتاسیم فراهم و درسد رس و سیلت و کربنات کلسیم معادل است. در خاک معدن نیز اندازه رسانایی الکتریکی و درسد شن به گونه معنی داری بیش‌تر از دو خاک دیگر است.

نتایج آزمایش برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک‌هایی که برای این پژوهش بهره‌گیری شد در جدول 2 آمده است. همان‌گونه که دیده می‌شود خاک کشاورزی دارای بالاترین درسد رس و کربن آلی، و اندازه

جدول 2- آزمون میانگین ویژگی‌های خاک‌های بهره‌گیری شده در پژوهش

خاک معدن	خاک چراگاه	خاک کشاورزی	
7/16 ± 0/03 b	7/39 ± 0/02 a	6/74 ± 0/05 c	pH (عصاره 1:2)
0/50 ± 0/01 a	0/38 ± 0/01 c	0/44 ± 0/00 b	رسانایی الکتریکی (عصاره 1:2) (dS/m)
4/12 ± 0/48 c	23/21 ± 0/26 a	19/75 ± 0/00 b	گنجایش تبادل کاتیونی (cmol ⁺ /kg)
65/90 ± 0/53 a	41/41 ± 0/93 c	58/96 ± 1/07 b	شن (%)
31/01 ± 0/53 b	43/23 ± 0/93 a	26/73 ± 1/94 c	سیلت (%)
3/07 ± 0/53 b	15/35 ± 0/00 a	14/30 ± 1/42 a	رس (%)
11/35 ± 0/63 b	25/21 ± 0/53 a	1/43 ± 0/38 c	کربنات کلسیم معادل (%)
0/32 ± 0/03 c	0/73 ± 0/03 b	0/90 ± 0/04 a	کربن آلی (%)
0/56 ± 0/06 c	1/26 ± 0/06 b	1/56 ± 0/07 a	ماده آلی (%)
3/96 ± 2/31 c	243/03 ± 4/09 a	161/20 ± 2/34 b	پتاسیم فراهم (mg/kg)
164/74 ± 18/13 ns	184/20 ± 4/62 ns	161/75 ± 8/67 ns	سدیم فراهم (mg/kg)
6/94 ± 0/48 c	13/37 ± 0/31 b	21/66 ± 0/79 a	فسفر فراهم (mg/kg)
لوم شنی	لومی	لوم شنی	بافت

میانگین‌های دارای حرف‌های یکسان در هر ردیف ناهمبندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند و ns بدون ناهمبندی معنی دار است.

اندازه برخی از فلزهای سنگین در خاک‌های آزمایش

شده

کیلوگرم و منیزیم 2177/25-11625/00 میلی‌گرم در کیلوگرم. گذشته از منیزیم، بیش‌ترین اندازه فلزها در خاک نمونه‌برداری شده از معدن (آهن‌گران) دیده شد. ترتیب آلودگی خاک‌ها به گونه خاک معدن < خاک چراگاه < خاک کشاورزی بود. به هرگونه اندازه فلزهای سنگین در خاک چراگاه نمونه‌برداری شده که در نزدیکی این معدن بود نیز بسیار بالا بود و بیش‌ترین غلظت منیزیم در خاک چراگاه اندازه گرفته شد. اندازه‌های بالای فلزهای سنگین در خاک چراگاه می‌تواند وابسته به ساختار مواد مادری خاک باشد که در نزدیکی معدن است.

غلظت فلزهای سنگین در خاک‌های نمونه‌برداری شده در جدول 3 فهرست شده است. اندازه‌های گزارش شده میانگین سه تکرار است. غلظت فلزهای سنگین در خاک‌های آزمایش شده به گونه زیر است: آهن 18775/00-84140/00 میلی‌گرم در کیلوگرم، سرب 31/00-10157/88 میلی‌گرم در کیلوگرم، روی 52/50-4432/50 میلی‌گرم در کیلوگرم، کادمیوم 39/16-0/75 میلی‌گرم در کیلوگرم، مس 15/50-92/50 میلی‌گرم در کیلوگرم، منگنز 375/00-11635/00 میلی‌گرم در

جدول 3- آزمون میانگین اندازه برخی فلزهای سنگین خاک‌های بهره‌گیری شده در پژوهش

فلزهای سنگین	خاک کشاورزی	خاک چراگاه	خاک معدن
آهن	22691/67 ± 965/03 b	20708/33 ± 1678/97 b	73110/00 ± 14143/22 a
سرب	33/20 ± 1/96 b	67/79 ± 1/90 b	9749/66 ± 361/45 a
روی	58/33 ± 7/10 b	89/16 ± 2/60 b	3839/20 ± 514/42 a
کادمیوم	0/75 ± 0/00 b	1/54 ± 0/07 b	37/53 ± 1/63 a
مس	16/45 ± 0/19 b	18/70 ± 3/69 b	89/58 ± 4/01 a
منگنز	387/50 ± 12/50 b	837/50 ± 90/13 b	9816/66 ± 1916/58 a
منیزیم	6052/08 ± 283/55 b	11166/67 ± 772/30 a	4697/32 ± 2198/67 b

میانگین‌های دارای حرف‌های یکسان در هر ردیف ناهممانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند.

تنفس پایه

(0/0649 و 0/0298 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) می‌باشد (جدول 4).

یافته‌های آزمون میانگین تنفس پایه در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه خاک و زمان (جدول 4) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس پایه در خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/1066 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز و کم‌ترین اندازه آن در خاک کشاورزی در بازه‌های زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) و میان‌مدت (15 و 30 روز) به ترتیب با اندازه‌های 0/0144 و 0/0172 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز دیده شد. در خاک کشاورزی اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت و تقریباً ثابت شد، در خاک معدن اندازه تنفس پایه در آغاز افزایش و سپس کاهش یافت. ولی در خاک چراگاه اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت. در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک چراگاه < خاک معدن < خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک چراگاه < خاک معدن < خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک معدن < خاک چراگاه < خاک کشاورزی بود.

یافته‌های تجزیه واریانس پیامد گونه خاک، پادزیست و زمان بر تنفس پایه در زمان گرماگذاری 90 روزه نشان داد که اثر اصلی تیمارها و اثر متقابل گونه خاک و زمان بر این فراسنجه خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود ($p < 0.01$) ولی اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه تیمارها از دیدگاه آماری معنی دار نبود. آزمون میانگین تنفس پایه نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین اندازه تنفس پایه به ترتیب وابسته به خاک چراگاه و خاک کشاورزی (0/0709 و 0/0200 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) می‌باشد (جدول 4). از سوی دیگر در بررسی اثر اصلی پادزیست دیده شد که در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس پایه در برابر گواه افزایش معنی داری داشت، بجز تیمارهای کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین و سفیکسیم که ناهممانندی معنی داری با گواه نداشتند. کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه (0/0532 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) را در برابر گواه (0/0430 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) نشان داد. در اثر اصلی زمان گرماگذاری، اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت که بیش‌ترین و کم‌ترین اندازه تنفس پایه به ترتیب وابسته به بازه زمانی کوتاه‌مدت و بلندمدت

جدول 4- آزمون میانگین تنفس پایه (میلی گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) ریزجانداران خاک در اثر متقابل دوگانه و نیز اثر اصلی زمان گرماگذاری و گونه خاک

اثر اصلی	اثر متقابل دوگانه زمان گرماگذاری و گونه خاک			
	زمان گرماگذاری	خاک چراگاه	خاک معدن	خاک کشاورزی
0/064± 0/033 A	0/106± 0/007 a	0/059± 0/004 c	0/028± 0/006 e	کوتاه مدت (صفر تا 7 روز)
0/052± 0/027 B	0/071± 0/008 b	0/068± 0/013 b	0/017± 0/010 f	میان مدت (15 و 30 روز)
0/029± 0/013 C	0/034± 0/007 de	0/040± 0/005 d	0/014± 0/010 f	بلند مدت (60 و 90 روز)
	0/070± 0/030 A	0/056± 0/014 B	0/020± 0/011 C	اثر اصلی گونه خاک

میانگین‌های دارای حرف‌های یکسان در اثر متقابل دوگانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

تنفس برانگیخته با سوستر

ولی این کاهش‌ها معنی دار نبودند، بجز تیمار کاربرد 100 میلی گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین که مایه بهبود اندازه تنفس برانگیخته شد و ناهمانندی معنی داری با گواه نداشت. در خاک کشاورزی تیمار کاربرد 100 میلی گرم در کیلوگرم مترونیدازول اندازه تنفس برانگیخته را در برابر گواه افزایش معنی دار داد (62/21 درصد) ولی کاربرد دیگر تیمارها ناهمانندی معنی داری با گواه نداشتند.

در خاک کشاورزی اندازه تنفس برانگیخته با گذشت زمان در آغاز کاهش و سپس افزایش یافت، در خاک معدن نیز روند همانندی دیده شد ولی این دگرش‌ها در اندازه تنفس برانگیخته معنی دار نبود (جدول 5). در خاک چراگاه اندازه تنفس برانگیخته با گذشت زمان کاهش معنی داری یافت. در بازه زمانی کوتاه مدت (صفر تا 7 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک چراگاه < خاک معدن < خاک کشاورزی بود. باید در نظر گرفته شود که اندازه تنفس برانگیخته خاک پتانسیل ریزجاندارهای زیموژن خاک (استراتژیست‌های r-) را برای تخریب بسترهای ساده نشان می‌دهد (اندرسون و دامش، 1978). روش اندازه‌گیری تنفس ناشی از بستر (تنفس برانگیخته) فرض می‌کند که نسبت ریزجاندارهایی که قادر به تجزیه گلوکز هستند در هر خاک یکسان است (اندرسون و دامش، 1978)، اما این می‌تواند در مورد هر گونه خاک درست نباشد (کلیمک، 2012). همان‌طور که لیتا و همکاران (1995) در آزمایشی با خاک آلوده به فلز

یافته‌های تجزیه واریانس پیامد گونه خاک، پادزیست و زمان بر تنفس برانگیخته در گرماگذاری 90 روزه نشان داد که اثر اصلی تیمارها و اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه آن‌ها بر این فراسنجه خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود ($p < 0.01$). بنابراین پاسخ‌دهی تنفس برانگیخته به تیمارهای بررسی شده بیش‌تر از تنفس پایه بود.

یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمارهای بدون کاربرد پادزیست در خاک چراگاه، کاربرد 100 میلی گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در خاک معدن و کاربرد 100 میلی گرم در کیلوگرم مترونیدازول در خاک کشاورزی به دنبال هم به اندازه‌های 0/0171، 0/0156 و 0/0155 میلی گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت بود. کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 200 میلی گرم بر کیلوگرم سفیکسیم در خاک کشاورزی به اندازه 0/0083 میلی گرم دی‌اکسیدکربن بر گرم خاک خشک در ساعت دیده شد. در خاک چراگاه کاربرد همه تیمارهای پادزیست پیامد کاهشی بر اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه داشتند ولی این کاهش‌ها معنی دار نبودند، و بیش‌ترین کاهش با کاربرد 100 میلی گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین دیده شد. در خاک معدن کاربرد همه تیمارهای پادزیست پیامد کاهشی بر اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه داشتند

نشان دادند، پوسیدگی سلول ریزجاندارهای مرده می‌تواند به‌گونه معنی داری سرعت تنفس خاک را افزایش دهد. صفری سنجانی و یونسی (2017) نشان دادند اگرچه تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در خاک‌های کشاورزی زیاد بود، اما تعداد نسبی باکتری‌های مقاوم به فلز و پادزیست در پسماندهای معدنی به شدت آلوده به‌گونه معنی داری بیشتر بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک معدن < خاک چراگاه < خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک کشاورزی < خاک معدن < خاک چراگاه بود. یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه پادزیست و زمان (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/0184 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت و کم‌ترین اندازه آن در تیمارهای بدون پادزیست، 200 و 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در بازه زمانی میان‌مدت، 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی میان‌مدت، 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی بلندمدت و میان‌مدت، 100 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی میان‌مدت و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی بلندمدت به دنبال هم به اندازه‌های 0/00891، 0/00956، 0/01005، 0/01007، 0/01023، 0/01029 و 0/01038 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت دیده شد. در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه کاهش یافت بجز تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم

مترونیدازول که معنی دار نبود، و کم‌ترین اندازه آن در تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه بهبود یافت ولی معنی دار نبود و بیش‌ترین آن در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه کاهش یافت که تنها کاهش در دو تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم و مترونیدازول معنی دار بود. بر پایه یافته‌ها، کاربرد همه تیمارها مانند گواه در سه بازه زمانی کوتاه‌مدت، میان‌مدت و بلندمدت به ترتیب کاهش و سپس افزایش دوباره را در اندازه تنفس برانگیخته نشان دادند، بجز در تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول که در زمان گرماگذاری 90 روزه روند کاهشی را نشان داد.

یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه خاک، پادزیست و زمان (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/0251 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت و کم‌ترین اندازه آن در تیمارهای کاربرد 100 میلی‌گرم آموکسی‌سیلین در کیلوگرم خاک کشاورزی در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) به دست آمد. تنفس برانگیخته در کاربرد 200 میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) و گواه خاک کشاورزی در بازه زمانی میان‌مدت به دنبال هم به اندازه 0/0027، 0/0030 و 0/0032 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت بود.

جدول 5- آزمون میانگین تنفس برانگیخته (میلی گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت) ریزجانداران خاک در اثر اصلی زمان گرماگذاری، اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست و اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان گرماگذاری

اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست	اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان گرماگذاری			گونه پادزیست (میلی گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک)	گونه خاک
	بلند مدت (60 و 90 روز)	میان مدت (15 و 30 روز)	کوتاه مدت (صفر تا 7 روز)		
0/0095±0/0051 b-d	0/0126±0/0035 c-L	0/0032±0/0012 L	0/0128±0/0000 c-L	گواه بدون پادزیست	
0/0096±0/0082 b-d	0/0186±0/0082 a-f	0/0027±0/0014 L	0/0075±0/0002 g-L	آموکسی‌سیلین (100)	
0/0085±0/0061 cd	0/0142±0/0083 a-k	0/0046±0/0012 k-L	0/0065±0/0004 h-L	آموکسی‌سیلین (200)	
0/0089±0/0046 cd	0/0147±0/0025 a-k	0/0053±0/0000 j-L	0/0068±0/0006 h-L	سفیکسیم (100)	کشاورزی
0/0083±0/0051 d	0/0134±0/0065 b-L	0/0056±0/0018 j-L	0/0060±0/0006 i-L	سفیکسیم (200)	
0/0155±0/0067 a	0/0233±0/0043 a-c	0/0097±0/0032 e-L	0/0134±0/0019 b-L	مترونیدازول (100)	
0/0099±0/0043 b-d	0/0124±0/0052 c-L	0/0054±0/0009 j-L	0/0118±0/0019 d-L	مترونیدازول (200)	
0/0146±0/0045 ab	0/0191±0/0059 a-e	0/0122±0/0018 d-L	0/0124±0/0001 c-L	گواه بدون پادزیست	
0/0156±0/0034 a	0/0167±0/0055 a-i	0/0131±0/0010 b-L	0/0170±0/0013 a-i	آموکسی‌سیلین (100)	
0/0134±0/0049 a-d	0/0155±0/0089 a-k	0/0115±0/0020 e-L	0/0132±0/0007 b-L	آموکسی‌سیلین (200)	
0/0135±0/0022 a-d	0/0120±0/0033 d-L	0/0134±0/0013 b-L	0/0150±0/0007 a-k	سفیکسیم (100)	معادن
0/0123±0/0037 a-d	0/0097±0/0051 e-L	0/0116±0/0007 d-L	0/0155±0/0018 a-k	سفیکسیم (200)	
0/0124±0/0045 a-d	0/0080±0/0045 f-L	0/0126±0/0014 c-L	0/0167±0/0015 a-i	مترونیدازول (100)	
0/0139±0/0048 a-c	0/0147±0/0095 a-k	0/0127±0/0009 c-L	0/0143±0/0003 a-k	مترونیدازول (200)	
0/0171±0/0059 a	0/0161±0/0032 a-z	0/0112±0/0024 e-L	0/0240±0/0008 ab	گواه بدون پادزیست	
0/0120±0/0059 a-d	0/0049±0/0011 k-L	0/0130±0/0025 c-L	0/0181±0/0005 a-g	آموکسی‌سیلین (100)	
0/0126±0/0057 a-d	0/0062±0/0006 i-L	0/0124±0/0006 c-L	0/0192±0/0018 a-e	آموکسی‌سیلین (200)	
0/0121±0/0061 a-d	0/0051±0/0008 k-L	0/0121±0/0014 d-L	0/0190±0/0010 a-e	سفیکسیم (100)	چراگاه
0/0127±0/0041 a-d	0/0079±0/0013 f-L	0/0128±0/0004 c-L	0/0173±0/0006 a-h	سفیکسیم (200)	
0/0146±0/0086 ab	0/0056±0/0028 j-L	0/0130±0/0006 c-L	0/0251±0/0010 a	مترونیدازول (100)	
0/0127±0/0085 a-d	0/0030±0/0009 L	0/0125±0/0007 c-L	0/0226±0/0016 a-d	مترونیدازول (200)	
	0/0121±0/0068 B	0/0100±0/0039 C	0/0150±0/0054 A	اثر اصلی زمان گرماگذاری	

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در هر یک از اثر اصلی و اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

نشان تیمارها بر لگاریتم فراوانی همه باکتری های خاک

پادزیست و زمان گرماگذاری (جدول 6) نشان داد که در خاک کشاورزی کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در بازه زمانی میان مدت (15 و 30 روز)، مایه بیش‌ترین افزایش ($0/29 \log \text{CFU.g}^{-1} \text{dry soil}$) (8/49) فراوانی همه باکتری‌های شمارش شده در خاک گردید، که ناهمانندی معنی داری با همه تیمارهای خاک کشاورزی و چراگاه (بجز گواه) در همان بازه زمانی را نداشت. در بازه زمانی کوتاه مدت (صفر تا 7 روز) کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در خاک کشاورزی و نیز گواه و تیمار آموکسی‌سیلین (هر دو

تجزیه واریانس نشان داد که پیامد گونه خاک، گونه پادزیست و زمان گرماگذاری بر لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود. نشانه‌ی اثر متقابل دوگانه گونه خاک و پادزیست، گونه خاک و زمان گرماگذاری، و گونه پادزیست و زمان گرماگذاری و نیز اثر متقابل سه‌گانه تیمارها پیامد معنی داری بر فراوانی همه باکتری‌های خاک داشتند. ($P < 0.01$ ، جدول 6).

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک در تیمارهای اثر متقابل سه‌گانه گونه خاک، گونه

داشت، که ناهمانندی معنی داری با همه تیمارهای خاک معدن (بجز تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین) در بازه زمانی بلند مدت (60 و 90 روز) را نداشت.

