دو فصلنامه

نشریه علمی

زیست شناسی خاک

شاپا: ۲۵۳۶-۲۳۴۵

جلد ۱۳ شماره ۱ سال ۱۴۰۴

عنوان | فهرست | صفحه

تأثیر پیش‌تیمار زیستی با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گندم رقم کویر در شرایط تنش شوری..... ۱
احمد اصغرزاده، کبری ثقفی و بهمن خوشرو

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ و اثر آنها همراه با کاربرد خاک فسفات بر رشد جو..... ۱۹
اسماعیل کریمی، سیما اصل یزدانی، عزت‌اله اسفندیاری و سید بهمن موسوی

مقایسه توانایی تحریک‌کنندگی رشد گیاه جوامع میکروبی اپی‌فایتون و اپی‌پلون در برخی از شالیزارهای استان گیلان..... ۴۱
مهدیه لیلاسی مرند، حسینعلی علیخانی، احمد علی پوربابائی و شایان شریعتی

پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ بر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود سپید مایه‌زنی شده با Mesorhizobium ciceri و قارچ‌های میکوریز..... ۶۷
علی اکبر صفری سنجانی و لیلا کرمی

قارچ‌های آگاریک خوراکی، سمی، دارویی و دارای ارزش اقتصادی همزیست با راش شرقی..... ۹۱
حامد آقاجانی، سید محمد حجتی، محمدعلی تاجیک قنبری، محمدرضا پورمجیدیان و علی برهانی

تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) توسط سویه‌های باکتریایی..... ۱۰۷
رضا محمدی‌کیا، علیرضا فلاح نصرت‌آباد و بهمن خوشرو

www.sbj.areeo.ir

انجمن علوم خاک ایران **مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

نشریه علمی
زیست شناسی خاک

جلد ۱۳ شماره (۱)
۱۴۰۴
صاحب امتیاز: مؤسسه تحقیقات خاک و آب
تأییدیه درجه علمی
به استناد نامه شماره ۳/۱۸/۷۷۶۱۰ مورخ ۱۳۹۴/۴/۲۳ اعتبار علمی نشریه زیست شناسی خاک تمدید شده است.

مدیر مسؤول: **دکتر کامبیز بازرگان** **دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب**
سردبیر: **دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد** **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

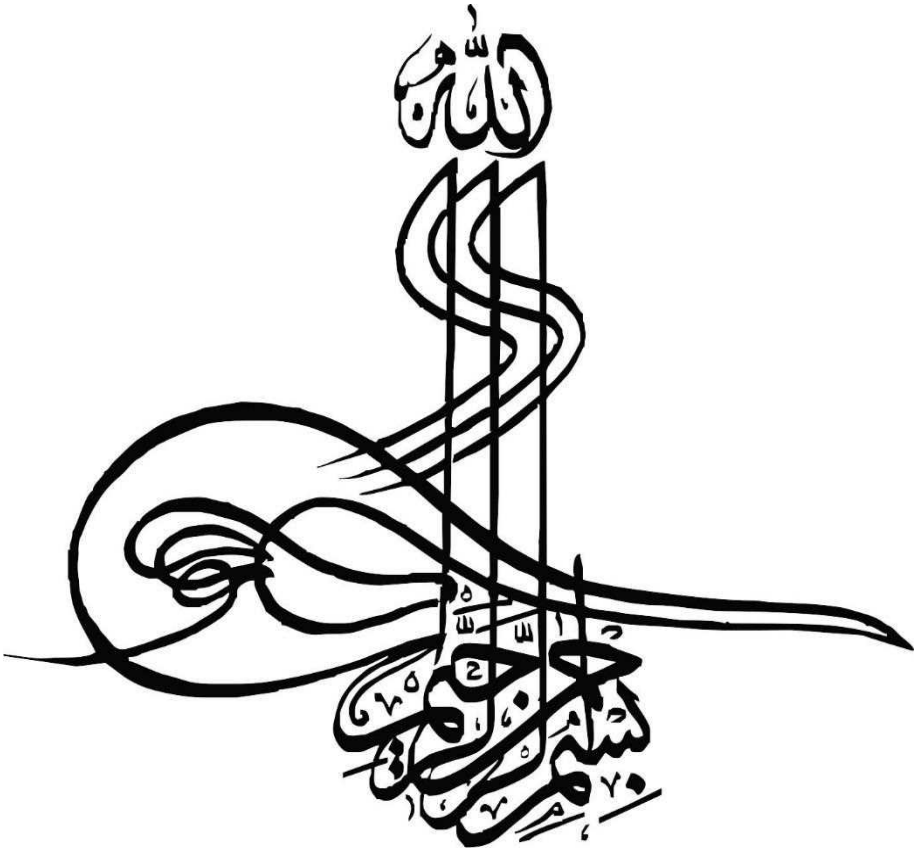
دکتر هادی اسدی‌رحمانی **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر حسین بشارتی **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر عبدالحسین ضیائیان **دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس**
دکتر حسینعلی علیخانی **استاد دانشگاه تهران**
دکتر ناصرعلی اصغرزاد **استاد دانشگاه تبریز**
دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد **استاد مؤسسه تحقیقات خاک وآب**
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**

ویراستار انگلیسی: **دکتر امیر لکزیان**
ویراستار فنی: **مهندس کیانا خامه چی**
تعداد انتشار در سال: **دو شماره**

پایگاه الکترونیکی نشریه علمی زیست‌شناسی خاک: **www.sbj.areeo.ir**
پایگاه الکترونیکی انجمن علوم خاک ایران: **www.soiliran.org**
پایگاه الکترونیکی موسسه 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 سیویلیکا: **www.civilica**

آدرس: کرج - میدان استاندارد، جاده مشکین دشت، بعداز رزکان نو، بلوار امام خمینی – موسسه تحقیقات خاک و آب، کد پستی: ۳۱۷۷۹۹۳۵۴۵
تلفن و نمابر: ۳۶۲۰۸۷۹۶ (۰۲۶) ***آدرس پایگاه الکترونیکی مجله: www.journals.areo.ir***


بسم الله الرحمن الرحيم

عنوان | فهرست | صفحه

تأثیر پیش‌تیمار زیستی با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گندم رقم کویر در شرایط تنش شوری..... ۱
احمد اصغرزاده، کبری ثقفی و بهمن خوشرو

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ و اثر آنها همراه با کاربرد خاک فسفات بر رشد جو..... ۱۹
اسماعیل کریمی، سیما اصل یزدانی، عزت‌اله اسفندیاری و سید بهمن موسوی

مقایسه توانایی تحریک‌کنندگی رشد گیاه جوامع میکروبی اپی‌فایتون و اپی‌پلون در برخی از شالیزارهای استان گیلان..... ۴۱
مهدیه لیلاسی مرند، حسینعلی علیخانی، احمد علی پوربابائی و شایان شریعتی

پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ بر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود سپید مایه‌زنی شده با Mesorhizobium ciceri و قارچ‌های میکوریز..... ۶۷
علی اکبر