اندازه) در خاک چراگاه ناهمانندی معنی داری با تیمار دارای بیش‌ترین فراوانی همه باکتری‌های خاک را نداشتند. در خاک معدن کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی میان مدت (15 و 30 روز)، بیش‌ترین پیامد بازدارندگی بر رشد همه باکتری‌ها را

جدول 6- آزمون میانگین فراوانی همه باکتری‌های خاک در اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان؛ اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست و اثر اصلی زمان گرماگذاری (Log CFU Bacteria. g⁻¹ dry soil)

اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست	اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان			گونه پادزیست (میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک)	گونه خاک
	زمان گرماگذاری	بلند مدت (60 و 90 روز)	میان مدت (15 و 30 روز)		
7/37 ± 0/36 a	7/03 ± 0/24 f-p	7/63 ± 0/44 a-z	7/45 ± 0/07 d-L	گواه بدون پادزیست	کشاورزی
7/46 ± 0/77 a	6/74 ± 0/36 i-r	8/39 ± 0/31 ab	7/25 ± 0/09 c-m	آموکسی‌سیلین (100)	
7/54 ± 0/73 a	6/94 ± 0/14 g-p	8/49 ± 0/29 a	7/20 ± 0/05 d-m	آموکسی‌سیلین (200)	
7/18 ± 0/40 a	6/88 ± 0/10 g-r	7/66 ± 0/35 a-i	7/01 ± 0/07 f-p	سفیکسیم (100)	
7/24 ± 0/49 a	6/84 ± 0/21 g-r	7/81 ± 0/41 a-g	7/06 ± 0/03 f-o	سفیکسیم (200)	
7/27 ± 0/46 a	6/85 ± 0/16 g-r	7/77 ± 0/40 a-g	7/17 ± 0/02 d-m	مترونیدازول (100)	
7/39 ± 0/52 a	6/90 ± 0/12 g-q	7/75 ± 0/67 a-h	7/53 ± 0/25 a-k	مترونیدازول (200)	
5/54 ± 0/65 cd	4/73 ± 0/37 xy	5/90 ± 0/18 r-w	6/00 ± 0/23 q-v	گواه بدون پادزیست	
5/70 ± 0/68 c	4/95 ± 0/22 w-y	5/67 ± 0/10 t-x	6/49 ± 0/20 L-u	آموکسی‌سیلین (100)	
6/28 ± 0/60 b	5/59 ± 0/49 u-x	6/64 ± 0/32 j-t	6/61 ± 0/17 k-t	آموکسی‌سیلین (200)	
5/58 ± 0/68 cd	4/79 ± 0/20 xy	6/27 ± 0/28 m-u	5/69 ± 0/26 s-x	سفیکسیم (100)	معدن
5/83 ± 0/55 bc	5/15 ± 0/31 v-y	6/06 ± 0/06 o-v	6/27 ± 0/23 m-u	سفیکسیم (200)	
5/54 ± 0/55 cd	4/87 ± 0/32 xy	5/70 ± 0/17 s-x	6/05 ± 0/02 p-v	مترونیدازول (100)	
5/17 ± 0/75 d	4/94 ± 0/07 w-y	4/45 ± 0/00 y	6/13 ± 0/21 n-v	مترونیدازول (200)	
7/10 ± 0/72 a	6/59 ± 0/21 k-t	7/19 ± 1/16 d-m	7/51 ± 0/15 a-k	گواه بدون پادزیست	
7/45 ± 0/62 a	6/68 ± 0/04 i-s	7/66 ± 0/33 a-i	8/01 ± 0/07 a-f	آموکسی‌سیلین (100)	
7/47 ± 0/70 a	6/56 ± 0/08 k-u	8/06 ± 0/27 a-e	7/78 ± 0/17 a-g	آموکسی‌سیلین (200)	
7/47 ± 0/61 a	6/85 ± 0/12 g-r	8/21 ± 0/14 a-c	7/36 ± 0/27 c-L	سفیکسیم (100)	
7/39 ± 0/65 a	6/82 ± 0/15 g-r	8/12 ± 0/60 a-d	7/22 ± 0/11 c-m	سفیکسیم (200)	
7/17 ± 0/42 a	6/77 ± 0/06 h-r	7/65 ± 0/30 a-i	7/10 ± 0/15 e-n	مترونیدازول (100)	
7/33 ± 0/56 a	6/71 ± 0/16 i-r	7/99 ± 0/21 a-f	7/30 ± 0/03 c-L	مترونیدازول (200)	
	6/20 ± 0/89 C	7/19 ± 1/13 A	6/96 ± 0/63 B	اثر اصلی زمان گرماگذاری	

میانگین‌های دارای حرف‌های یکسان در هر اثر اصلی و اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

100 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم و مترونیدازول نداشت. کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی بیش‌ترین فراوانی همه باکتری‌های خاک را داشت (7/54 ± 0/73 log CFU.g⁻¹ dry soil) که تیمارهای گواه و پادزیست‌ها در دو خاک کشاورزی و چراگاه همان پیامد را نشان دادند. در زمان گرماگذاری

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک در تیمارهای اثر متقابل گونه خاک و پادزیست (جدول 6) نشان داد که در خاک معدن بهره‌گیری از پادزیست مترونیدازول (200 میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیش‌ترین پیامد بد را بر لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک داشت، که ناهمانندی معنی داری با گواه و کاربرد

میان مدت (بازه 15 و 30 روز)، فراوانی همه باکتری‌ها به گونه معنی داری افزایش پیدا کرد ($\log \text{CFU.g}^{-1} \text{dry soil}$) $1/13 \pm 7/19$. بازه زمانی بلند مدت (60 و 90 روز) بیش‌ترین کاهش را در فراوانی همه باکتری‌های خاک داشت (جدول 6).

بحث

تنفس پایه

تنفس پایه یکی از شناسه‌های زیستی برای ارزیابی کارکرد ریزجانداران خاک است که نشان از واکنش آن‌ها به تنش‌های درون خاک و دشواری‌های خاک به‌ویژه کمبود مواد آلی در خاک دارد. از این فراسنجه به گونه گسترده‌ای برای ارزیابی پیامد آلاینده‌هایی مانند فلزهای سنگین بر میکروبیوتای خاک بهره‌گیری شده است (بوگرا و همکاران 2022). در این پژوهش خاک چراگاه بالاترین اندازه تنفس پایه و خاک معدن کم‌ترین آن را داشت. خاک چراگاه با این‌که همانند خاک معدن آلوده به فلزهای سنگین است ولی با داشتن کربن آلی بیش‌تر از خاک کشاورزی زیستگاه بهتری برای تنفس ریزجانداران فراهم کرده است. این نشان می‌دهد ریزجانداران درون خاک بیش‌تر از کمبود کربن آلی آسیب می‌بینند. در برابر آن زهری بودن و تنش آلودگی خاک با فلزهای سنگین پیامد چندانی بر کارکرد ریزجانداران خاک نداشته است.

تیله- برون و بک (2005) گزارش کردند که در زمان اندازه‌گیری تنفس پایه خاک بودن پادزیست‌های باکتریواستاتیک که مایه مهار باکتری یا جلوگیری از فراوان شدن باکتری و نه کشتن آن می‌شود، نمی‌تواند بر تنفس باکتری پیامد داشته باشد، مگر اینکه رشد باکتری رخ دهد. برای آسیب پادزیست بر ریزجانداران، جابجایی آن به درون یاخته باکتری باید انجام شود. پس هنگامی که ریزجانداران خاک کارا تر هستند، پیامد پادزیست‌ها نمایان‌تر است. در این پژوهش کاربرد هر سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول مایه بهبود تنفس پایه ریزجانداران خاک شد. به‌ویژه در کاربرد 200

میلی‌گرم بر کیلوگرم مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه اندازه‌گیری شد. این می‌تواند وابسته به مرگ گروهی از ریزجانداران و بهبود خاک با افزایش مواد آلی آن‌ها و اثر متقابل زیان‌بار آن‌ها برای ریزجانداران دیگر باشد. در شمارش ریزجانداران گوناگون خاک دیده شد که فراوانی قارچ‌ها در این تیمار افزایش معنی داری دارد (داده‌ها در این پژوهش آورده نشده است).

خو و همکاران (2016) در پژوهش خود نشان دادند که کاربرد فلز مس و پادزیست سولفادیازین در خاک در آغاز دوره گرماگذاری مایه کاهش تنفس پایه خاک می‌شود که می‌تواند وابسته به مرگ و میر یا کاهش زیست توده ریزجانداران پاسخ‌دهنده به آن باشد. نشان بازدارندگی مس و سولفادیازین در پایان دوره گرماگذاری ناپدید شد یا وارونه گشت، که آن را وابسته به کاهش زیست فراهمی مس و سولفادیازین و یا سازگاری ریزجانداران دانسته‌اند و دلیل دیگر آن شاید دگرش کارکرد ریزجانداران باشد که با دگرگونی ساختار جامعه ریزجانداران خاک پدید آمده است. در این پژوهش اندازه تنفس پایه خاک با گذشت زمان کاهش یافت این کاهش می‌تواند وابسته به کاهش کربن آلی به‌ویژه ریخت فراهم و ساده آن در زمان نگهداری 90 روزه باشد.

خو و همکاران (2016) همچنین در پژوهش خود نشان دادند که تیمارهای هم‌زمان فلز سنگین با پادزیست در گرماگذاری‌ها آسیب بیشتری برای ریزجانداران و کارکرد آن‌ها داشته است. این شاید وابسته به افزایش زیست فراهمی پادزیست سولفادیازین در کنار فلز مس باشد و یا شاید وابسته به افزایش زهری بودن پادزیست سولفادیازین در کنار فلز مس برای یاخته باکتریایی باشد. همچنین گزارش شده است که برخی از کمپلکس‌های سولفونامیدها و فلزها آسیب بیشتری برای باکتری‌ها دارند. در این پژوهش دیده شد که در اثر متقابل خاک و زمان در خاک‌های کشاورزی و چراگاه اندازه تنفس پایه با زمان کاهش یافت، ولی در خاک معدن در آغاز افزایش و سپس کاهش یافت. این شاید وابسته به

داکسی‌سایکلیلین در برابر روی و مس پیامد معنی داری بر گوناگونی ریزجانداران در مرز فیلوم (شاخه) نداشت. این نشان می‌دهد که روی و مس در برابر پادزیست داکسی‌سایکلیلین می‌توانند فشار بیشتری بر باکتری‌های خاک داشته باشند که این یافته‌ها با یافته‌های تنفس پایه اندازه‌گیری شده هم‌خوانی داشت.

همان‌گونه که دیده شد، افزودن پادزیست‌ها در خاک روهم‌رفته مایه افزایش تنفس پایه خاک شد. این افزایش از دو راه می‌تواند رخ دهد. فروزینگی زیستی پادزیست و از سوی دیگر مرگ برخی باکتری‌ها و فراوان شدن کربن آلی برای گروه‌های پایدار می‌تواند مایه رخداد این پدیده شده باشد. باتلر و همکاران (2011) گزارش کردند از آنجایی‌که اندازه تنفس پایه در برابر تنفس برانگیخته کم است، انگیزش تنفس پایه با کاربرد دوز دوم تریکلوزان می‌تواند وابسته به بهره‌گیری باکتری‌های پایدار به تریکلوزان از این پادزیست باشد. باکتری‌های دارای آنزیم تجزیه‌کننده تریکلوزان در پاسخ به افزودن آن به خاک تنفس پایه بیشتری داشتند. از سوی دیگر افزایش تنفس پایه خاک می‌تواند وابسته به تنش و یا کانی شدن توده ریزجانداران مرده با ریزجانداران پایدار و مانده باشد.

تنفس برانگیخته با سوبسترا

تنفس برانگیخته با سوبسترا که بیش‌تر برای ارزیابی توده زیستی ریزجانداران کارا در خاک بهره‌گیری می‌شود (اندرسون و دامش، 1978) همانند یکی از شناسه‌های کلیدی کیفیت خاک به‌ویژه خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین بررسی می‌شود (ژانگ و همکاران، 2022). در این پژوهش همانند آنچه در بررسی تنفس پایه دیده شد خاک چراگاه بالاترین و خاک معدن کم‌ترین تنفس برانگیخته را داشت. این بار دیگر نشان می‌دهد که در این خاک‌ها کمبود ماده آلی در برابر آلودگی خاک تنش بیش‌تری بر ریزجانداران آن دارد، زیرا آلودگی خاک چراگاه به فلزهای سنگین کم‌تر از خاک معدن ولی به اندازه معنی داری بیش‌تر از خاک کشاورزی است.

ناهمانندی گروه‌های ریزجانداران در دو خاک و پاسخ ناهمانند آن‌ها به پادزیست‌ها باشد. صفری سنجانی و یونسی (2017) نشان دادند که فراوانی و کارکرد باکتری-های پایدار در برابر پادزیست‌ها در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین بیشتر از خاک‌های ناآلوده است. در پژوهشی لی و همکاران (2022) با افزودن پادزیست داکسی‌سایکلیلین و فلزهای سنگین روی و مس برابر اندازه‌ای که کود خوک به خاک کشاورزی می‌افزاید، دریافتند که افزودن روی و مس به خاک مایه کاهش تنفس پایه به ویژه در آغاز دوره گرماگذاری (پیش از 20 روز) می‌شود. اگر چه pH و هدایت الکتریکی در خاکی که غلظت بالای مس را دریافت کرده بود به اندازه خاکی که غلظت بالای روی را دریافت کرده بود دگرش نیافت، ولی مهار تنفس خاک با افزودن غلظت بالای مس بیش‌تر بود. غلظت کم داکسی‌سایکلیلین تنفس خاک را افزایش داد، ولی دوز بالای آن در آغاز دوره گرماگذاری تنفس خاک را مهار کرد. این می‌تواند وابسته به فرآیند هورمسیس باشد (هورمسیس فرایندی است که یک یاخته، ارگانسیم یا گروهی از ریزجانداران زنده پاسخ دوگانه از خود در برابر اندازه فزاینده از یک ماده یا شرایط ویژه شیمیایی نشان می‌دهند. آن‌ها در دوزهای پایین پاسخ فزاینده‌گی یا سودمند و در دوزهای بالا پاسخ مهاری یا کاهشی نشان می‌دهند).

در آزمایش مارتینز (2009) دوز پایین داکسی‌سایکلیلین (یک میلی‌گرم در کیلوگرم) مایه افزایش دوز بالای آن (15 میلی‌گرم در کیلوگرم) مایه مهار ریزجانداران شد. دیگر پژوهش‌گران دریافتند که غلظت بالای روی با آسیب رساندن به DNA و غشای یاخته، باکتری‌ها را می‌کشد (تونگی و همکاران، 2020) و مس توان سمی بودن نیرومندتری دارد که با برانگیختن رادیکال‌های آزاد مانند ROS، به پرده سیتوپلاسمی و DNA یاخته آسیب می‌زند (دوپون و همکاران، 2011؛ پروین و همکاران، 2018). پژوهش لی و همکاران (2022) نشان داد که افزودن غلظت‌های بالای

که با افزودن تریکلوزان، مهار تنفس پایه و تنفس برانگیخته در خاک رسی کمتر و تندی بازیابی آن نیز تندتر بود. آن‌ها گزارش کردند اگرچه این پیامد می‌تواند نشان‌دهنده درجه بالای پایداری ریزجانداران و برگشت‌پذیری آن‌ها باشد ولی می‌تواند وابسته به فراهمی زیستی کمتر تریکلوزان در خاک رسی در برابر دو خاک دیگر (لوم شنی و شن لومی) نیز باشد.

کانکل و وایت (2012) گزارش کردند بهبودی تندی تنفس خاک در تیمار با پازیست سولفامتوکسازول با زمان می‌تواند وابسته به دست‌کم یکی از شیوه‌های زیر باشد: (1) دگرش در آمیزه و گوناگونی ریزجانداران خاک از پاسخ‌دهنده به ریزجانداران پایدار به پادزیست، (2) زمان پیامد پادزیست بر ریزجاندار کوتاه بوده و همیشگی نیست به گونه‌ای که با گذشت زمان ریزجانداران توان پایداری را پیدا می‌کنند و (3) پازیست به اندازه فراوانی با خاک واکنش داده و ناکارآمد می‌شود تا از پیامد بیش‌تر پادزیست به ریزجانداران جلوگیری شود.

فراوانی همه باکتری‌های خاک

کاربرد آموکسی‌سیلین در زمان گرماگذاری میان‌مدت خاک کشاورزی بالاترین فراوانی همه باکتری‌ها را نشان داد، چنان‌چه در پژوهش صفری سنجانی و یونسی (2017) بیان شد باکتری‌های جدا شده از خاک‌های کشاورزی اغلب به چند پادزیست پایدار بودند. در بررسی‌های رشتبری (1399) آمده است که کاهش پیامد پادزیست‌ها بر ریزجانداران خاک و کارکرد آن‌ها به جذب فیزیکوشیمیایی پادزیست‌ها و کاهش پادزیست‌های محلول در آب بستگی دارد که مایه کمتر شدن پیامد زهری و افزایش پایداری پادزیستی می‌شود. بینه و همکاران (2007) نشان دادند که لگاریتم فراوانی همه باکتری‌ها و نیز باکتری‌های پایدار به آموکسی‌سیلین در خاک کود داده شده به گونه معنی داری بالاتر از خاک تیمار نشده با کوددامی بود. هویر و اسملا (2007) بیان کردند احتمالاً مواد مغذی کود امکان غنی‌سازی جمعیت‌های پایدار به پادزیست را در حضور کود فراهم

همانند با پژوهش‌های پیشین پاسخ‌دهی تنفس برانگیخته به تیمارهای بررسی شده بیش‌تر از تنفس پایه بود. گزارش شده است که بیش‌تر ریزجاندارانی که در خاک تنفس دارند، به گونه خفته هستند و تنفس را با اکسید کردن خاستگاه انرژی درون یاخته‌ای انجام می‌دهند. این پژوهش‌گران گزارش کردند شاید برای همین است که در خاک پس از افزودن پادزیست تنفس پایه کمتر پاسخ می‌دهد ولی هنگامی که یک بستره آلی به خاک افزوده می‌شود و ریزجانداران کارا می‌شوند، اثر پادزیست‌ها نمایان‌تر دیده می‌شود.

در این پژوهش در بررسی اثر متقابل پادزیست و زمان، بجز سفیکسیم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و مترونیدازول (100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم) که اندازه تنفس برانگیخته را هم‌چنان تا پایان دوره گرماگذاری کاهش دادند، پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و سفیکسیم در آغاز مایه کاهش و سپس مایه افزایش تنفس برانگیخته شدند. این یافته می‌تواند وابسته به کارا بودن ریزجانداران در روزهای آغازین و کم‌کار شدن آن‌ها در روزهای پایانی آزمایش باشد. باتلر و همکاران (2011) گزارش کردند پاسخ تنفس برانگیخته به کاربرد دوز دوم تریکلوزان کمتر است که نشان می‌دهد شاید همه زیست توده ریزجانداران با به‌کار بردن دوز دوم تریکلوزان کاهش یافته است. این می‌تواند وابسته به دگرش گروه‌ها و گوناگونی ریزجانداران خاک وابسته باشد تا جایی که گاهی کارکردهای ریزجانداران با افزودن دوباره تریکلوزان افزایش می‌یابد. این نشان‌دهنده برگشت‌پذیری ریزجانداران خاک در برابر این گونه آشفستگی و تنش‌ها همراه با سازگاری آن‌ها است. آن‌ها گزارش کرده‌اند که توان مهارکنندگی پادزیست‌ها گذشته از پاسخ‌دهی ریزجانداران بستگی به ویژگی‌های گوناگون خاک به‌ویژه کربن آلی، درصد رس و پی - اچ آن دارد.

در بررسی اثر اصلی خاک، همان‌گونه که دیده شد، خاک معدن و چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشتند. باتلر و همکاران (2011) نشان دادند

پژوهش‌ها نشان دادند که جذب می‌تواند مایه کاهش (تبله برون، 2005؛ کوردووا-کریلوس و اسکو 2007؛ کوتزرکه و همکاران 2008) یا ناپدید شدن (هاند رینکه و همکاران 2004) اثرات پادزیست بر جوامع ریزجاندار می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

خاک چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس پایه را داشت و خاک معدن بالاترین اندازه تنفس برانگیخته را نشان داد. خاک کشاورزی کم‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته را داشت. کاربرد مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته را نشان داد، در حالیکه کاربرد سفیکسیم کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشت. گرماگذاری در بازه زمانی کوتاه‌مدت بیش‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته را نشان داد و بازه زمانی میان‌مدت کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشت. بالاترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته در خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت دیده شد، و کم‌ترین اندازه تنفس پایه در خاک کشاورزی در بازه زمانی بلندمدت بود. بیش‌ترین فراوانی باکتری در گرماگذاری میان مدت با کاربرد آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی بود و کم‌ترین اندازه آن در همان بازه زمانی با کاربرد مترونیدازول در خاک معدن دیده شد.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که تنفس پایه و برانگیخته یا کارکرد و فراوانی زیست توده ریزجانداران در خاک‌های بررسی شده وابستگی کمی به آلودگی فلزی خاک دارد. در میان پادزیست‌های بررسی شده تنش آموکسی‌سیلین کمتر و تنش مترونیدازول بیش‌ترین بوده است.

می‌کند، در خاکی که به گونه دوره‌ای کود دریافت می‌کند ممکن است ژن‌های پایداری پادزیستی انباشه شده باشد. در این پژوهش خاک چراگاه ناهمانندی معنی داری با خاک کشاورزی در بالاترین فراوانی همه باکتری‌های خاک نداشت. حیدری و همکاران (2022) نشان دادند که فراوانی همه باکتری‌های خاک در خاک چراگاه و کشاورزی در هر دو تاریخ نمونه‌برداری (فوریه و آگوست) بیشتر از خاک کنترل بود. هم‌چنین بیان کردند که نسبت باکتری‌های پایدار به پادزیست/ همه باکتری‌های خاک، در خاک چراگاه بالاتر از خاک کشاورزی است. دلیل آن را چنین بیان کردند که اندازه بالاتر کادمیوم و روی در خاک‌های چراگاه و سطوح بالاتر پایداری به این فلزهای سنگین می‌تواند باعث انتخاب هم‌زمان پایداری به این پادزیست‌ها شود. گزارش‌های پیشین نشان می‌دهند که ژن‌های پایداری هم-تنظیم می‌تواند ایجاد شده باشد (لی و همکاران، 2017؛ ژائو و همکاران، 2019). انتقال افقی ژن از راه عناصر ژنتیکی متحرک باکتریایی یک روش مهم انتشار ژن‌های مقاومت فلزهای سنگین و پایداری پادزیستی است (لو و لو، 2019). پژوهش دینگ و همکاران (2010) نشان داد که جامعه باکتریایی خاکی با درسد رس بالا بیش‌تر از خاک‌های دیگر با pH پایین و اسید هیومیک بالاتر تحت تأثیر لینکومایسین قرار گرفت. بنابراین، pH اندازه اسید هیومیک می‌تواند نقش مهمی در کم کردن اثر پادزیست داشته باشد (برای مثال، با غیر فعال کردن پادزیست‌ها). در مطالعه وانگ و همکاران (2009)، جذب وابسته به pH برای لینکومایسین مشاهده شد و با افزایش pH محلول، جذب لینکومایسین کاهش یافت. تعدادی از

فهرست منابع:

1. رشتیری، م. 1399. پیامد کاربرد پادزیست‌ها و بهسازهای بیوجار و نانوزئولیت بر کارکرد ریزجانداران خاک و برهمکنش‌های زیستی گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.). رساله دکتری تخصصی رشته علوم خاک- بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه آموزشی علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
2. صفری سنجانی، ع.ا.، شریفی، ز.، صفری سنجانی، م. 1389. روش‌های آزمایشگاهی در میکروبیولوژی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، 562 صفحه.

3. Alef, K. Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic press.
4. Alexy, R. Kämpel, T. and Kümmerer, K. 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* 57(6):505-512.
5. Aminiyan, M. M., Hosseini, H., and Heydariyan, A. 2018. Microbial communities and their characteristics in a soil amended by nanozeolite and some plant residues: Short time in-situ incubation. *Eurasian Journal of Soil Science* 7(1):9-19.
6. Ananyeva, N.D. Susyan, E.A. Chernova, O.V. and Wirth, S. 2008. Microbial respiration activities of soils from different climatic regions of European Russia. *Eur. J. Soil Biol* 44:147-157.
7. Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem* 10(3):215-221.
8. Binh, C. T. T. Heuer, H. Gomes, N. C. M. Kotzerke, A. Fulle, M. Wilke, B. M. ... and Smalla, K. 2007. Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS microbiology ecology* 62(3):290-302.
9. Blackwell, P. A. Boxall, A. B. Kay, P. and Noble, H. 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(6):2192-2201.
10. Bouguerra, S. Gavina, A. Natal-da-Luz, T. Sousa, J. P. Ksibi, M. and Pereira, R. 2022. The use of soil enzymes activity, microbial biomass, and basal respiration to assess the effects of cobalt oxide nanomaterial in soil microbiota. *Applied Soil Ecology* 169:104246.
11. Bower, C. A. Reitemeier, R. F. and Fireman, M. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. *Soil science* 73(4):251-262.
12. Butler, E. Whelan, M. J. Ritz, K. Sakrabani, R. and Van Egmond, R. 2011. Effects of triclosan on soil microbial respiration. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(2):360-366.
13. Čermák, L. Kopecký, J. Novotná, J. Omelka, M. Parkhomenko, N. Plháčková, K. and Ságová-Marečková, M. 2008. Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Applied soil ecology* 40(2):348-358.
14. Ciğeroğlu, Z. Küçükyıldız, G. Erim, B. and Alp, E. 2021. Easy preparation of magnetic nanoparticles-rGO-chitosan composite beads: Optimization study on cefixime removal based on RSM and ANN by using Genetic Algorithm Approach. *Journal of Molecular Structure* 1224,129182.
15. Conkle, J. L. and White, J. R. 2012. An initial screening of antibiotic effects on microbial respiration in wetland soils. *Journal of Environmental Science and Health* 47(10):1381-1390.
16. Cordova-Kreylos, A. L. and Scow, K. M. 2007. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *The ISME journal* 1(7):585-595.
17. de Souza, M.J. Nair, S. Loka Bharathi, P.A. and Chandramohan, D. 2006. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic marine waters. *Ecotoxicology* 15(4):379-384.
18. Ding, C. and He, J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied microbiology and biotechnology* 87(3):925-941.
19. Doelman, P. and Haanstra, L. 1984. Short-term and long-term effects of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn on microbial respiration in relation to abiotic soil factors. *Plant Soil* 79:317-321.
20. Dupont, C. L. Grass, G. and Rensing, C. 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics* 3(11):1109-1118.

21. Gee, G. W. and Bauder, J. W. 1986. Particle-size analysis. p.383–411. A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. Particle-size analysis p:383–411. In A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
22. Hammesfahr, U. Heuer, H. Manzke, B. Smalla, K. and Thiele-Bruhn, S. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40(7):1583-1591.
23. Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of official analytical chemists.
24. Heuer, H. and Smalla, K. 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental microbiology* 9(3):657-666.
25. Heydari, A. Kim, N. D. Horswell, J. Gielen, G. Siggins, A. Taylor, M. ... and Palmer, B. R. 2022. Co-Selection of Heavy Metal and Antibiotic Resistance in Soil Bacteria from Agricultural Soils in New Zealand. *Sustainability* 14(3):1790.
26. Hirsch, R. Ternes, T. Haberer, K. and Kratz, K. L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total environment* 225(1-2):109-118.
27. Hund-Rinke, K. Simon, M. and Lukow, T. 2004. Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. *Journal of Soils and Sediments* 4(1):11-16.
28. Klimek, B. 2012. Effect of long-term zinc pollution on soil microbial community resistance to repeated contamination. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 88(4):617-622.
29. Klute, A. 1986. Water retention: laboratory methods. *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods* 5:635-662.
30. Kong, W.D. Zhu, Y.G. Fu, B.J. Marschner, P. and He, J.Z. 2006. The veterinary antibiotics oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environ. Pollut* 143(1):129–137.
31. Kotzerke, A. Sharma, S. Schauss, K. Heuer, H. Thiele-Bruhn, S. Smalla, K. ... and Schloter, M. 2008. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental Pollution* 153(2):315-322.
32. Kummerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75:417–434.
33. Lamshöft, M. Sukul, P. Zühlke, S. and Spiteller, M. 2010. Behaviour of ¹⁴C-sulfadiazine and ¹⁴C-difloxacin during manure storage. *Science of the Total Environment* 408(7):1563-1568.
34. Leita, L. Denobili, M. Muhlbachova, G. Mondini, C. Marchiol, L. and Zerbi, G. 1995. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol Fertil Soils* 19:103–109.
35. Li, L. G. Xia, Y. and Zhang, T. 2017. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *The ISME journal* 11(3):651-662.
36. Li, N. Chen, J. Liu, C. Yang, J. Zhu, C. and Li, H. 2022. Cu and Zn exert a greater influence on antibiotic resistance and its transfer than doxycycline in agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials* 423:127042.
37. Liu, F. Ying, G.G. Tao, R. Jian-Liang, Z. Yang, J.F. and Zhao, L.F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut* 157:1636–1642.
38. Loeppert, R. H. and Suarez, D. L. 1996. Carbonate and gypsum. *Methods of soil analysis Part 3*:437-474.

39. Lu, X. M. and Lu, P. Z. 2019. Distribution of antibiotic resistance genes in soil amended using *Azolla imbricata* and its driving mechanisms. *Science of The Total Environment* 692:422-431.
40. Marabottini, R. Stazi, S. R. Papp, R. Grego, S. and Moscatelli, M. C. 2013. Mobility and distribution of arsenic in contaminated mine soils and its effects on the microbial pool. *Ecotoxicology and environmental safety* 96:147-153.
41. Martinez, J. L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution* 157(11):2893-2902.
42. Montforts, M. H. Kalf, D. F. van Vlaardingen, P. L. and Linders, J. B. 1999. The exposure assessment for veterinary medicinal products. *Science of the total environment* 225(1-2):119-133.
43. Murphy, J. A. M. E. S. and Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27:31-36.
44. Ostermann, A. Gao, J. Welp, G. Siemens, J. Roelcke, M. Heimann, L. ... and Amelung, W. 2014. Identification of soil contamination hotspots with veterinary antibiotics using heavy metal concentrations and leaching data—a field study in China. *Environmental monitoring and assessment* 186(11):7693-7707.
45. Oves, M. and Hussain, F. M. 2016. Antibiotics and heavy metal resistance emergence in water borne bacteria. *J Investig Genomics* 3(2).
46. Parveen, S. Taranum, R. and Mittapally, S. 2018. Metal ions as antibacterial agents. *J. Drug Deliv. Ther* 8:411-419.
47. Pasamontes, A. and Callao, M. P. 2006. Sequential injection analysis for the simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in pharmaceuticals using second-order calibration. *Analytical sciences* 22(1):131-135.
48. Rhoades, J. D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods* 5:417-435.
49. Romero-Freire, A. Sierra Arag'ón, M. Martínez Garz'ón, F.J. and Martín Peinado, F.J. 2016. Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution? *Geoderma* 263:132–139.
50. Safari Sinegani, A. A. and Younessi, N. 2017. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of global antimicrobial resistance* 10:247-255.
51. Sager M. 2007. Trace and nutrient elements in manure, dung and compost samples in Austria. *Soil Biology and Biochemistry* 39:1383–1390.
52. Samanta, A. Bera, P. Khatun, M. A. H. A. M. U. D. A. Sinha, C. Pal, P. Lalee, A. and Mandal, A. 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2(1):178-189.
53. Sepehr, M. N. Al-Musawi, T. J. Ghahramani, E. Kazemian, H. and Zarrabi, M. 2017. Adsorption performance of magnesium/aluminum layered double hydroxide nanoparticles for metronidazole from aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry* 10(5):611-623.
54. Seiler, C. and Berendonk, T. U. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in microbiology* 3:399.
55. Sierra, J. Roig, N. Marti, E. Nadal, M. and Schuhmacher, M. 2012. Amendment of soils with composted sewage sludge. Long term effects on C and N transformation. In: Trasar-Cepeda, C. Hernandez, T. Garcia, C. Gonzalez-Carcedo, S. (Eds.), *Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration*. Springer-Verlag, Dordrecht, London, New York pp:51–62.

56. Sinegani, A. A. S. and Younessi, N. 2017. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of global antimicrobial resistance* 10:247-255.
57. Sukul, P. Lamshöft, M. Kusari, S. Zühlke, S. and Spiteller, M. 2009. Metabolism and excretion kinetics of ¹⁴C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites. *Environmental research* 109(3):225-231.
58. Tai, D. T. Ngan, M. H. K. Hung, C. K. Thu, N. N. A. and Nhi, N. T. N. 2022. The impact of heavy metals to bacterial tolerance of antibiotic resistance and growth in the aquatic environment of Vietnam. *Infect Dis Res* 3(1):1.
59. Tang, Q. Xia, L. Ti, C. Zhou, W. Fountain, L. Shan, J. and Yan, X. 2020. Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types. *Food and Energy Security* 9(4):e248.
60. Thiele-Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of plant nutrition and soil science* 166(2):145-167.
61. Thiele-Bruhn, S. 2005. Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-response relations determined with the iron (III) reduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 24(4):869-876.
62. Thiele-Bruhn, S. and Beck, I. C. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59(4):457-465.
63. Thomas, G. Sparks, D. Page, A. Helmke, P. Loeppert, R. Soltanpour, P. Tabatabai, M. Johnston, C. and Sumner, M. 1996. "Soil pH and soil acidity. Methods of soil analysis Part 3-chemical methods" *SSSA Book Series* 5.3 pp:475-490.
64. Tobor-Kapłon, M. A. Bloem, J. Romkens, P. F. and Ruiter, P. D. 2005. Functional stability of microbial communities in contaminated soils. *Oikos* 111(1):119–129.
65. Tongyi, Y. Yanpeng, L. Xingang, W. Fen, Y. Jun, L. and Yubin, T. 2020. Co-selection for antibiotic resistance genes is induced in a soil amended with zinc. *Soil Use and Management* 36(2):328-337.
66. Umer, M. I. and Rajab, S. M. 2012. Correlation between aggregate stability and microbiological activity in two Russian soil types. *Eurasian journal of soil science* 1(1):45-50.
67. Ute, H. Holge, H. Bert, M. Kornelia, S. and Søren, T.B. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem* 40(7):1583–1591.
68. Walkley, A. and Black, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science* 37(1):29-38.
69. Wang, C. Ding, Y. Teppen, B. J. Boyd, S. A. Song, C. and Li, H. 2009. Role of interlayer hydration in lincomycin sorption by smectite clays. *Environmental science & technology* 43(16):6171-6176.
70. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. and Zhou, H. 2013. Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. *Plant, soil and environment* 59(11):492-499.
71. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. and Zhou, H. 2015. Occurrence of (fluoro) quinolones and (fluoro) quinolone resistance in soil receiving swine manure for 11 years. *Science of the Total Environment* 530:191-197.
72. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. Wang, J. Zhou, H. and Jiang, C. 2016. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. *Ecotoxicology and environmental safety* 134:43-52.

73. Zhang, Q. Q. Ying, G. G. Pan, C. G. Liu, Y. S. and Zhao, J. L. 2015. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental science & technology* 49(11):6772-6782.
74. Zhang, X. Zhang, X. Li, L. Fu, G. Liu, X. Xing, S. ... and Chen, B. 2022. The toxicity of hexavalent chromium to soil microbial processes concerning soil properties and aging time. *Environmental Research* 204:111941.
75. Zhao, Y. Cocerva, T. Cox, S. Tardif, S. Su, J. Q. Zhu, Y. G. and Brandt, K. K. 2019. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of the Total Environment* 656:512-520.
76. Zielesny, Y. Groeneweg, J. Vereecken, H. and Tappe, W. 2006. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. *Soil Biology and Biochemistry* 38(8):2372-2380.

جداسازی باکتری‌های آزاد‌کننده فسفر در استخر پرورش ماهی با بکارگیری منابع مختلف فسفر نامحلول

واحد ارجمند، نعمت‌الله محمودی¹ و علیرضا فلاح نصرت آباد

دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران؛

vahed.arjmand@gmail.com

استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران؛ n.mahmoudi@modares.ac.ir

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛

rezafayah@yahoo.com

ص 215 - 228

دریافت: 1400/7/22 و 1401/8/11

چکیده

یکی از مهمترین دلایل کارایی ضعیف کودهای زیستی فسفات در استخرهای پرورش ماهیان، عدم توجه به نوع فسفر نامحلول غالب در محیط پرورشی و استفاده صرفاً از یک منبع (غالباً تری‌کلسیم فسفات) در فرآیند جداسازی و ارزیابی ریزجانداران آزادکننده فسفر می‌باشد. بخش بزرگی از فسفر نامحلول موجود در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی نامحلول (50 تا 90 درصد) است. بنابراین، به نظر می‌رسد ریز جانداران آزادکننده فسفر جداسازی شده صرفاً از منبع فسفر معدنی نتوانند در قالب کود زیستی در استخرهای پرورشی اثرگذار باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی با استفاده از محیط کشت NBRIP حاوی منبع فسفر آلی (فیتات کلسیم) و مقایسه عملکرد آنها با باکتری‌های حاصل از منبع فسفر معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات) در شرایط میکروکازم (ارلن حاوی رسوب: شرایط نسبتاً مشابه با استخر پرورشی) می‌باشد. توانایی جدایه‌ها (33 جدایه از منبع آلی و 19 جدایه از منبع معدنی) در انحلال فسفر در محیط کشت جامد و مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فسفر محلول در محیط کشت مایع حاوی فیتات کلسیم بین 57/40-141/93 میلی‌گرم در لیتر و در محیط کشت حاوی تری‌کلسیم فسفات بین 108/16-219/49 میلی‌گرم در لیتر بود. در مرحله نهایی، نتایج ارزیابی جدایه‌ها در میکروکازم رسوب نشان داد که سه جدایه حاصل از منبع فسفر آلی (P2 و P13، P3) بهترین جدایه‌های آزادکننده فسفر بودند (به ترتیب با آزادسازی فسفر 11/86، 12/53 و 28/18 میلی‌گرم در لیتر) و در مقایسه با جدایه‌های حاصل از منبع فسفر معدنی عملکرد بهتری داشتند. شناسایی مولکولی این جدایه‌ها مشخص کرد که این سویه‌ها متعلق به سه باکتری *Priestia aryabhatai*، *Bacillus zanthoxyli* و *Acinetobacter johnsonii* می‌باشند. با توجه به پتانسیل بیماری‌زایی *A. johnsonii* برای ماهی و انسان، سویه‌های خانواده *Bacillaceae* را می‌توان به‌عنوان کاندیدای استفاده در کودهای زیستی برای ارزیابی‌های تکمیلی آینده در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: انحلال فسفر آلی، فیتات، کود زیستی، ماهیان گرمابی، میکروکازم رسوب

¹ نویسنده مسئول، آدرس: مازندران، نور، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

بیشترین فرم آن از نوع نمک اینوزیتول هگزا فسفات (فیتات) می باشد و بیش از 50 درصد از فسفر آلی رسوبات را تشکیل می دهد. این ترکیب به عنوان پایدارترین و غالب ترین حالت فسفر آلی در اکوسیستم های آبی شناخته می شود (بی و همکاران، 2009). فسفر آلی به طور مستقیم قابلیت جذب و استفاده برای اغلب جوامع فیتوپلانکتونی را دارا نمی باشد و تحت فرآیندهای معدنی شدن ابتدا باید به شکل محلول و قابل جذب برای ریز جانداران (HPO_4^{2-} و $H_2PO_4^-$) تبدیل شود (کیم و همکاران، 2003؛ جانا، 2007). با توجه به نوع شرایط مدیریتی حاکم بر استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از قبیل کوددهی آلی در مقیاس بالا، غذایی، ورود انواع مواد آلی از طریق منبع آب ورودی و همچنین عدم لایروبی رسوبات کف استخرهای پرورش ماهیان گرمابی برای مدت طولانی، میزان بار آلی رسوبات کف استخرها بالا می باشد. بنابراین بازگردانی فسفر تثبیت شده در اجزاء آلی رسوبات به فرم محلول و قابل جذب، می تواند سبب افزایش میزان فسفر در دسترس تولیدکنندگان اولیه، کاهش استفاده از کودهای آلی و شیمیایی و به تبع آن کاهش آلودگی آبها، افزایش سود اقتصادی پرورش دهندگان، استفاده بهینه از واحد سطح و تولید محصولات آبی- پروری سالم تر گردد.

در این بین یکی از مهمترین روش های افزایش فسفر قابل دسترس و استفاده از فسفر انباشته شده در رسوبات کف استخرها (کمپلکس های آلی)، استفاده از باکتری های آزادکننده فسفر در قالب کودهای زیستی می باشد (جانا، 2007؛ مایترا و همکاران، 2015). تاکنون مطالعات چندانی در رابطه با کاربرد کود زیستی در حوزه آبی پروری جهان انجام نشده است. بیشتر این مطالعات به بررسی نقش ریزجانداران آزادکننده فسفر در چرخه فسفر اکوسیستم رودخانه ها و دریاچه های کم عمق اختصاص دارد. بهرا و همکاران (2014) نیز نقش این باکتری ها را در اکوسیستم مانگرو مورد بررسی قرار دادند.

تولیدات ماهیان گرمابی بیش از نیمی از محصولات آبی پروری ایران را به خود اختصاص داده است و بعنوان یکی از ارکان اساسی رشد صنعت آبی پروری کشور در سال های گذشته محسوب شده است (فائو، 2020). رشد گونه های پرورشی ماهیان گرمابی از قبیل کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در استخرهای پرورشی وابستگی زیادی به میزان تولیدات اولیه موجود در استخرها دارد (وو و ژو، 2005؛ خان و همکاران، 2007). مقدار مطلوب و مورد نیاز فسفر در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی 0/5 تا 1 میلی گرم در لیتر در نظر گرفته می شود. به منظور تأمین فسفر در طول یک دوره پرورش (9 ماهه)، به طور میانگین 800-1200 کیلوگرم از انواع کودهای شیمیایی و 12-10 تن کود آلی گاوی به ازای هر هکتار از استخرها بکار می رود (شکوریان و همکاران، 1377؛ پورغلام و همکاران، 1392).

فسفر یکی از مهمترین عوامل تولید اولیه در اکوسیستم های آبی به ویژه استخرهای پرورش ماهیان گرمابی می باشد اما در عین حال بدلیل عدم دسترسی تولیدکنندگان اولیه (فیتوپلانکتون ها) به این عنصر حیاتی، فسفر به عنوان یکی از عوامل محدودکننده تولید در اینگونه اکوسیستم ها در نظر گرفته می شود. درصد بسیار زیادی از فسفر معدنی (ناشی از کودهای شیمیایی و آلی) در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی به صورت ترکیب با کاتیون های فلزی مختلف نظیر کلسیم (در رسوبات با pH قلیایی)، آهن و آلومینیوم (در رسوبات با pH اسیدی) رسوب کرده و از دسترس خارج می شود (هو و همکاران، 2010؛ چن و همکاران 2011). از طرف دیگر، بخش بزرگی از فسفر کل موجود در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی نامحلول (50 تا 90 درصد) می باشد (خان و همکاران، 2014). اشکال مختلفی از فسفر آلی در رسوبات اکوسیستم های آبی وجود دارند که

آبی نظیر استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی می‌باشد، انتخاب ترکیبات معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، به منظور جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر منطقی به نظر نمی‌رسد و جایگزینی آن با یک ترکیب نامحلول آلی می‌تواند به عملکرد بهتر باکتری‌های جداسازی شده در شرایط واقعی کمک شایانی نماید. بنابراین در این مطالعه هدف گذاری شده است که از فیتات کلسیم به عنوان غالب‌ترین منبع فسفر آلی نامحلول در اکوسیستم‌های آبی در فرآیند جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر استفاده شود و سپس توانایی آنها با باکتری‌های جدا شده از ترکیب تری‌کلسیم فسفات در محیط میکروکازم رسوب مقایسه شود. محیط میکروکازم رسوب شامل ارلن حاوی رسوبات استخرها می‌باشد که شرایط تقریباً مشابه با اکوسیستم پرورش ماهیان گرمابی ایجاد می‌کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی

نمونه‌برداری از عمق 0-10 سانتی‌متری رسوبات 10 استخر پرورش ماهیان گرمابی در نواحی مختلف استان مازندران (در وسعتی به طول و عرض جغرافیایی $60^{\circ}53' E - 11^{\circ}52' N$ تا $75^{\circ}36' N - 58^{\circ}36'$) انجام شد. برای تهیه یک نمونه واحد، نمونه‌برداری‌های متعددی از رسوب نقاط مختلف یک استخر توسط نمونه‌بردار و نون‌گراب² (Hydro-Bios, Germany) انجام و سپس نمونه‌ها با یکدیگر مخلوط و همگن شدند. نمونه رسوبات در درون ظروف شیشه‌ای استریل در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نتایج تحقیقات یانگ و همکاران (2017) نشان داد که باکتری‌های آزادکننده فسفر نقش بسیار مهمی در ایجاد پدیده شکوفایی جلبکی در اکوسیستم‌های آبی را دارند. در حوزه آبی پروری نیز هو و همکاران (2010) اقدام به شناسایی باکتری *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* از رسوبات مزرعه کشت توام ماهی و برنج کردند و در ادامه گزارش دادند این باکتری توانایی زیادی در آزادسازی فسفر در محیط کشت مایع¹ NBRIP را دارد. در مطالعه آرمنده و همکاران (1397) مشخص شد که باکتری‌های آزادکننده فسفر (اکثراً از جنس *Pseudomonas*) جداسازی شده از رسوبات مزارع پرورش ماهیان گرمابی در محیط کشت NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات، توانایی مطلوبی در انحلال ترکیبات فسفر نامحلول در شرایط آزمایشگاهی دارند.

در همین راستا، در سال‌های اخیر محققین به بررسی مشکلات عملکرد کودهای زیستی و ابعاد مختلف این موضوع نیز پرداخته‌اند. در مطالعه مروری باشان و همکاران (2013) و لیو و همکاران (2015) اشاره شده است که اغلب محققین حوزه باکتری‌های آزادکننده فسفر، صرفاً از ترکیب معدنی تری‌کلسیم فسفات در فرآیند جداسازی استفاده کرده‌اند در صورتی که این ترکیب، یک منبع نسبتاً ضعیف و غیر قابل اعتماد برای جداسازی و بررسی عملکرد این باکتری‌ها است. در ادامه این مطالعه، بیان شده است که بدلیل تنوع در ویژگی‌های شیمیایی خاک‌های مختلف به نظر می‌رسد هیچ ترکیبی را نمی‌توان به عنوان یک منبع جهانی در فرآیند جداسازی در نظر گرفت. این محققین پیشنهاد دادند که بهتر است از چندین منبع فسفر نامحلول (فیتات کلسیم، فسفات آهن و فسفات آلومینیوم و غیره) علاوه بر تری‌کلسیم فسفات برای جداسازی این باکتری‌ها استفاده شود.

با در نظر گرفتن موارد ذکر شده و توجه به این نکته که بخش بزرگی از فسفر موجود در اکوسیستم‌های

² Van Veen Grab

¹ National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

شمارش و جداسازی باکتری های آزادکننده فسفر در محیط کشت جامد

در این مطالعه برای جداسازی و انتخاب باکتری های آزادکننده فسفر از محیط کشت جامد NBRIP (شامل 5 گرم $MgCl_2$ ، 0/25 گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0/2 گرم KCl ، 0/1 گرم $(NH_4)_2SO_4$ و 10 گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر با pH نهایی 7) استفاده شد.

همچنین از 3/7 گرم در لیتر فیتات کلسیم¹ برای جداسازی جدایه های آزادکننده فسفر آلی و 5 گرم در لیتر تری کلسیم فسفات² برای جداسازی جدایه های آزادکننده فسفر معدنی در ترکیب محیط کشت (به صورت جداگانه) استفاده شد. به همین منظور از نمونه رسوبات رقت های متوالی تا 10^{-8} تهیه و از هر رقت 100 میکرولیتر در سه تکرار روی محیط کشت جامد NBRIP گسترش داده شد. پلیت ها در دمای 28-30 درجه سانتی گراد درون انکوباتور نگهداری شدند و پس از گذشت 48 ساعت، کلنی های هاله دار شمارش و جداسازی شدند (ناتیال، 1999).

ارزیابی عملکرد جدایه ها در محیط کشت جامد (شاخص قطر هاله به قطر کلنی)

به منظور مقایسه توانایی جدایه ها در آزادسازی فسفر از شاخص هاله (Halo Index) در محیط کشت جامد NBRIP حاوی کلسیم فیتات (منبع فسفر آلی نامحلول) و تری کلسیم فسفات (منبع فسفر معدنی نامحلول) استفاده شد. برای این منظور 10 میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث (با تراکم 2×10^6 CFU/ml) بروی محیط کشت جامد NBRIP به صورت نقطه ای کشت داده شد (سه تکرار) و برای مدت 48 ساعت در دمای 28-30 درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد. در نهایت قوی ترین جدایه ها در این مرحله بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی شناسایی شدند (پرمونو و همکاران، 1996).

ارزیابی عملکرد جدایه ها در محیط کشت مایع

100 میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث (با تراکم 4×10^6 CFU/ml) درون ارلن های حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت مایع NBRIP حاوی تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم (به صورت جداگانه) تلقیح شد (مهتا و ناتیال، 2001). ارلن ها به مدت 48 ساعت در دمای 30-28 سانتی گراد درون انکوباتور شیکر دار (120 دور در دقیقه) نگهداری و سپس میزان فسفر آزاد شده بر اساس روش اسید آسکوربیک اصلاح شده توسط دستگاه Plate Reader اندازه گیری شد (اویلا سگورا و همکاران، 2004؛ رایس و همکاران، 2012). pH هر یک از محیط کشت ها نیز با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال (Jenway 3510, USA) مورد سنجش قرار گرفت. به منظور شمارش جمعیت جدایه ها، از نمونه محلول محیط کشت مایع، رقت های متوالی تهیه و در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. پس از 48 ساعت انکوباسیون (دمای 30-28 درجه سانتی گراد)، جمعیت جدایه ها با روش پلیت استاندارد و بر حسب CFU/ml گزارش گردید.

ارزیابی عملکرد جدایه ها در محیط میکروکازم رسوب

جهت ارزیابی عملکرد جدایه ها در شرایط شبیه سازی شده محیط طبیعی، از محیط میکروکازم³ (ارلن حاوی رسوب) استفاده شد. به منظور ایجاد محیط میکروکازم، 25 گرم رسوب تازه به همراه 100 میلی لیتر آب استخر درون ارلن های 250 میلی لیتری با یکدیگر ترکیب و درون اتوکلاو استریل شد. سپس 100 میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث حاوی جدایه های باکتریایی (با تراکم 4×10^6 CFU/ml) برداشت و به محیط میکروکازم تلقیح شد. ارلن ها به مدت 48 ساعت در دمای 30-28 درجه سانتی گراد درون انکوباتور شیکر دار نگهداری شدند و سپس اقدام به سنجش فسفر محلول و pH محیط شد (رایس و همکاران، 2012).

¹. Phytic Acid Calcium

². Tricalcium phosphate

³. Microcosm

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر آلی و معدنی

به‌طور کلی در این مطالعه، 52 جدایه باکتریایی آزادکننده فسفر معدنی و آلی از نمونه رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی جداسازی گردید که 33 جدایه از محیط کشت حاوی ماده فیتات کلسیم (منبع فسفر آلی نامحلول) و 19 جدایه نیز از محیط کشت حاوی ماده تریکلسیم فسفات (منبع فسفر معدنی نامحلول) جداسازی شد.

نتایج عملکرد جدایه‌ها در محیط کشت جامد و مایع

NBRIP

در بین جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی (جدایه‌های دارای کد P) جدایه‌های P15، P10، P31، P33، P5، P12، P26، P27 و P2، به‌ترتیب با میانگین شاخص هاله به کلنی 2/6، 2/2، 1/8، 1/8، 1/8، 1/8، 1/8 و 1/8 دارای بهترین عملکرد بودند. دامنه نوسانات میزان فسفر محلول در محیط‌کشت مایع حاوی ترکیب فیتات کلسیم نیز پس از گذشت 48 ساعت بین 57/40-141/93 میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و جدایه‌های P18، P33، P31، P26، P28، P27، P24 و P32، بهترین عملکرد را در آزادسازی فسفر از ترکیب آلی فیتات کلسیم دارا بودند (جدول 1).

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر با استفاده از توالی-

16S rRNA

در این تحقیق به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های با کارایی بهتر از توالی‌یابی ژن 16S rRNA استفاده شد. پس از ایجاد توده زیستی از هر یک از جدایه‌ها، استخراج ماده ژنتیکی (DNA) جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج ژنوم باکتریایی شرکت سیناژن انجام شد. تکثیر ژن مورد نظر با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Biorad، ساخت آمریکا) و با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R انجام و جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR به ژل آگاروز 1 درصد منتقل و الکتروفورز گردید (ویسبرگ و همکاران، 1991). در نهایت قطعه تکثیر شده جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر¹ کره جنوبی ارسال گردید. پس از فرآیند توالی‌یابی، توالی ژنی سویه‌ها، به کمک نرم افزار BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، درخت فیلوژنی سویه‌های جداسازی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 و روش Neighbor-joining ترسیم شد (تامورا و همکاران، 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور آنالیز توصیفی و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزارهای Excel (نسخه 2016) و SPSS (نسخه 23) استفاده گردید. همچنین به‌منظور مقایسه عملکرد هر یک جدایه‌ها نسبت به گروه شاهد و انتخاب برترین جدایه‌ها در مراحل مختلف، از آزمون‌های کروسکال-والیس (Kruskal-wallis) و آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way Anova) در سطح اطمینان 95 درصد استفاده شد.

¹ Bioneer

جدول 1- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌ها در محیط کشت مایع حاوی فیتات کلسیم

جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه	جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه
$2/4 \times 10^6$	5/05	$125/16 \pm 0/99^*$	P18	$1/3 \times 10^5$	5/31	$61/54 \pm 0/75$	P1
$2/5 \times 10^6$	5/08	$96/84 \pm 1/3^*$	P19	2×10^5	5/23	$82/46 \pm 0/75$	P2
$2/5 \times 10^6$	5/41	$82/24 \pm 0/37$	P21	$1/2 \times 10^5$	5/15	$68/95 \pm 1/32$	P3
$1/3 \times 10^6$	4/91	$141/93 \pm 1/36^*$	P22	$1/2 \times 10^6$	5/22	$102/28 \pm 1/13^*$	P4
$2/5 \times 10^6$	5/46	$83/76 \pm 0/37^*$	P23	$1/8 \times 10^6$	4/97	$66/99 \pm 1/3$	P5
$2/5 \times 10^6$	5/24	$107/29 \pm 0/75^*$	P24	$2/2 \times 10^5$	5/27	$74/61 \pm 0/99$	P6
$1/5 \times 10^6$	5/18	$114/27 \pm 0/37^*$	P26	$1/9 \times 10^6$	4/98	$78/1 \pm 1/3$	P7
$2/3 \times 10^6$	5/21	$113/73 \pm 0/75^*$	P27	$1/8 \times 10^5$	5/28	$72 \pm 1/36$	P8
$2/1 \times 10^6$	5/29	$113/83 \pm 2/1^*$	P28	$1/2 \times 10^6$	5/08	$72 \pm 0/99$	P9
$2/5 \times 10^5$	6/00	$76/79 \pm 0/65$	P29	$2/2 \times 10^5$	3/91	$79/62 \pm 1/64$	P10
$3/1 \times 10^6$	5/25	$112/96 \pm 2/6^*$	P30	$1/7 \times 10^4$	5/21	$57/40 \pm 1/65$	P11
$3/5 \times 10^6$	5/34	$118/19 \pm 2/29^*$	P31	$2/1 \times 10^4$	5/16	$71/56 \pm 1/13$	P12
$2/9 \times 10^6$	5/22	$107/08 \pm 0/99^*$	P32	$2/6 \times 10^6$	5/4	$90/52 \pm 1/96^*$	P13
$3/5 \times 10^6$	5/2	$124/72 \pm 0/37^*$	P33	$2/8 \times 10^5$	5/36	$61/76 \pm 0/65$	P14
$1/8 \times 10^5$	5/26	$90/95 \pm 0/35^*$	P34	2×10^5	4/04	$78/10 \pm 1/72$	P15
3×10^6	5/28	$88/12 \pm 0/35^*$	P35	$2/5 \times 10^6$	5/24	$99/01 \pm 1/96^*$	P16
---	6/22	$41/93 \pm 0/3$	شاهد	$2/5 \times 10^6$	5/11	$90/30 \pm 1/36^*$	P17

* نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

در محیط جامد تشکیل نداده‌اند، رهاسازی فسفر بالایی در محیط کشت مایع داشتند و بالعکس. از جمله دلایل این عدم انطباق را می‌توان به نرخ متفاوت انتشار اسیدهای آلی مختلف (ترشح شده توسط سویه) در محیط کشت جامد نسبت داد (بهره و همکاران، 2014؛ لی و همکاران، 2019). نتایج بدست آمده از این مطالعه نیز موید این موضوع بود که برخی جدایه‌ها نظیر P1، P21 و P29 علی‌رغم اینکه هیچگونه هاله‌ای در محیط کشت جامد تشکیل نداده بودند اما در محیط کشت مایع قادر به آزادسازی فسفر شدند و یا در برخی موارد جدایه‌هایی که عملکرد قوی‌تری در محیط کشت جامد (شاخص هاله به کلنی بزرگتر) از خود نشان داده بودند در محیط کشت مایع عملکرد ضعیفی نشان دادند (نظیر P15، P10 و T8). بنابراین استفاده از محیط کشت مایع به عنوان آزمون

در بین جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی (جدایه‌های دارای کد T) نیز جدایه‌های T8، T20 و T10 به ترتیب با میانگین شاخص هاله به کلنی 2، 2/25 و 1/8 بهترین عملکرد را از خود نشان دادند. همچنین دامنه نوسانات میزان فسفر محلول در محیط کشت مایع حاوی ترکیب تری کلسیم فسفات بین 108/16-219/49 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود و بهترین عملکرد در جدایه‌های T13، T17، T18 و T9 مشاهده شد (جدول 2).

بطور کلی، مشخص شده است که تکیه مطلق بر شاخص هاله به کلنی در محیط کشت جامد به منظور تعیین میزان کارایی سویه‌ها در آزادسازی فسفر چندان قابل اعتماد نیست. در تحقیقات زیادی (باشان و همکاران، 2013؛ لیو و همکاران 2015، سائو و همکاران، 2018) نشان داده شده است که جدایه‌هایی که هیچ گونه هاله‌ای

کردن محیط از طریق ترشح اسیدهای آلی و تولید پروتون یکی از سازوکارهای عمده باکتری‌ها برای آزادسازی فسفر از ترکیبات فسفر معدنی نامحلول است. همچنین با توجه به نقش سازوکارهای مرتبط با آنزیم‌ها در آزاد سازی فسفات از فیتات کلسیم، کاهش pH نیز تأثیری در محیط کشت مایع حاوی فیتات ندارد.

مکمل برای بررسی دقیق‌تر عملکرد اینگونه باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

در محیط کشت مایع تمامی جدایه‌های باکتریایی قادر به آزادسازی فسفر از منابع فسفر نامحلول بودند، همچنین دامنه توانایی جدایه‌ها در کاهش pH بین 0/22 تا 2/31 واحد متغیر بود و اکثر جدایه‌ها (آلی و معدنی) قادر به کاهش معنادار pH نسبت به تیمار کنترل شدند. اسیدی

جدول 2- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌ها در محیط کشت مایع حاوی تری کلسیم فسفات

جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه	جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه
3×10^6	5/28	$188/77 \pm 2/72^*$	T12	$2/2 \times 10^4$	5/24	$148/91 \pm 0/37$	T1
5×10^6	5/17	$219/49 \pm 2/29^*$	T13	2×10^6	5/53	$160/23 \pm 0/75$	T2
$2/1 \times 10^5$	5/16	$169/60 \pm 1/13$	T14	$1/9 \times 10^5$	5/19	$164/37 \pm 1/72$	T3
$2/9 \times 10^6$	5/08	$108/16 \pm 0/1$	T15	$3/5 \times 10^5$	5/48	$151/96 \pm 0/65$	T4
4×10^6	5/51	$168/30 \pm 2/7$	T16	$2/9 \times 10^6$	5/22	$160/23 \pm 0/75$	T5
$3/3 \times 10^6$	5/31	$216/88 \pm 2/9^*$	T17	$2/6 \times 10^6$	5/23	$155/22 \pm 1/7$	T6
6×10^6	5/27	$212/74 \pm 2/26^*$	T18	$2/9 \times 10^6$	4/48	$169/82 \pm 0/75$	T8
5×10^6	5/34	$182/67 \pm 2/6^*$	T19	$1/9 \times 10^6$	5/29	$207/73 \pm 0/3^*$	T9
$3/7 \times 10^6$	4/44	$183/98 \pm 2/26^*$	T20	4×10^6	5/17	$205/11 \pm 1/88^*$	T10
---	6/01	$123/85 \pm 1/13$	شاهد	2×10^6	5/25	$170/69 \pm 0/75$	T11

*** نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

عملکرد جدایه‌ها در محیط میکروکازم

نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های معرفی شده به محیط میکروکازم توانستند پس از 48 ساعت بخوبی خود را در رسوبات تثبیت کرده و به میانگین جمعیت CFU/ml $1/6 \times 10^6$ برسند. دامنه آزادسازی فسفر در این مرحله از 0/03 تا 28/18 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. از گروه آزادکننده‌های فسفر آلی، سویه‌های P2، P13، P3، P21، P1، P6، P34 و P33 بهترین عملکرد را در آزادسازی فسفر داشتند (جدول 3).

همچنین از گروه آزادکننده‌های فسفر معدنی نیز سویه‌های T2، T19، T4 و T3 به ترتیب با مقادیر فسفر

به‌علاوه، همبستگی معناداری بین میزان نوسانات pH و میزان فسفر آزاد شده در محیط حاوی منبع فسفر معدنی مشاهده نشد که این موضوع با نتایج تحقیقات تائو و همکاران (2008) نیز مطابقت داشت. به نظر می‌رسد که تفاوت در توان کلات‌کنندگی اسیدهای آلی برای کلات-کردن یون‌های کلسیم مهم‌ترین دلیلی باشد که چرا برخی از سویه‌های آزادکننده فسفر با اثر کمتر بر کاهش pH، بر حلالیت فسفر اثرگذاری بالاتری دارند (ایلمر و شیرنر، 1992). بنابراین رهاسازی فسفر نتیجه وجود هر دو اثر اسیدهای آلی شامل کاهش pH محیط و کلات‌کنندگی می‌باشد (آنتون، 2012).

محلول 10/24، 9/05، 6/39 و 5/2 میلی‌گرم در لیتر بهترین عملکرد را داشتند (جدول 4).

جدول 3- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی در محیط میکروکازم

جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه	جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه
2/8×10 ⁶	8/41	0/88 ± 0/23	P18	2/4×10 ⁶	7/98	10/29 ± 0/17*	P1
2/3×10 ⁶	8/78	6/4 ± 0/27*	P19	3×10 ⁶	7/99	28/18 ± 0/47*	P2
6/1×10 ⁶	8/11	11/8 ± 0/24*	P21	1×10 ⁷	8/08	11/86 ± 0/52*	P3
2/2×10 ⁶	8/14	0/25 ± 0/2	P22	1/2×10 ⁶	8/04	0/29 ± 0/19	P4
2/2×10 ⁶	8/40	0/71 ± 0/06	P23	2/2×10 ⁶	8/10	4/47 ± 0/06*	P5
7/2×10 ⁶	7/93	0/2 ± 0/03	P24	3/3×10 ⁶	7/98	9/97 ± 0/53*	P6
3/2×10 ⁵	8/12	1/02 ± 0/76*	P26	4/2×10 ⁵	8/04	4/83 ± 0/63*	P7
2/1×10 ⁶	8/09	0/77 ± 0/13	P27	3/8×10 ⁶	8/11	0/18 ± 0/11	P8
6/8×10 ⁶	7/98	0/33 ± 0/03	P28	2/6×10 ⁶	8/23	0/88 ± 0/03	P9
1/2×10 ⁶	8/45	0/91 ± 0/33*	P29	5/9×10 ⁶	8/28	0/27 ± 0/15	P10
3/9×10 ⁵	8/07	1/5 ± 0/06*	P30	1/8×10 ⁵	8/05	0/14 ± 0/03	P11
7/9×10 ⁶	7/99	0/8 ± 0/03	P31	7/1×10 ⁵	8/06	1/06 ± 0/07*	P12
3/5×10 ⁶	8/45	0/73 ± 0/1	P32	2/6×10 ⁶	8/03	12/53 ± 0/37*	P13
4/2×10 ⁵	8/68	8/02 ± 0/23*	P33	2/9×10 ⁵	8/36	0/44 ± 0/06	P14
5/2×10 ⁶	8/22	9/93 ± 0/23*	P34	2×10 ⁶	8/12	0/03 ± 0/03	P15
1/8×10 ⁶	8/05	0/29 ± 0/75	P35	1/6×10 ⁶	7/92	1/08 ± 0/37*	P16
---	8/50	0/07 ± 0/03	شاهد	2/5×10 ⁶	8/18	0/2 ± 0/03	P17

* ** نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

جدول 4- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی در محیط میکروکازم

جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه	جمعیت (CFU/ml)	pH	آزادسازی فسفر (mg/l)	جدایه
3/5×10 ⁶	8/04	0/36 ± 0/1	T12	6/4×10 ⁶	8/15	0/51 ± 0/06	T1
1×10 ⁶	8/22	1/5 ± 0/26*	T13	5×10 ⁵	8/08	10/24 ± 0/42*	T2
1×10 ⁷	8/35	0/82 ± 0/07*	T14	2×10 ⁷	8/07	5/2 ± 0/11*	T3
2/2×10 ⁶	8/07	0/33 ± 0/03	T15	3/2×10 ⁶	8/2	6/39 ± 0/17*	T4
6/1×10 ⁶	8/20	0/18 ± 0/1	T16	2/2×10 ⁶	8/29	0/6 ± 0/07	T5
3/5×10 ⁶	8/12	0/8 ± 0/03*	T17	3×10 ⁶	8/01	0/42 ± 0/03	T6
2/2×10 ⁶	8/06	0/14 ± 0/03	T18	6/2×10 ⁵	8/42	2/45 ± 0/42*	T8
1/5×10 ⁶	8/62	9/05 ± 0/23*	T19	2×10 ⁶	7/98	0/42 ± 0/2	T9
3/6×10 ⁶	8/47	3/7 ± 0/13*	T20	1/6×10 ⁶	8/39	0/71 ± 0/13*	T10
---	8/50	0/07 ± 0/03	شاهد	1/9×10 ⁶	8/15	0/66 ± 0/07	T11

* ** نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

در هنگام فرآیند جداسازی باکتری‌ها، طراحی و ساخت محیط‌های کشت متناسب با شرایط اکوسیستم‌ها (از نظر منابع کربن، فسفر و نیتروژن) باید مورد توجه قرار گیرد (ناتیال، 1999؛ لی و همکاران، 2016). نتایج مطالعه حاضر با نتایج برخی محققین (کولائینو و همکاران، 2010؛ لیو و همکاران، 2015) منطبق است که بیان داشتند کارآمدترین سویه‌های آزادکننده فسفر جداسازی شده از محیط جامد و مایع قادر به آزادسازی فسفر در شرایط خاک نبودند. بنابراین، استفاده از محیط‌های شبیه‌سازی شده نظیر میکروکازم می‌تواند گامی مؤثر در راه جداسازی باکتری‌های کارآمدتر تلقی گردد. نتایج حاصل از ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در محیط میکروکازم نشان داد که جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی میزان فسفر بیشتری نسبت به جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی رهاسازی کرده‌اند (جداول 3 و 4). به خوبی ثابت شده است که باکتری‌های آزادکننده فسفر از ترکیبات آلی با باکتری‌های آزادکننده فسفر از منابع معدنی از نظر استفاده از منابع فسفر و سازوکارهای دسترسی به فسفر، متمایز هستند (تائو همکاران، 2008).

برخی از باکتری‌های آزادکننده فسفر از طریق سازوکار ترشح اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین (اسید سیتریک، اگزالیک و تارتاریک) اثر قویتری بر انحلال منابع فسفر معدنی نامحلول دارند (شارما و همکاران، 2013؛ بهرا و همکاران، 2014). به‌علاوه، برخی دیگر از این باکتری‌ها با رهاسازی آنزیم‌ها (فسفاتاز و فیتاز) اثر قویتری بر انحلال منابع فسفر آلی نامحلول دارند (بهرا و همکاران، 2014). با توجه به مطالعات آرمند و همکاران (1397)، بیش از 85 درصد از فسفر کل موجود در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران را فسفر آلی تشکیل می‌دهد. با در نظر گرفتن این شرایط، انتظار می‌رود باکتری‌های آزادکننده فسفر آلی فعال‌تر از باکتری‌های آزادکننده فسفر معدنی در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی باشند. از این رو جداسازی و بررسی عملکرد باکتری‌های آزادکننده فسفر صرفاً بر مبنای ماده تری‌کلسیم فسفات (فسفر معدنی

در این مطالعه برای ارزیابی دقیق‌تر، آزمایشات ارزیابی در محیط مشابه با رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (میکروکازم رسوب) نیز انجام گرفت. از آنجایی که شرایط در استخر پرورشی، بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاهی است، ارزیابی جدایه‌ها در شرایط مشابه با محیط طبیعی بسیار مهم است. در این راستا، اکثر محققین (لیو و همکاران، 2015؛ لی و همکاران، 2019) توصیه کرده‌اند که فرآیند ارزیابی توانایی انحلال فسفر باکتری‌های آزادکننده فسفر باید در شرایط مشابه با محیط طبیعی در میکروکازم خاک/رسوب همراه شود. در مطالعه حاضر مشاهده شد که باکتری‌های انتخاب شد با استفاده از محیط کشت NBRIP (جامد و مایع) نظیر P22، P18، T13 و T17 هنگامی که در شرایط میکروکازم (محیط رسوبات) قرار گرفتند، قادر به تکرار عملکرد خوب خود در محیط میکروکازم رسوب نشدند و با افت محسوس عملکرد مواجه شدند. از دلایل این موضوع می‌توان به اتصال سریع فسفر آزادشده توسط جدایه‌ها به سایر کاتیون‌های فلزی نظیر کلسیم موجود در رسوبات اشاره کرد که با توجه به ماهیت قلیایی استخر پرورش ماهیان گرمابی، پدیده‌ای محتمل و شناخته شده است (گاتر و میر، 1993؛ مایترا و همکاران، 2015).

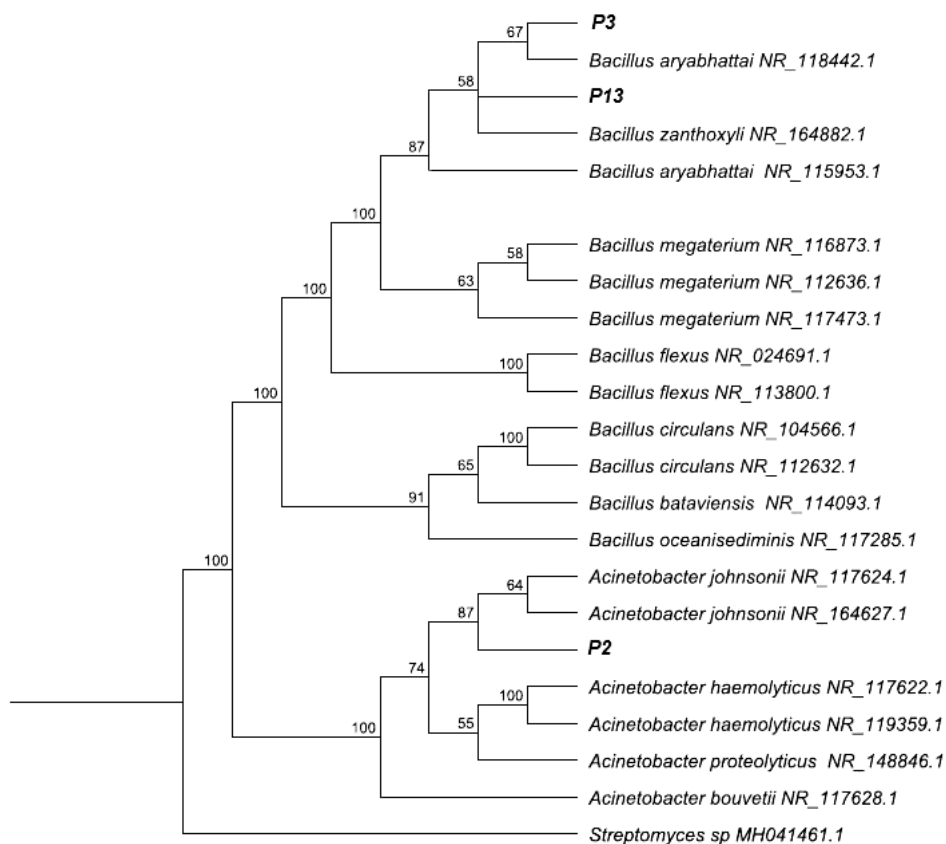
البته در این خصوص، بررسی‌های بیشتر در مورد دینامیک و پویایی فسفر در محیط‌های آبی (سازوکارهای درگیر، شدت ته‌نشینی و آزادسازی فسفر) پیشنهاد می‌گردد. از دیگر دلایل کاهش عملکرد جدایه‌ها در میکروکازم رسوب می‌توان به عدم تطابق مواد مغذی موجود در محیط‌های کشت معمول آزمایشگاهی با مواد مغذی موجود رسوبات آبی (علیرغم تثبیت مناسب جمعیتی) اشاره کرد. نوع و میزان منابع کربن، فسفر، نیتروژن و غیره تأثیری مهمی بر میزان توانایی جدایه‌ها در آزادسازی فسفر دارد. این تفاوت‌ها در نهایت سبب می‌شود باکتری‌های جداسازی شده در این محیط کشت‌ها هنگامی که در شرایط طبیعی (محیط حاوی رسوب) قرار می‌گیرند عملکرد متفاوتی را از خود بروز دهند. بنابراین

انتخاب نهایی بهترین جدایه‌ها به منظور شناسایی مولکولی

و آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها

با تأکید بر نتایج بدست آمده در مرحله میکروکازم، در نهایت سه جدایه P2، P3 و P13 که بهترین عملکرد را در بین سایر جدایه‌ها از خود نشان داده بودند به منظور شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی سه جدایه مورد نظر و مقایسه آن با سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) در شکل 1 ارائه شده است.

نامحلول) نمی‌تواند امری منطقی و مطلوب به نظر رسد که در نتایج مطالعه حاضر نیز این موضوع به وضوح تأیید شد. در همین راستا، تائو و همکاران (2008) بیان داشتند که باکتری‌های جدا شده از منابع معدنی اثر بهتری در آزادسازی فسفر از منابع معدنی و باکتری‌های جدا شده از منابع آلی اثر قویتری در آزادسازی فسفر از منابع آلی دارند. در مقاله مروری باشان و همکاران (2013) نیز بیان شد که اکثر سویه‌هایی که با استفاده از تری‌کلسیم فسفات انتخاب شده‌اند یا بی‌اثر بودند یا توانایی انحلال پایینی بر سایر ترکیبات فسفر نامحلول به‌ویژه در خاک‌های اسیدی و خاک‌های غنی از فسفر آلی داشتند.



شکل 1- درخت فیلوژنی جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA

Acinetobacter می‌باشد. توالی‌های جدایه P3 به باکتری GenBank: *Priestia aryabhatai* strain SB.P3 strain (MT757933) و توالی جدایه P13 به باکتری

نتایج نشان داد از مجموع سه جدایه‌ی منتخب، یک جدایه متعلق به جنس *Priestia*، یک جدایه متعلق به جنس *Bacillus* و یک جدایه متعلق به جنس

موجود (لوردزی و همکاران، 2020)، باکتری‌های خانواده باسیلاسه شناسایی شده در مطالعه حاضر عمدتاً به‌عنوان پروبیوتیک مطرح هستند و دارای اثرات بسیار مثبتی بر کیفیت آب می‌باشند. بررسی مطالعات گذشته نیز نشان داده است که باکتری *Acinetobacter johnsonii* برای ماهیان گرمابی بیماریزا نیست (کوزینکا، 2014). به‌علاوه این باکتری به ندرت در انسان بیماری ایجاد می‌کند (مونتانا، 2016). با این وجود، با توجه به عدم مطالعه دقیق روی پتانسیل بیماریزایی این باکتری در آبزیان و انسان، به‌کارگیری این سویه به‌عنوان کاندیدای کودهای زیستی تا زمان ارزیابی دقیق بیماریزایی این سویه روی گونه‌های ماهیان گرمابی توصیه نمی‌شود. خصوصیات میکروسکوپی و ریخت‌شناسی هر یک از جدایه‌ها نیز در جدول 5 آمده است.

GenBank:) *Bacillus zanthoxyli* SA.P13 (MT757932) تعلق داشتند. توالی جدایه P2 نیز متعلق به باکتری *Acinetobacter johnsonii* strain SC.P2 (GenBank: MT757934) بود. مروی بر منابع (آستین و آستین، 2012؛ فائو، 2017) حاکی از آن است که مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های بیماریزا در حوزه آبی‌پروری شامل *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Enterobacteria*, *Vibrio* و *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Flavobacterium* و *Pseudomonas* می‌باشند. همچنین باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* و *P. aeruginosa* از مهم‌ترین باکتری‌های بیماریزا در اکوسیستم‌های آب شیرین مخصوصاً در استخرهای ماهیان گرمابی محسوب می‌شوند (لیوپو و لیم، 2003؛ فائو، 2017؛ لی و همکاران 2020) و با توجه به اطلاعات

جدول 5- خصوصیات میکروسکوپی و ریخت‌شناسی باکتری‌های جداسازی شده

<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	
گرم منفی	گرم مثبت	گرم مثبت	رنگ آمیزی گرم
کوکو باسیل	باسیل	باسیل	شکل
فاقد اسپور	دارای اسپور	فاقد اسپور	قابلیت اسپور زایی
هوازی	هوازی	هوازی	تنفس
غیر متحرک	متحرک	متحرک	وضعیت حرکتی
شیری متمایل به زرد	متمایل به زرد	متمایل به زرد	رنگ کلنی
محدب	صاف	صاف	سطح کلنی
1 تا 2 میلی‌متر	3 تا 5 میلی‌متر	2 تا 4 میلی‌متر	اندازه کلنی
لزوج	کره‌ای	کره‌ای	بافت کلنی

استفاده شد. نتایج محیط میکروکازم رسوب نشان داد جدایه‌هایی که با استفاده از ترکیب فیتات کلسیم جداسازی شده‌اند توانایی بهتری در آزادسازی فسفر نسبت به جدایه‌های جداسازی شده با ترکیب تری‌کلسیم فسفات داشتند. ارزیابی در شرایط میکروکازم مبین این موضوع بود که جدایه‌ها به‌هنگام قرارگیری در شرایط مشابه استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (میکروکازم) عملکرد متفاوتی را نسبت به محیط‌های کشت معمول (جامد و مایع) از خود نشان می‌دهند. بنابراین، استفاده از

نتیجه‌گیری کلی

نوع منبع مورد استفاده در فرآیند جداسازی جدایه‌های آزادکننده فسفر باید بر اساس نوع ترکیبات موجود در اکوسیستم مورد مطالعه باشد. بنابراین با توجه به اینکه بخش بزرگی از فسفر کل موجود در اکوسیستم-های آبی ما از نوع فسفر آلی (50 الی 90 درصد) می‌باشد، در این مطالعه از ترکیب فیتات کلسیم به‌عنوان یکی از ترکیبات غالب فسفر آلی نامحلول استخرهای پرورش ماهیان برای جداسازی باکتری آزادکننده فسفر

کودهای زیستی برای ارزیابی های تکمیلی آینده در شرایط واقعی استخر پرورش ماهیان گرمابی در نظر گرفت.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت-مدرس و همچنین رئیس و کارشناسان محترم بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور تشکر و قدردانی می‌گردد.

محیط‌های شبیه‌سازی شده نظیر میکروکازم می‌تواند گامی مؤثر در راه جداسازی باکتری‌های کارآمدتر تلقی گردد.

سه باکتری آزادکننده فسفر *Priestia johnsonii*، *Acinetobacter* و *Bacillus zanthoxyli aryabhatai* در طول فرآیندهای ارزیابی، عملکرد مطلوبی را از خود نشان دادند. با توجه به پتانسیل بیماری‌زایی برای ماهی و انسان، سویه‌های خانواده *A. johnsonii* را می‌توان به‌عنوان کاندیدای استفاده در Bacillaceae

فهرست منابع:

1. آرمنده، م.، محمودی، ن. و فلاح نصرت آباد، ع. 1397. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل کننده فسفات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفر. نشریه علمی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. 6(4): 140-121
2. Antoun, H., 2012. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 46, pp.62-67.
3. Austin, B. and Austin, D.A., 2012. *Vibrionaceae* representatives. *Bacterial fish pathogens* (pp. 357-411). Springer, Dordrecht.
4. Avila-Segura, M., Lyne, J.W., Meyer, J.M. and Barak, P., 2004. Rapid spectrophotometric analysis of soil phosphorus with a microplate reader. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35(3-4), pp.547-557.
5. Bai, X., Ding, S., Fan, C., Liu, T., Shi, D. and Zhang, L., 2009. Organic phosphorus species in surface sediments of a large, shallow, eutrophic lake, Lake Taihu, China. *Environmental Pollution*, 157(8-9), pp.2507-2513.
6. Bashan, Y., Kamnev, A. A. and de-Bashan, L. E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49 (4), 465-479.
7. Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H.N., 2014. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), pp.97-110.
8. Cao, Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G. and Hu, Z. 2018. Phosphorus solubilizing and releasing bacteria screening from the rhizosphere in a natural wetland. *Water*, 10 (2), 195.
9. Chen, J., Lu, S., Zhao, Y., Wang, W. and Huang, M. 2011. Effects of overlying water aeration on phosphorus fractions and alkaline phosphatase activity in surface sediment. *Journal of Environmental Sciences*, 23 (2), 206-211.
10. Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. and Aguilar, O.M., 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), pp.727-738.
11. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) Major bacterial diseases affecting aquaculture. Aquatic AMR Workshop, Mangalore, India. [http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen .pdf](http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen.pdf).

12. FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2020. Sustainability in Action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
13. Gächter, R. and Meyer, J.S., 1993. The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. In Proceedings of the Third International Workshop on Phosphorus in Sediments (pp. 103-121). Springer, Dordrecht.
14. Hlordzi, V., Kuebutornye, F.K., Afriyie, G., Abarike, E.D., Lu, Y., Chi, S. and Anokyewaa, M.A., 2020. The use of Bacillus species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. Aquaculture Reports, 18, p.100503.
15. Hu, X. J., Li, Z. J., Cao, Y. C., Zhang, J., Gong, Y. X. and Yang, Y. F. 2010. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. Aquaculture International, 18(6), 1079-1091.
16. Illmer, P. and Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry, 27(3), pp.257-263.
17. Jana, B. B. 2007. Distribution pattern and role of phosphate solubilizing bacteria in the enhancement of fertilizer value of rock phosphate in aquaculture ponds: state-of-the-art. In First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization (pp. 229-238). Springer Netherlands.
18. Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review. Agronomy for Sustainable Development, 27 (1), 29-43.
19. Kim, C. H., Han, S. H., Kim, K. Y., Cho, B. H., Kim, Y. H., Koo, B. S. and Kim, Y. C. 2003. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. Current Microbiology, 47 (6), 457-461.
20. Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A. and Niemczuk, W., 2014. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii*-the emerging fish pathogens. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 58(2), pp.193-199.
21. Li, Y. and Boyd, C.E., 2016. Laboratory tests of bacterial amendments for accelerating oxidation rates of ammonia, nitrite and organic matter in aquaculture pond water. Aquaculture, 460, pp.45-58.
22. Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. and Mou, Z., 2019. Characteristics of inorganic phosphate-solubilizing bacteria from the sediments of a eutrophic lake. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(12), p.2141.
23. Li, X.M., Zhu, Y.J., Ringo, E. and Yang, D., 2020. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* and factors influencing them in different freshwater fish ponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(1), pp.111-124.
24. Lio-Po, G.D. and Lim, L.S., 2014. Infectious diseases of warmwater fish in fresh water. Diseases and disorders of finfish in cage culture. 2nd edition. Wallingford and Boston: CAB International, pp.193-253.
25. Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S. and Zhang, M., 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Applied Soil Ecology, 96, pp.217-224.
26. Maitra, N., Manna, S.K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C., Sahu, S.K. and Sharma, A.P., 2015. Ecological significance and phosphorus release potential of phosphate solubilizing bacteria in freshwater ecosystems. Hydrobiologia, 745(1), pp.69-83.
27. Mehta, S., and Nautiyal, C. S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology, 43 (1), 51-56.

28. Montaña, S., Schramm, S.T., Traglia, G.M., Chiem, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Quiroga, C., Tolmasky, M.E. and Iriarte, A., 2016. The genetic analysis of an *Acinetobacter johnsonii* clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. *PLoS One*, 11(8), p.e0161528.
29. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170 (1), 265-270.
30. Premono, M.E., Moawad, A.M. and Vlek, P.L.G., 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere (No. REP-12113. CIMMYT.).
31. Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. and Clesceri, L. S. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association: Washington, DC, USA, 10.
32. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2(1), pp.1-14.
33. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp.2725-2729.
34. Tao, G. C., Tian, S. J., Cai, M. Y. and Xie, G. H. 2008. Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18(4): 515–523.
35. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
36. Gen-Fu, W. and Xue-Ping, Z., 2005. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. *Water Research*, 39(19), pp.4623-4632.
37. Yang, L., Liu, Y., Cao, X., Zhou, Z., Wang, S., Xiao, J., Song, C. and Zhou, Y., 2017. Community composition specificity and potential role of phosphorus solubilizing bacteria attached on the different bloom-forming cyanobacteria. *Microbiological Research*, 205, pp.59-65.

اثر متابولیت‌های حاصل از تجزیه میکروبی پر مرغ بر رشد کاهو

لیلی احمدی، کاظم خاوازی¹، ژیلای بهارلویی و محمدحسین داودی

دانشجوی گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان): leili.ahmadi5@yahoo.com

استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: khavazik@yahoo.com

استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان): j.baharlouei@khuisf.ac.ir

استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: davoodi_mh@yahoo.com

ص 229 - 241

دریافت: 1400/6/22 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

در این مطالعه برای تولید کود با مواد طبیعی، از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز به‌منظور تجزیه پر مرغ متشکل از پروتئین کراتین است استفاده گردید. تعداد 29 نمونه خاک از عمق صفر تا سی سانتی متری مزارع کشاورزی جمع‌آوری شد و با پر مرغ مخلوط گردید. پس از سه هفته از خاک‌های مخلوط با پر 31 جدایه که قادر به رشد بر روی محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد (Feather Meal Agar, FMA) بودند جداسازی شدند. ایزوله‌ها به محیط مایع حاوی پر انتقال داده شدند و توان تجزیه پر توسط آنها بررسی گردید. تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر بر رشد کاهو در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه بررسی شد. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی با سه محلول حاصل از تجزیه پر مرغ (gh1, b1, c11) و محلول‌پاشی با آب مقطر (شاهد) بودند. نتایج نشان داد تعداد هشت جدایه با تولید آنزیم کراتیناز قادر به تجزیه کامل پر در طول هفت روز بودند. بالاترین فعالیت آنزیم کراتیناز با تجزیه کامل پر معادل 56/8 U/ml مربوط به جدایه *Bacillus methylotrophicus* gh1 بود. همچنین حداکثر غلظت اسیدآمینو آزاد، در محیط کشت جدایه *Bacillus siamensis* c11 معادل 1065 µg/ml مشاهده شد. سه محلول حاصل از تجزیه پر تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر روی وزن تر کاهو، وزن خشک کاهو و وزن تر ریشه داشتند. در تیمارهای *Bacillus methylotrophicus* gh1، *Bacillus velezensis* b1 و *Bacillus siamensis* c11 وزن تر کاهو به ترتیب 26/1% و 14/1% و 19/9%، 25/7% و 15/2% نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دادند. یافته‌ها نشان داد با استفاده از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز می‌توان تجزیه پر را افزایش داده و از محصول حاصل به‌عنوان محرک رشد کاهو استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسیدآمینو آزاد، خاک، کراتین، محرک رشد

¹ نویسنده مسئول، آدرس: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی، موسسه تحقیقات خاک و آب.

مقدمه

با افزایش جمعیت طی چند دهه گذشته تولید محصولات کشاورزی نیز رشد داشته است و منجر به حداکثر استفاده از محصولات شیمیایی به منظور افزایش بهره‌وری و عملکرد گیاهان شده است که تهدیدی جدی برای سلامت انسان و محیط‌زیست است. به همین دلیل کاهش استفاده از کودهای شیمیایی بزرگ‌ترین چالش امروزه کشاورزان است (باری و همکاران، 2021). استفاده از مواد زائد حیوانی به‌عنوان منابع تجدیدپذیر به منظور تولید کود یک گزینه مناسب است (ارخی پچینکو و همکاران، 2005). گروه‌های تحقیقاتی تلاش کرده‌اند با استفاده از محصولات جانبی کشاورزی، دام و طیور، موجبات بازیافت آن‌ها را فراهم نمایند (ردی و همکاران، 2013؛ ردی و یانگ، 2005). پر مرغ مهم‌ترین محصول جانبی صنایع فرآوری طیور در سراسر جهان است (باری و همکاران، 2021). طبق بررسی وزارت کشاورزی ایالات متحده، در سال 2020 حدود 100/5 میلیون تن گوشت تولید شده و در نتیجه بیش از 4/7 میلیون تن پر مرغ در سراسر جهان تولید شده است (چیو و همکاران، 2020).

در حال حاضر پر با دفن کردن یا سوزاندن دفع می‌شود که منجر به خطرات جدی بهداشتی و آلودگی محیط‌زیست می‌شود (دیدیر و همکاران، 2005). پر مرغ حاوی 90% پروتئین با عنوان کراتین است (اردیاتی، 2019). پروتئین کراتین یک منبع طبیعی از اسیدهای آمینه ضروری و پپتیدها است که می‌تواند در مکمل‌های خوراک دام و به‌عنوان کود مورد استفاده قرار گیرد (ورما و همکاران، 2016). در حال حاضر بازیافت زباله‌های کراتین با استفاده از دمای بالا، فشار زیاد، هیدرولیز اسیدی و قلیایی انجام می‌شود (تیواری و گوپتا، 2012؛ جایالکشمی و همکاران، 2012؛ گوپتا و همکاران، 2013). هزینه بالا، نیاز به مقدار زیاد انرژی و از بین رفتن اسیدهای آمینه ضروری (هرتز و همکاران، 2016) مانند لیزین، متیونین و هیستیدین (آدلیر و لطیف، 2016؛

براندلی و همکاران، 2010) توجه محققان را به توسعه فن‌آوری‌های جدید برای تجزیه پرها جلب کرده است. بیوتکنولوژی به‌عنوان یک روش جایگزین و امیدوارکننده برای این منظور شناخته شده است. پرها توسط ریزجانداران از جمله باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها که آنزیم کراتیناز تولید می‌کنند تجزیه می‌شوند. تعدادی از سویه‌های میکروبی با عملکرد تجزیه پر از طریق روش‌های مختلف غربالگری جداسازی شده‌اند (گوپتا و رامنانی، 2006؛ براندلی و همکاران، 2010). ریزجانداران برای محیط زیست اهمیت زیادی دارند و به‌عنوان بازیافت‌کننده اصلی در محیط عمل می‌کنند. متابولیت‌های اولیه مانند اسیدآمینه، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی و الکل به‌عنوان مکمل‌های غذایی و همچنین در تولید کالاهای صنعتی از طریق فرآیند تبدیل زیستی استفاده می‌شوند (سینگ و همکاران، 2017).

بر اساس تحقیقات انجام شده سویه *Bacillus pumilus* KHS-1 قادر به تجزیه پر است. تأثیر پر تجزیه شده بر رشد گیاه هویج و کلم چینی نشان داد که این محصول می‌تواند به‌عنوان کود استفاده شود (کیم و همکاران، 2005) همچنین پر تجزیه شده به‌وسیله باکتری *Streptomyces sampsonii* GS1322 به خاک اضافه شد و تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی بذر گندم داشت (جین و همکاران، 2016). در پژوهش دیگری تأثیر پر تجزیه شده توسط سویه *Bacillus pumilus* JYL بر روی گندم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن تازه و وزن خشک نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (سان و همکاران، 2021). با مدیریت پایدار ضایعات پر و استفاده از محصول حاصل از تجزیه کراتین به‌عنوان محرک رشد گیاه، انتظار می‌رود در آینده بتواند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی باشد (باری و همکاران، 2021).

کاهو یکی از سبزی‌های با اهمیتی است که به‌طور گسترده کشت می‌شود و به‌عنوان سالاد در سراسر

جهان مصرف می‌شود. کاهو به دلیل عناصر معدنی، ویتامین‌ها و فولات نقش بسزایی در رژیم غذایی انسان دارد (آموزگار و همکاران، 2017؛ ساموئولین و همکاران، 2009). ایران با سطح زیر کشت 17000 هکتار و تولید سالانه 570 هزار تن، در رتبه ششم قرار گرفته است (فائو، 2012)؛ بنابراین به‌کارگیری روش‌هایی که باعث افزایش مقدار تولید این محصول شود اهمیت شایانی در روش‌های مدیریتی دارد.

هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز از محیط خاک‌های مخلوط شده با پر مرغ، تعیین مقدار اسید آمینه تولید شده در محیط تجزیه پر و بررسی تأثیر محلول‌پاشی با فرآورده‌های تولید شده از تجزیه پر به‌عنوان محرک رشد بر عملکرد کاهو بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها از خاک مخلوط با پر

تعداد 29 نمونه خاک از عمق صفر تا سی سانتی متری مزارع کشاورزی مازندران، آذربایجان غربی، سمنان، خراسان، بوشهر، چهارمحال و بختیاری، فارس، اصفهان، خوزستان، هرمزگان، کرمان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی، گلستان و لرستان جمع‌آوری شد و سپس هوا خشک گردید. مقدار 100 گرم از هر یک از خاک‌ها با پنج گرم پر مرغ مخلوط گردید و پس از تنظیم رطوبت همه نمونه‌ها به یک‌میزان، درون انکوباتور در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند. به‌منظور جداسازی اولیه با استفاده از روش رقیق‌سازی سریالی، سریال رقت نمونه‌ها به محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد¹ (FMA) انتقال داده شد. پر به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در محیط کشت، رشد ریزجاندارانی که در تجزیه کراتین ناتوان هستند را محدود می‌کند (بوز و همکاران، 2014) محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد حاوی 10 گرم در لیتر پر آسیاب شده، 0/5 گرم در لیتر NaCl، 0/3 گرم در لیتر K_2HPO_4 ، 0/4 گرم در لیتر

بررسی توان تجزیه پر توسط جدایه‌ها

به‌منظور بررسی توان تجزیه پر توسط جدایه‌ها ابتدا محیط کشت حاوی 0/3 گرم در لیتر K_2HPO_4 ، 0/4 گرم در لیتر K_2HPO_4 ، 0/5 گرم در لیتر NaCl و 1% پر مرغ تهیه گردید و PH برابر 7/5 تنظیم شد و سپس اتوکلاو گردید. پس از 48 ساعت رشد جدایه‌ها در محیط نوترینت براس، 2% مایع تلقیح به محیط کشت حاوی پر اضافه شد و در شیکرانکوباتور در دمای 30 درجه سلسیوس و 150 دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از هفت روز محیط‌های کشت از کاغذ صافی عبور داده شد و پره‌های محیط جدا شدند. سپس درون آن در دمای 50 درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از خشک شدن، نمونه‌ها وزن شد و تفاوت بین وزن پر باقی مانده با نمونه شاهد به‌عنوان معیار تجزیه پر استفاده شد (سریواستاوا و همکاران، 2011). جدایه‌هایی که قادر به تجزیه کامل پر بودند به‌عنوان نمونه‌های برتر انتخاب شدند و محیط صاف‌شده آن‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتیناز جدایه‌ها

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتیناز، محیط صاف‌شده با سرعت 4000 دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به‌عنوان منبع آنزیم خام استفاده شد. سپس 0/2 میلی لیتر از منبع آنزیم خام با 20 میلی‌گرم پر آسیاب شده و 3/8 میلی‌لیتر بافر Tric-Hcl 100 میلی مولار (pH 7/8) مخلوط گردید و در انکوباتور قرار داده شد (دمای 37 درجه سلسیوس) پس از یک ساعت لوله‌ها درون آب سرد-یخ به مدت 10 دقیقه به‌منظور توقف واکنش قرار گرفتند و سپس محتویات لوله‌ها از فیلتر عبور داده شد و جذب آن‌ها در 280 نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد کراتیناز عبارت است از

¹ Feather meal agar

ژن CinnaGen (Co.Ltd.Iran) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R استفاده گردید. تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA طبق برنامه زمانی و دمایی مشخص انجام شد و محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE(1X) عبور داده شد. به منظور تعیین توالی محصول حاصل به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی سویه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و یک توالی هم‌پوشان برای هر سویه به دست آمد. سپس این توالی‌های هم‌پوشان در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند (ژیانگ و همکاران، 2006). در پایان و پس از شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، توالی ژن 16S rDNA همه آن‌ها در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ثبت و شماره دسترسی برای هر یک از آن‌ها به دست آمد.

بررسی تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر مرغ بر رشد کاهو

این پژوهش به صورت یک آزمایش گلدانی در گلخانه موسسه تحقیقات خاک و آب کرج به اجرا درآمد. نشاهای کاهو رقم سیاه مهر به گلدان‌های حاوی مخلوط کوکویت و پرلیت (نسبت چهار به یک) انتقال داده شد. تأثیر محلول حاصل از تجزیه کامل 2% پر در محیط کشت، توسط سه سویه *B. methylotrophicus* gh1، *B. siamensis* c11 و *velezensis* b1 مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی با سه محلول حاصل از تجزیه پر (gh1، c11، b1) و آب مقطر به عنوان شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. محیط کشت حاوی 2% پر تجزیه شده توسط سویه‌ها با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتیفریوژ گردید و محلول رویی در سه مرحله به فاصله 10 روز بر روی گیاهان اسپری شد. مرحله اول

مقدار آنزیمی که سبب افزایش جذب به میزان 1/0 در طول موج 280 نانومتر تحت شرایط آزمایش شود. ضمناً نمونه شاهد با روش مشابه تهیه گردید به استثناء اینکه به جای محیط صاف شده همان حجم بافر اضافه شد (انبو و همکاران، 2007).

اندازه‌گیری میزان نیتروژن آمونیاکی در محیط تکثیر جدایه‌ها

محیط کشت صاف شده نمونه‌های منتخب که قادر به تجزیه پر در کمترین زمان بودند به منظور اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی، با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتیفریوژ گردید سپس در دستگاه KJELTECAUTO (1030 Analyzer) قرار گرفتند و پس از قرائت دستگاه، درصد نیتروژن آمونیاکی آن‌ها محاسبه گردید (امامی، 1375).

بررسی میزان اسیدهای آمینه در محیط تکثیر جدایه‌ها

به منظور بررسی مقدار اسید آمینه تولید شده پس از تجزیه پر، محیط کشت صاف شده حاوی 1% پر با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتیفریوژ گردید و اسیدهای آمینه آزاد ماده رویی با روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت (گونزالس-کاسترو و همکاران، 1997؛ چکا-مورنو و همکاران، 2008).

بررسی مقدار بهینه پر در محیط کشت

جدایه‌هایی که بالاترین مقدار اسید آمینه آزاد در محیط کشت 1% پر آن‌ها مشاهده شد جهت تعیین مقدار بهینه پر به منظور تولید اسید آمینه بیشتر در واحد حجم، به محیط‌های کشت حاوی 2% و 3% پر انتقال داده شدند. پس از تجزیه کامل پر مقدار اسید آمینه آزاد محیط به روش HPLC اندازه‌گیری شد (گونزالس-کاسترو و همکاران، 1997؛ چکا-مورنو و همکاران، 2008).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از یک کشت 24 ساعته بر اساس پروتکل کیت سینا

اندام‌هوایی از ریشه جدا گردید و وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد. اندام‌هوایی و ریشه به مدت 48 ساعت داخل آون در دمای 70 درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از خشک شدن، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاهان اندازه‌گیری شد.

محلول‌پاشی پس از انتقال نشاها به گلدان‌ها و محلول‌پاشی‌های بعدی هر 10 روز یک‌بار (جمعاً سه بار) تکرار گردید. در تهیه محلول‌غذایی با اصلاحاتی در مقدار، از فرمول ارائه‌شده توسط ون زینرنبیکر (1986) استفاده شد (جدول 1). برداشت پس از 30 روز انجام شد

جدول 1- غلظت عناصر در محلول‌غذایی (گرم در 100 لیتر آب)

عناصر	فسفات مونو	سولفات	سولفات	آهن	نیتрат	نیترات	نیترات
میکرو	پتاسیم	منیزیم	پتاسیم		آمونیم	کلسیم	پتاسیم
0/5	11	19	15	0/6	2/5	42	17/5

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

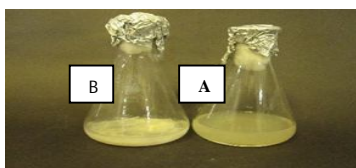
تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج

جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده پر

در مرحله اول، تعداد 31 جدایه باکتریایی با قابلیت رشد بر روی محیط کشت اختصاصی پودر پر

جامد (FMA) جداسازی و خالص شدند. در مرحله دوم جهت غربال جدایه‌های برتر بر اساس قابلیت تجزیه کامل پر در کوتاه‌ترین زمان از محیط کشت مایع حاوی پر استفاده شد. کاهش وزن پر شاخص انتخاب سویه برتر بود که پس از وزن کردن پرها منتج به شناسایی هشت جدایه به‌عنوان نمونه‌های منتخب که قادر به تجزیه کامل پر در هفت روز بودند شد (شکل 1).



شکل 1- تجزیه پر پس از هفت روز. A، پر بصورت کامل تجزیه شده است. B، نمونه شاهد

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر براساس توالی

16S rDNA

با توالی یابی فراورده PCR مربوط به تکثیر ژن 16S rDNA، هشت سویه جداسازی و شناسایی

شدند. توالی‌های 16S rDNA سویه‌های برتر در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی که در جدول 2 به آنها اشاره شده، ثبت شد.

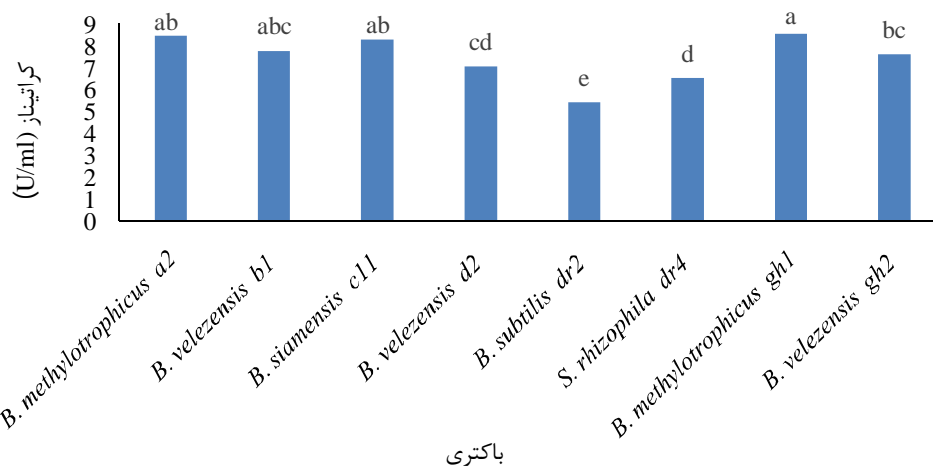
جدول 2- شناسایی مولکولی سویه‌های برتر بر اساس توالی 16S rDNA و شماره دسترسی آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI

شماره دسترسی	درصد تشابه	شناسایی سویه	نام سویه
MT229223	99	<i>Bacillus velezensis</i>	gh2
MT229225	99	<i>Bacillus velezensis</i>	d2
MT229224	99	<i>Bacillus velezensis</i>	b1
MT229226	99	<i>Bacillus siamensis</i>	c11
MT229229	99	<i>Bacillus subtilis</i>	dr2
MT229230	99	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	dr4
MT229227	99	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	gh1
MT229228	99	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	a2

فعالیت آنزیم کراتیناز

تفاوت *Bacillus velezensis* b1 و *siamensis* c11 معنی‌داری نداشتند. کمترین فعالیت این آنزیم نیز در سویه *Bacillus subtilis* dr2 به میزان 5/42 U/ml به دست آمد (شکل 2).

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنزیم کراتیناز پس از هفت روز در بین باکتری‌های مورد بررسی، متفاوت بود. حداکثر فعالیت آنزیم کراتیناز در سویه *Bacillus methylotrophicus* gh1 (8/56 U/ml) مشاهده شد که با سویه‌های *Bacillus methylotrophicus* a2 و *Bacillus*

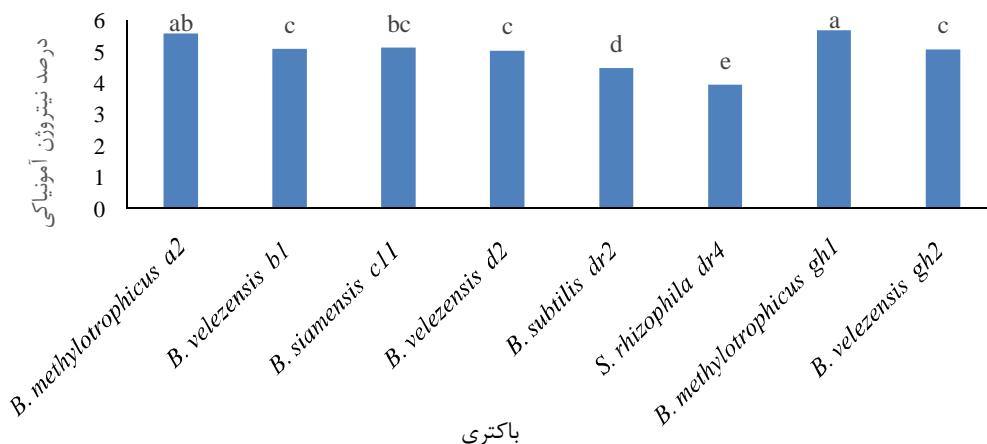


شکل 2- فعالیت آنزیم کراتیناز باکتری‌ها

میزان نیتروژن آمونیاکی

مقدار در محیط کشت سویه *Stenotrophomonas rhizophila* dr4 بود که با سایر سویه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (شکل 3).

نیتروژن آمونیاکی محیط حاوی پر تجزیه‌شده بین 3/96 تا 5/69 درصد بود. در محیط کشت دو سویه *B. methylotrophicus* a2 و *B. methylotrophicus* gh1 بیشترین درصد نیتروژن آمونیاکی مشاهده شد و کمترین

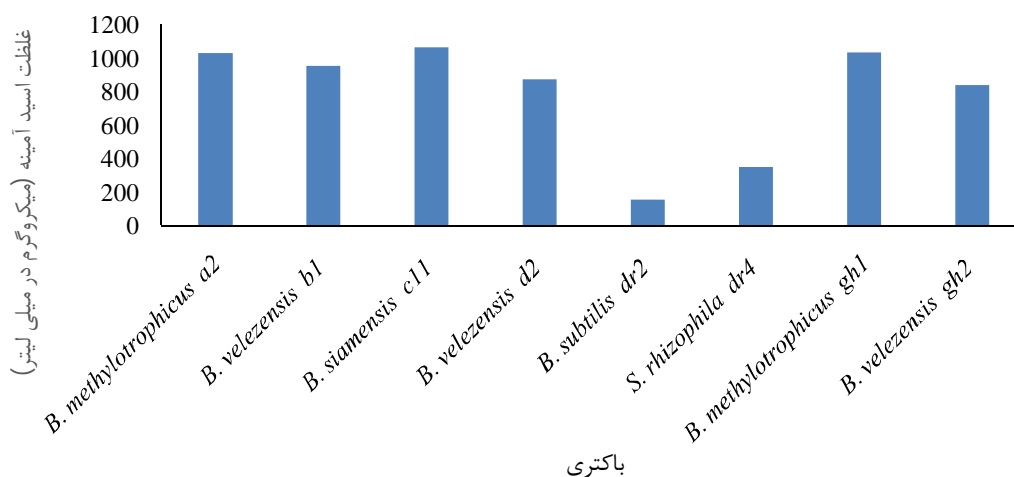


شکل 3- درصد نیتروژن آمونیاکی محیط حاوی پر تجزیه‌شده به‌وسیله باکتری‌ها

میزان اسیدهای آمینه آزاد

توسط سویه *B. siamensis* c11 ($1065 \mu\text{g/ml}$) مشاهده شده و سپس سه سویه *B. methylotrophicus* gh1 ($1032 \mu\text{g/ml}$)، *B. methylotrophicus* a2 ($954 \mu\text{g/ml}$) و *B. velezensis* b1 ($1027 \mu\text{g/ml}$) در رتبه بعدی قرار گرفتند. کمترین مقدار اسیدآمینه در محیط کشت سویه *B. subtilis* dr2 ($155 \mu\text{g/ml}$) مشاهده شد (شکل 4).

مقدار اسیدآمینه آزاد در محیط کشت حاوی 1% پرتجزیه‌شده توسط باکتری‌های منتخب به تفکیک مشخص گردید. محیط تجزیه پر حاوی لیزین، ترئونین، آرژنین، متیونین، فنیل آلانین، والین، لوسین، هیستیدین، ایزولوسین، پرولین، گلیسین، آلانین، سرین، سیستین، اسپاراژین، گلوتامین و تیروزین بود. در بین نمونه‌ها حداکثر غلظت اسیدآمینه آزاد در محیط پر تجزیه‌شده



شکل 4- اسیدهای آمینه آزاد در محیط کشت حاوی 1% پر

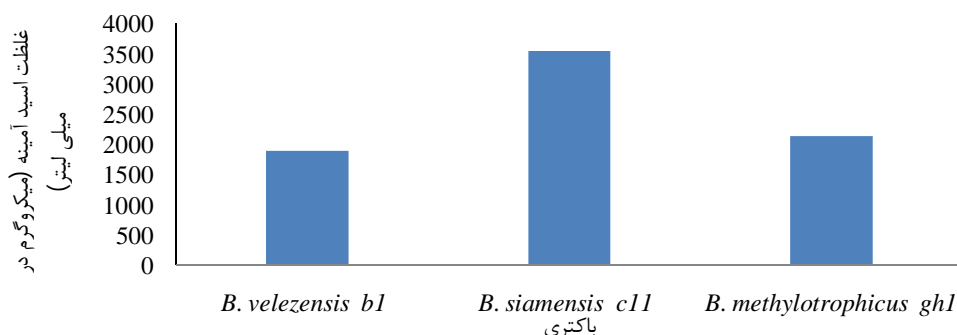
مقدار بهینه پر در محیط کشت

c11، *B. methylotrophicus* gh1 و *B. velezensis* b1 در محیط کشت حاوی 2% پر عملکرد خوبی داشتند و قادر به تجزیه کامل پره‌های بودند (شکل 5) درحالی‌که عملکرد

بررسی محیط‌های کشت حاوی 2% و 3% پر پس از هفت روز نشان داد هر سه سویه *B. siamensis*

اسیدآمینه در محیط کشت سویه‌های *B. methylotrophicus gh1* (2131 µg/ml) و *B. velezensis b1* (1883 µg/ml) حدوداً 2 برابر شد. نتایج نشان داد مقدار بهینه پر در محیط کشت جهت تولید اسید آمینه معادل 2% پر است.

مناسبتی در محیط 3% پر مشاهده نشد و سویه‌ها توانایی تجزیه پر را بطور کامل نداشتند. در محیط کشت حاوی 2% پر بالاترین مقدار اسیدآمینه در محیط کشت سویه *B. siamensis c11* (3544 µg/ml) مشاهده شد که نسبت به محیط کشت حاوی 1% پر 3/3 برابر شده بود و مقدار



شکل 5- اسیدهای آمینه آزاد در محیط کشت حاوی 2% پر

کاهو در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). وزن خشک کاهو در تیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد به ترتیب 25/7%، 19/9% و 15/2% افزایش نشان داد (جدول 4). بر اساس نتایج به دست آمده وزن تر ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار و وزن خشک ریشه تفاوت معنی‌داری نداشت.

تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر مرغ بر رشد کاهو نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر بر روی وزن تر کاهو در سطح یک درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین نشان داد وزن تر کاهو در تیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد به ترتیب 28/8%، 26/1% و 14/1% افزایش داشت (جدول 4). همچنین وزن خشک

جدول 3- جدول آنالیز واریانس صفات اندازه‌گیری شده

منبع تغییرات S.O.V	وزن تر کاهو	وزن خشک کاهو	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه
محلول‌پاشی	3255**	3/31**	0/917**	0/007 ^{ns}
خطا	20/1	0/149	0/015	0/003
ضریب تغییرات	1/77	4/05	0/51	2/06

** معنی‌دار در سطح 1 درصد، * معنی‌دار در سطح 5 درصد و ns: معنی‌دار نیست

جدول 4- جدول مقایسه میانگین تیمارهای اسیدآمینه حاصل از تجزیه پر بر صفات اندازه‌گیری شده

محصول حاصل از تجزیه پر	وزن تر کاهو	وزن خشک کاهو	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه
gh1	279 ^a	10/4 ^a	25/0 ^a	3/08 ^{ab}
b1	273 ^a	9/92 ^{ab}	24/9 ^a	3/09 ^a
C11	247 ^b	9/53 ^b	24/3 ^b	3/05 ^{ab}
blank	216 ^c	8/27 ^c	24/0 ^c	2/99 ^{ab}

میانگین‌ها با حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% براساس آزمون LSD هستند

بحث

سویه دیگر داشتند. همچنین مشاهده شد مقدار اسید آمینه در محیط کشت این چهار سویه بیشتر است. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که هرچه باکتری از توانایی بالاتری برای تولید آنزیم کراتیناز برخوردار باشد مقدار اسید آمینه بیشتری به دلیل افزایش تجزیه پر تولید خواهد کرد. استفاده از ریزجانداران موجب سهولت و کاهش هزینه‌های تولید آنزیم می‌گردد. این امر مورد توجه سرمایه‌گذاران بخش کشاورزی در سطح جهان قرار گرفته است (گوراو و جاداو، 2013).

هدف اصلی از بازیافت پر به کمک روش‌های بیوتکنولوژی، تبدیل ضایعات پر به پروتئین قابل هضم و اسیدهای آمینه است (حیاتیلکان و همکاران، 2012). لذا به منظور تولید اسید آمینه بیشتر در واحد حجم، سه سویه مختلف باکتری که بالاترین مقدار اسید آمینه کل در محیط کشت 1% پر آن‌ها مشاهده شده بود به محیط‌هایی که پر در آن‌ها دو و سه برابر شده بود انتقال داده شدند. نتایج نشان داد در شرایطی که پر 2 برابر شد از نظر مقدار اسیدهای آمینه کل در محیط کشت، شاهد افزایش حدوداً دو تا سه برابر میزان اسید آمینه کل در محیط سویه‌های *B. methylotrophicus* gh1، *B. velezensis* b1 و *B. siamensis* c11 نسبت به محیط کشت 1% پر بودیم. از این رو سویه‌هایی که قادر به تجزیه پروتئین پر هستند کاندید مناسبی برای تولید اسیدهای آمینه از زباله‌های پر می‌باشند (کشتی و همکاران، 2019). در محیطی که پرها 3 برابر شدند، سویه‌ها قادر به تجزیه کامل پر نبودند. از آنجایی که آنزیم کراتیناز یک آنزیم القایی است افزایش درصد مقدار پر می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم و تجزیه بهتر پر گردد ولی از یک غلظتی به بالا به دلیل اختلال در هوادهی و افزایش ویسکوزیته محیط اثر معکوس دارد که به نوبه خود رشد میکروبی و تجزیه پر را کاهش می‌دهد. در پژوهشی مشابه به منظور تعیین دوز بهینه پر، تأثیر سویه *Stenotrophomonas smaltophilia* DHHJ بر تجزیه پر در محیط کشت حاوی مقادیر 60

در این مطالعه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز به منظور تجزیه پر مرغ از خاک‌های مخلوط با پر جداسازی و شناسایی شدند. بر اساس نتایج توالی‌یابی حاصل از تکثیر ژن 16S rDNA، اکثر باکتری‌ها متعلق به جنس باسیلوس شامل *B. velezensis*، *B. siamensis*، *B. subtilis methylotrophicus* بودند. در تحقیقات انجام شده گونه‌های مختلف باسیلوس مانند *Bacillus licheniformis* RG1 (رامنانی و همکاران، 2005)، *Bacillus subtilis* PF1 (بهانگ و همکاران، 2016) *Bacillus pumilis* KHS-1 (کیم و همکاران، 2005) و *Bacillus amyloliquefaciens* 6B (بوز و همکاران، 2014) به عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده پر معرفی شده‌اند. بر اساس اطلاعات ما و بررسی‌هایی که انجام دادیم در حال حاضر به نظر می‌رسد تاکنون گزارشی مبنی بر فعالیت *Bacillus siamensis* و *Bacillus methylotrophicus* در تجزیه پر ارائه نشده است؛ بنابراین در این مطالعه به عنوان سویه‌های جدید با فعالیت کراتینولیتیک معرفی می‌شوند.

تجزیه پر توسط هشت سویه منتخب، در pH خنثی (7.5 pH) و 30 درجه سلسیوس مشاهده شد. از دیدگاه بیوتکنولوژی قابلیت تجزیه پر توسط این سویه‌ها در pH خنثی و دمای متوسط حائز اهمیت است، زیرا ممکن است هضم پر در مقادیر قلیایی بالاتر (>9 pH) باعث از بین رفتن برخی از اسیدهای آمینه ضروری گردد (براندلی، 2008). این سویه‌ها پر را در هفت روز به طور کامل تجزیه کردند، در حالی که سویه *Bacillus licheniformis* PWD-1 طی 10 روز پر مرغ را تجزیه نمود (ویلیامز و همکاران، 1990). مشابه این مطالعه، سویه *Bacillus megaterium* F7-1 قادر به تجزیه کامل پر مرغ پس از هفت روز از تلقیح بود (پارک و سون، 2009). در این مطالعه باکتری‌های *B. methylotrophicus* gh1، *B. siamensis* c11 و *B. methylotrophicus* a2، *B. velezensis* b1 فعالیت کراتینازی بالاتری نسبت به چهار

70، 80 و 90 گرم پر در 3 لیتر محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تجزیه 90 گرم پر توسط باکتری به‌خوبی انجام نشد (کائو و همکاران، 2012).

پره‌های تجزیه‌شده اسیدهای آمینه ضروری تولید می‌کنند که می‌توانند به‌عنوان پیش ماده ترکیبات تقویت‌کننده رشد گیاه عمل کنند (رای و موکرچی، 2015). به‌منظور بررسی تأثیر محصول حاصل از تجزیه پر بر عملکرد کاهو از سه محلول با بیشترین مقدار اسیدآمینه استفاده گردید. نتایج نشان داد وزن تر کاهو در تیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. این تأثیر مثبت در افزایش رشد به این دلیل است که اسیدهای آمینه به‌عنوان محرک‌های زیستی باعث رشد رویشی، جذب عناصر غذایی در گیاهان، تحمل تنش و در نهایت منجر به افزایش عملکرد محصول می‌شوند (ورنیری، 2006). وزن خشک کاهو در تیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. تحقیقات نشان داده است که تأثیر اسیدهای آمینه بر گیاهان بستگی به ارقام گیاهی و نوع اسیدهای آمینه دارد (لیو و همکاران، 2008؛ هواچینگ و همکاران، 2007؛ مبینی و همکاران، 2014). نتایج مشابهی توسط سایر محققان در مطالعات بر روی گیاهان گزارش شده است. تأثیر سویه باکتری *S. maltophilia* DHHJ بر تجزیه پر مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تجزیه پر محلول حاصل به‌عنوان کود برگ بر روی کلم چینی اسپری شد. پس از 30 روز این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد رشد قابل‌ملاحظه‌ای داشتند (کائو و همکاران، 2012). در پژوهشی از سویه *Chryseobacterium* sp. RBT به‌منظور تجزیه پر استفاده شد. سپس تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر به‌عنوان منبع مواد مغذی آلی برای گیاه موز مورد بررسی قرار گرفت که باعث افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی میوه موز شد (گوراو و جاداوا، 2013). مطالعات میدانی در خصوص استفاده از

هیدرولیزات پر با سویه *Chryseobacterium* sp. RBT به‌عنوان تقویت‌کننده برای دو گیاه brinjal و فلفل قرمز انجام شد. نتایج آزمایش‌ها، گلدهی زودرس، بهبود عملکرد محصول و تأثیر مثبت بر رشد و نمو گیاهان را نشان داد. علاوه بر این، کیفیت غذایی این دو گیاه از نظر پروتئین، اسیدهای آمینه، فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان افزایش یافت (گوراو و همکاران، 2020). در همین راستا، از هیدرولیز پر می‌توان به‌عنوان یک کود (رای و موکرچی، 2015؛ کشتی و همکاران، 2019)، باهدف بهبود عملکرد گیاه استفاده نمود (واسیلوا-تونکووا و همکاران، 2009).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر این است که محصولات تولیدشده از تجزیه پر با باکتری‌های *Bacillus methylotrophicus* gh1، *Bacillus siamensis* c11 و *Bacillus velezensis* b1 تأثیر مثبتی بر رشد کاهو داشتند. یافته‌ها نشان داد که این روش نقش دوگانه‌ای بازی خواهد کرد. شیوه‌ای مقرون به‌صرفه که می‌تواند زباله‌های مقاوم را کاهش داده و هم از مواد اولیه ارزان و تجدیدپذیر به‌عنوان تقویت‌کننده زیستی برای کاهش استفاده از مواد شیمیایی به‌منظور افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاهان استفاده کرد. این محصولات از منظر صنعتی بسیار امیدوارکننده است و راه را برای تحقیقات بیشتر و تولید تجاری در مقیاس بزرگ باز می‌کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در موسسه تحقیقات خاک و آب کرج انجام شده است. بدین‌وسیله از ریاست محترم موسسه آقای دکتر اسدی، رئیس آزمایشگاه بیولوژی آقای دکتر رجالی و همچنین آقای دکتر جهاننده، آقای دکتر دولت‌آباد و کارشناسان محترم آزمایشگاه بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع:

1. امامی، ع. 1375. روش‌های تجزیه گیاه. موسسه تحقیقات آب و خاک. نشریه شماره 982. 8-90.
2. Adelere, I.A. and Lateef, A. 2016. Keratinases: emerging trends in production and applications as novel multifunctional biocatalysts. *Kuwait Journal of Science* 43.
3. Amoozgar, A., Mohammadi, A. and Sabzalian, M.R. 2017. Impact of light-emitting diode irradiation on photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. *Photosynthetica* 55:85-95.
4. Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Lakshmipriya, T. and Annadurai, G. 2007. Optimization of extra cellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology* 98:1298-1303.
5. Ardyati, T. 2019, December. Screening of Keratinolytic Fungi for Biodegradation Agent of Keratin from Chicken Feather Waste. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 391, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.
6. Arkhipchenko, I.A., Salkinoja-Salonen, M.S., Karyakina, J.N. and Tsitko, I. 2005. Study of three fertilizers produced from farm waste. *Applied Soil Ecology* 30:126-132.
7. Bach, E., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F. and Brandelli, A. 2011. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation* 22:1191-1201.
8. Bhange, K., Chaturvedi, V. and Bhatt, R. 2016. Ameliorating effects of chicken feathers in plant growth promotion activity by a keratinolytic strain of *Bacillus subtilis* PF1. *Bioresources and Bioprocessing* 3:1-10.
9. Bhari, R., Kaur, M. and Singh, R.S. 2021. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. *Current Microbiology* 1-19.
10. Bose, A., Pathan, S., Pathak, K. and Keharia, H. 2014. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. *Waste and Biomass Valorization* 5:595-605.
11. Brandelli, A., Daroit, D.J. and Riffel, A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1735-1750.
12. Brandelli, A., 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food and Bioprocess Technology* 1:105-116.
13. Cao, Z.J., Lu, D., Luo, L.S., Deng, Y.X., Bian, Y.G., Zhang, X.Q. and Zhou, M.H. 2012. Composition analysis and application of degradation products of whole feathers through a large scale of fermentation. *Environmental Science and Pollution Research* 19:2690-2696.
14. Checa-Moreno, R., Manzano, E., Mirón, G. and Capitán-Vallvey, L.F. 2008. Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. *Journal of Separation Science* 31: 3817-3828.
15. Deydier, E., Guilet, R., Sarda, S. and Sharrock, P. 2005. Physical and chemical characterisation of crude meat and bone meal combustion residue: "waste or raw material?". *Journal of Hazardous Materials* 121:141-148.
16. FAO. 2012. Lettuce and chicory production quantity. Available online at <http://faosta3.fao.org/home/index.html#download>. Accessed 2 October 2016.
17. González-Castro, M.J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. and Oruña-Concha, M.J. 1997. Determination of amino acids in green beans by derivatization with phenylisothiocyanate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science* 35:181-185.

18. Gupta, R., Sharma, R. and Beg, Q.K. 2013. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 33:216-228.
19. Gupta, R. and Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:21-33.
20. Gurav, R., Nalavade, V., Aware, C., Vyavahare, G., Bhatia, S.K., Yang, Y.H., Bapat, V. and Jadhav, J. 2020. Microbial degradation of poultry feather biomass in a constructed bioreactor and application of hydrolysate as bioenhancer to vegetable crops. *Environmental Science and Pollution Research* 27:2027-2035.
21. Gurav, R.G. and Jadhav, J.P. 2013. A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environmental Science and Pollution Research* 20:4532-4539.
22. Herzog, B., Overy, D.P., Haltli, B. and Kerr, R.G. 2016. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. *Systematic and Applied Microbiology* 39:49-57.
23. Hua-Jing, W.A.N.G., Liang-Huan, W.U., Min-Yan, W.A.N.G., Yuan-Hong, Z.H.U., Qin-Nan, T.A.O. and Zhang, F.S. 2007. Effects of amino acids replacing nitrate on growth, nitrate accumulation, and macroelement concentrations in pak-choi (*Brassica chinensis* L). *Pedosphere* 17:595-600.
24. Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M. and Gumashta, R. 2016. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121:672-677.
25. Jayalakshmi, T., Krishnamoorthy, P., Kumar, G.R., Sivamani, P. and Lakshmi, C.A. 2012. Application of pure keratinase on keratinous fibers to identify the keratinolytic activity. *Journal Chem Pharm Research* 4:3229-3233.
26. Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. and Bawa, A.S. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49:278-293.
27. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R. and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3832-3845.
28. Kim, J.M., Choi, Y.M. and Suh, H.J. 2005. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:472-476.
29. Kshetri, P., Roy, S.S., Sharma, S.K., Singh, T.S., Ansari, M.A., Prakash, N. and Ngachan, S.V. 2019. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. *Waste and Biomass Valorization* 10:1-11.
30. Liu, X.Q., Chen, H.Y., Ni, Q.X. and Kyu, S.L. 2008. Evaluation of the role of mixed amino acids in nitrate uptake and assimilation in leafy radish by using ¹⁵N-labeled nitrate. *Agricultural Sciences in China* 7:1196-1202.
31. Mobini, M., Khoshgoftarmanesh, A.H. and Ghasemi, S. 2014. The effect of partial replacement of nitrate with arginine, histidine, and a mixture of amino acids extracted from blood powder on yield and nitrate accumulation in onion bulb. *Scientia Horticulturae* 176:232-237.
32. Park, G.T. and Son, H.J. 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research* 164:478-485.
33. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K. and Meyer, A.S. 2020. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*, 44, p.107607.

34. Rai, S.K. and Mukherjee, A.K. 2015. Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide (Fe₃O₄) magnetic nanoparticles coupled β -keratinase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:632-644.
35. Ramnani, P., Singh, R. and Gupta, R. 2005. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Canadian Journal of Microbiology* 51:191-196.
36. Reddy, N., Jiang, Q., Jin, E., Shi, Z., Hou, X. and Yang, Y. 2013. Bio-thermoplastics from grafted chicken feathers for potential biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110:51-58.
37. Reddy, N. and Yang, Y. 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in Biotechnology* 23:22-27.
38. Samuolienė, G., Urbonavičiūtė, A., Duchovskis, P., Bliznikas, Z., Vitta, P. and Žukauskas, A. 2009. Decrease in nitrate concentration in leafy vegetables under a solid-state illuminator. *Hort Science* 44:1857-1860.
39. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, 7:1-14.
40. Srivastava, A., Sharma, A. and Suneetha, V. 2011. Feather waste biodegradation as a source of amino acids. *European Journal of Experimental Biology* 1:56-63.
41. Sun, Z., Li, X., Liu, K., Chi, X. and Liu, L. 2021. Optimization for Production of a Plant Growth Promoting Agent from the Degradation of Chicken Feather Using Keratinase Producing Novel Isolate *Bacillus pumilus* JYL. *Waste and Biomass Valorization* 12:1943-1954.
42. Tiwary, E. and Gupta, R. 2012. Rapid conversion of chicken feather to feather meal using dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. *J Bioprocess Biotech* 2: 123.
43. Van Zinderen Bakker, E.M. 1986. Development of hydroponic systems and a look into the future. Section III. In *Proceedings 7th Annual Conference on Hydroponics*. Hydroponic Society of America, Concord, CA (pp. 73-74).
44. Vasileva-Tonkova, E., Gousterova, A. and Neshev, G. 2009. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63:1008-1012.
45. Verma, A., Singh, H., Anwar, M.S., Kumar, S., Ansari, M.W. and Agrawal, S. 2016. Production of thermostable organic solvent tolerant keratinolytic protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: IAA production and plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology* 7:1189.
46. Vernieri, P., Borghesi, E., Tognoni, F., Serra, G., Ferrante, A. and Piagessi, A. 2006, October. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. In *III International Symposium on Models for Plant Growth, Environmental Control and Farm Management in Protected Cultivation* 718:477-484.
47. Williams, C.M., Richter, C.S., MacKenzie Jr, J.M. and Shih, J.C. 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1509-1515.

Effect of metabolites obtained from microbial degradation of chicken feathers on lettuce growth

L. Ahmadi, K. Khavazi¹, J. Baharlouei, and M. H. Davoodi

PhD student, Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch;
E-mail: leili.ahmadi5@yahoo.com

Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension
Organization; E-mail: khavazik@yahoo.com

Assistant Professor, Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan)
Branch; E-mail: j.baharlouei@khuisf.ac.ir

Assistant Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension
Organization; E-mail: davoodi_mh@yahoo.com

Received: September, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

In this study, keratinase-producing bacteria were used to produce natural fertilizer from chicken feathers. Twenty-nine soil samples were collected from 0-30 cm depth of agricultural fields and mixed with chicken feathers. After three weeks, 31 isolates were isolated from the soils mixed with feathers, which were able to grow on the special culture medium of Feather Meal Agar (FMA). The isolates were transferred to a liquid medium containing feathers and their ability to degrade the feathers was investigated. A completely randomized design was used to examine the effect of the solution created by the degradation of chicken feathers on lettuce growth. The experimental treatments included the foliar application of three solutions obtained from the degradation of chicken feathers (gh1, b1, c11), and control (distilled water). The results showed eight isolates were able to completely decompose the feathers in seven days by producing keratinase enzyme. The highest activity of the keratinase enzyme (with the ability to fully degrade the feather: 8.56 U / ml) was related to that of *Bacillus methylotrophic strain gh1*. Also, the maximum concentration of free amino acid (1065 µg / ml) was observed in the growth medium of *Bacillus siamensis strain c11*. The three solutions obtained from feather degradation had a significant effect ($p < 0.01$) on lettuce fresh weight, lettuce dry weight, and fresh root weight. The results showed that the lettuce fresh weight increased by 28.8%, 26.1%, and 14.1%, using *Bacillus methylotrophicus* (gh1), *Bacillus velezensis* (b1), and *Bacillus siamensis* (c11) respectively, compared to the control. In addition, the lettuce dry weight increased by 25.7%, 19.9%, and 15.2%, with the aid of gh1, b1, and c11 treatments, respectively, compared to the control. The results showed that using keratinase-producing bacteria, feather degradation could be increased, and the obtained product can be used as a growth stimulant for lettuce.

Keywords: Free amino acid, Growth stimulant, Keratin, Soil

¹ Corresponding author: Responsible author: Karaj, Standard Square, Meshkindasht Road, Imam Khomeini Boulevard, Soil and Water Research Institute.

Evaluation of different insoluble phosphorus sources to isolate phosphorus-releasing bacteria in fish ponds

V. Arjmand, N. Mahmoudi¹, and A. R. Fallah Nosratabad

Graduate of the Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran; E-mail: vahed.arjmand@gmail.com

Assistance professor of Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran; E-mail: n.mahmoudi@modares.ac.ir

Associate Professor of Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: rezafayah@yahoo.com

Received: October, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

One of the main reasons for the low yield of biofertilizers in fish ponds is the use of insoluble mineral phosphorus sources (often tri-calcium phosphate) during the process of isolation and evaluation of phosphorus-releasing microorganisms. A large part of insoluble phosphorus (50 to 90%) in warm water fish ponds is insoluble organic phosphorus. Therefore, it seems phosphorus-releasing microorganisms isolated solely from mineral phosphorus sources can not be effective as biofertilizers in warm water fish ponds. The aim of this study was to isolate phosphorus-releasing bacteria from warm water fish ponds using NBRIP medium containing organic phosphorus source (calcium phytate) and compare their performance with bacteria derived from insoluble mineral phosphorus source (tri-calcium phosphate) in microcosm conditions (Erlenmeyer contains sediment: conditions similar to a fish pond). The phosphorus release ability of isolates (33 organic isolates and 19 inorganic isolates) was evaluated in NBRIP solid and liquid medium. The range of soluble phosphorus in the liquid medium containing calcium phytate varied between 57.40 - 141.93 and 108.16 - 219.49 mg/l in the medium containing tricalcium phosphate. In the final step, evaluation of isolates in sediment microcosm showed that three isolates from organic phosphorus source (3P, 13P, and 2P) were the best phosphorus release isolates (with 11.86, 12.53, and 28.18 mg / l respectively) and had better performance compared to isolates from mineral phosphorus source. Molecular identification showed these isolates belonged to *priestia aryabhatai*, *Bacillus zanthoxyli*, and *Acinetobacter johnsonii*. Due to the pathogenic potential of *A. johnsonii* for fish and humans, the Bacillaceae family strains can be considered candidates for use in biofertilizers for further evaluation.

Keywords: Biofertilizer, Organic phosphorus solubilization, Sediment microcosm, Phytate, Warm water fish

¹ Corresponding author: Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

The consequence of Amoxicillin, Cefixime, and metronidazole application on abundance and metabolism of bacteria in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils

Z. Najafzadeh Nobar¹, and A. A. Safari sinegani

Ph.D. student. College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;

E-mail: z_najafzadeh2002@yahoo.com

Professor. Soil Science College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;

E-mail: aa-safari@basu.ac.ir

Received: March, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

This study aimed to investigate the effect of Amoxicillin, Cefixime, and Metronidazole on some biological properties such as basal respiration, substrate-induced respiration, and bacterial abundance in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils. The experiment has performed with a completely randomized factorial design with three replications. Factors include three soil types (heavy metal contaminated mine soil, rangeland soil near mine, and agricultural soil), seven antibiotic treatments (control, Amoxicillin, Cefixime, and Metronidazole, each one 100 and 200 mg per kg of dry soil) and three incubation times: short-time (zero-7 days), medium-time (15 and 30 days) and long-time (60 and 90 days)). The results showed that in the medium time, the application of 200 mg.kg⁻¹ of antibiotics amoxicillin in agricultural soil and metronidazole in mine soil, resulted in the highest (8.4958) and lowest (4.4594) logarithm of the abundance of all soil bacteria. Rangeland soil had the highest basal respiration amount (0.1066 mg CO₂. g⁻¹dry soil. day⁻¹) in short-time incubation, and agricultural soil had the lowest basal respiration amount in both long-time (0.0144) and medium-time (0.0172). The use of 100 mg of metronidazole per kg of rangeland soil in the short time resulted in the highest amount of substrate-induced respiration (0.0251 mg CO₂. g⁻¹ dry soil. h⁻¹) and the use of 100 mg of amoxicillin per kg of agricultural soil in the medium incubation time resulted in the lowest substrate-induced respiration (0.0027). It seems that agricultural soil showed the highest abundance of bacteria and mine soil showed the highest amount of substrate-induced respiration. Rangeland soil had the highest amount of basal respiration and there was no significant difference with agricultural soil in the abundance of bacteria and mine soil in the amount of substrate induced respiration. Mine soil showed the lowest abundance of bacteria and agricultural soil showed the lowest amount of basal and substrate induced respiration. The application of metronidazole resulted in the highest amount of basal and substrate induced respiration, and the lowest abundance of bacteria. The application of amoxicillin and Cefixime showed the highest abundance of bacteria and the lowest amount of substrate induced respiration, respectively. Incubation in a short time had the highest amount of basal and substrate induced respiration. The highest abundance of bacteria and the lowest amount of substrate induced respiration were observed in the medium time. The long-time incubation showed the lowest abundance of bacteria and the lowest basal respiration amount.

Keywords: Antibiotic, Bacterial Abundance, Basal and Substrate Induced Respiration

¹ Corresponding author: Soil Science College of Agriculture Bu-Ali University, Hamadan Iran

Effect of biofilm-forming plant growth promoting bacterium and tryptophan on yield and Cadmium uptake in Rye (*Secale cereale*)

E. Karimi¹, Sh. Mohammadi, and E. Esfandyari

Assistant Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh;

E-mail: sm_ka80@yahoo.com

MSc Student, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh;

E-mail: mohammadi.ms@yahoo.com

Professor, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh;

E-mail: esfand1977@yahoo.com

Received: May, 2021 & Accepted: February, 2022

Abstract

Due to the inevitable entry of cadmium into the soils and its high toxicity, it is essential to prevent it from human food chains. Biofilm-forming plant growth-promoting bacteria with the ability of auxin production can prevent the transport of some heavy metals to plants. A hydroponic factorial experiment was designed based on a randomized complete block in three replications to investigate the effect of biofilm-forming plant growth-promoting bacterium and tryptophan on yield and cadmium uptake in Rye. Experimental factors include three levels of cadmium (zero, 50 and, 100 mg.L⁻¹), two bacterial inoculation (with or without *Bacillus atropheus*) and, tryptophan (presence in 100 mgL⁻¹ and absence). The results showed that the addition of tryptophan and bacterial inoculation could increase the yield of rye dry matter by 19% on average vs control. In addition, the co-applying of tryptophan with bacterial inoculation was able to reduce 100% and 62% of the cadmium concentration in rye aerial parts at 50 and 100 mg.L⁻¹, respectively. The use of tryptophan by the improvement of the antioxidant system was able to reduce the amount of malondialdehyde and hydrogen peroxide at 50 mg.L⁻¹ cadmium level up to 30 and 42%, and for 100 mg.L⁻¹ cadmium by 34 and 32%, respectively. Therefore, it seems that with further studies, these treatments can be used to increase the yield and reduce the Cd entry into the food chain in the Cd-contaminated soils.

Keywords: Bioconcentration factor, Catalase, Guaiacol peroxidase, Transfer factor.

¹ Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, University of Maragheh.

Isolation and evaluation of plant growth-promoting characteristics of phosphate solubilizing fungi from Iranian soils

L. Faridian, J. Baharlouei¹, A. R. Falah Nosrat Abad,
and H. Kari DolatAbad

PhD student of Soil Science Department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch;
E-mail: laleh.faridian@gmail.com

Assistant professor, Soil Science Department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch;
E-mail: jbahar5411@yahoo.com.

Associate professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and
Extension Organization (AREEO); E-mail: rezafayah@yahoo.com

Assistant professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and
Extension Organization (AREEO); E-mail: hossein.kari@gmail.com

Received: August, 2022 & Accepted: December, 2022

Abstract

The application of phosphate solubilizing fungi (PSF) is a biological and eco-friendly method to increase phosphorus availability from insoluble sources. The aim of this study was to obtain PSFs that can be used as biological agent in order to increase soil phosphorus and improve plant growth. Initially, 144 PSFs isolates were isolated from the soil of corn fields (0-30 cm) in Fars, Kermanshah, and Khorasan Razavi provinces, Iran. Among them, 27 isolates showed the maximum solubilizing ability of tricalcium phosphate (TCP). Based on molecular analysis, different genera were identified as *Aspergillus* (7.5%), *Talaromyces* (44.4%), *Penicillium* (44.4%) and *Cladophialophora* (3.7%). This is the first report of *Cladophialophora* as mineral phosphorus solubilizing agent. The maximum phosphate solubilizing ability in solid media was represented by *Talaromyces pinophilus* strain MFA (halo to colony diameter is 4.11 mm), whereas this ability was manifested by *Talaromyces verruculosus* strain PF 157-2 (23.8 mg/l), *Talaromyces pinophilus* strain MFA (20.7 mg/l), *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 (20.50 mg/l) and *Talaromyces pinophilus* strain FB (20.04 mg/l) in liquid media respectively. *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 and *Talaromyces pinophilus* strain 1FB showed the maximum auxin (9.2 mg/l) and siderophore (ratio of halo zone diameter to colony diameter: 4.44 mm) production ability respectively. The maximum amount of hydrogen cyanide (grade 4) was produced by *Penicillium oxalicum* strain PF 83-1. These results confirmed that PSF especially *Talaromyces pinophilus* strain MFA, *Talaromyces verruculosus* strain PF 157-2, *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 and *Talaromyces pinophilus* strain 1FB can be introduced as biological agents which could increase soil phosphorus availability and improve plant growth.

Keywords: Plant growth promotion, Phosphorus availability, Biological agents, and Phosphate Solubilizing Fungi

¹ Corresponding author: Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch.

Plant growth-promoting bacteria and their application in agriculture

H. Besharati¹

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran; E-mail: Besharati1350@yahoo.com

Received: October, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

The rhizosphere is a thin layer (1-2 mm) of soil around the plant roots that are affected by the root exudates. The number and bacterial diversity in the rhizosphere are affected by the plant roots. Rhizosphere bacteria (rhizobacteria) show promoting (PGPB), deleterious, or neutral effects on plants. PGPRs increase plant growth by direct or indirect mechanisms. Direct mechanisms include plant hormones production (such as auxin, and gibberellin ...), phosphorus solubility, nitrogen fixation, siderophore production, sulfur oxidation, and ACC-deaminase production and indirect mechanisms include antibiotics production, pathogen cell wall destroying enzymes (such as chitinase), increasing the Induced systemic resistance (ISR), HCN production, creating competition with pathogens, volatile compounds production. In this paper, the direct and indirect mechanisms and the application of PGPB on plants and other important affecting factors are discussed. Finally, the considerations that should be noticed in the use of PGPB and their marketing issues are proposed.

Keywords: Siderophore. Phytohormones, PGPB, ACC-Deaminase

¹. Corresponding author: Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Effects of nan/microplastics as newly known pollutants on the environment and their microbial degradation

H. A. Nadian Ghomsheh¹

Professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan;

E-mail: nadian_habib@yahoo.com

Received: July, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

The increasing accumulation of plastic waste is one of the main environmental challenges currently facing human societies. Environmental toxicity of nano/microplastics as newly known pollutants is a constant threat to terrestrial, marine, and atmospheric ecosystems. Nanoplastics are well able to pass through cell membranes and enter the cell, disrupting all vital functions of living organisms, including humans, plants, and microorganisms. Nano/microplastics are considered a serious global pollutant due to their resistance to decomposition. Therefore, increasing efforts have been made to eliminate or reduce nano/microplastics through eco-friendly technologies. Bio-enzymes have been evaluated as efficient agents for plastic degradation. A variety of plastic-degrading enzymes have been discovered among microbial communities. However, naturally occurring plastic degrading enzymes are not suitable for synthetic plastic degradation due to poor thermostability and low catalytic activity. Therefore, exploration in various environments to discover new plastic-degrading enzymes with desirable properties and functions has been increasingly considered. In the biological approach, the decomposition of nano/microplastics, increasing the efficiency of depolymerization, and optimizing the activity and thermal stability of the enzymes involved, have been investigated in various ways. Recent research efforts have made significant progress in discovering and engineering plastic decomposing enzymes, showing great promise for the suitable treatment for plastics biodegradation.

Keywords: Bioremediation, Enzyme engineering, Marine and terrestrial ecosystems, Nano/micro plastic polymers, Oxidative stresses

¹Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Mollasani.

Contents

Subject	Page
Effects of nan/microplastics as newly known pollutants on the environment and their microbial degradation8 H. A. Nadian Ghomsheh	8
Plant growth-promoting bacteria and their application in agriculture.....9 H. Besharati	9
Isolation and evaluation of plant growth-promoting characteristics of phosphate solubilizing fungi from Iranian soils10 L. Faridian, J. Baharlouei , A. R. Falah Nosrat Abad, and H. Kari DolatAbad	10
Effect of biofilm-forming plant growth promoting bacterium and tryptophan on yield and Cadmium uptake in Rye (<i>Secale cereale</i>)11 E. Karimi, Sh. Mohammadi, and E. Esfandyari	11
The consequence of Amoxicillin, Cefixime, and metronidazole application on abundance and metabolism of bacteria in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils12 Z. Najafzadeh Nobar, and A. A. Safari sinigani	12
Evaluation of different insoluble phosphorus sources to isolate phosphorus-releasing bacteria in fish ponds13 V. Arjmand, N. Mahmoudi, and A. R. Fallah Nosratabad	13
Effect of metabolites obtained from microbial degradation of chicken feathers on lettuce growth14 L. Ahmadi, K. Khavazi, J. Baharlouei, and M. H. Davoodi	14

Soil Science Society of Iran Soil and Water Research Institute

Journal of Soil Biology

Vol. 10, No 2

2023

Manager-in-Charge M. Gorji, PhD

Professor, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University

Professor, University of Tehran

Editor-in-Chief: Hadi Asadi Rahmani, PhD

Professor (Research), Soil and Water Research Institute

Editorial Board

Hadi Asadi Rahmani, PhD

Professor (Research), Soil and Water Research Institute

Hossein Ali Alikhani, PhD

Professor, University of Tehran

Naser Aliasgharzad, PhD

Professor, University of Tabriz

Hossein Besharati, PhD

Professor, Soil and Water Research Institute

Alireza Fallah Nosratabad, PhD

Associate Professor, Soil and Water Research Institute

Ahmad Golchin, PhD

Professor, University of Zanjan

Amir Lakzian, PhD

Professor, Ferdowsi University of Mashhad

Habibollah Nadian Ghomshe, PhD

Professor, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan

Farshid Norbakhsh, PhD

Professor, Isfahan University of Technology

Abdol Hossein. Ziaeiian, PhD

Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars

Executive Manager:

Alireza Fallah Nosratabad

English Editor:

Amir Lakzian

Type and design:

Kobra Alinezhad

Address: P. O. Box: 31785-311, Karaj – IRAN

Tel / Fax: 026-36208796

SSSI Website: www.soiliran.org

Soil and Water Research Institute Website: www.swri.ir

Journal Website: www.sbj.areeo.ir

E-mail: jsb.soilbiology@yahoo.com



Journal of Soil Biology



ISSN: 2345-2536

Vol. 10, No. 2, 2023

Contents

Subject	Page
Effects of nan/microplastics as newly known pollutants on the environment and their microbial degradation <i>H. A. Nadian Ghomsheh</i>	8
Plant growth-promoting bacteria and their application in agriculture..... <i>H. Besharati</i>	9
Isolation and evaluation of plant growth-promoting characteristics of phosphate solubilizing fungi from Iranian soils <i>L. Faridian, J. Baharlouei, A. R. Falah Nosrat Abad, and H. Kari DolatAbad</i>	10
Effect of biofilm-forming plant growth promoting bacterium and tryptophan on yield and Cadmium uptake in Rye (<i>Secale cereale</i>) <i>E. Karimi, Sh. Mohammadi, and E. Esfandyari</i>	11
The consequence of Amoxicillin, Cefixime, and metronidazole application on abundance and metabolism of bacteria in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils <i>Z. Najafzadeh Nobar, and A. A. Safari sinemani</i>	12
Evaluation of different insoluble phosphorus sources to isolate phosphorus-releasing bacteria in fish ponds <i>V. Arjmand, N. Mahmoudi, and A. R. Fallah Nosratabad</i>	13
Effect of metabolites obtained from microbial degradation of chicken feathers on lettuce growth <i>L. Ahmadi, K. Khavazi, J. Baharlouei, and M. H. Davoodi</i>	14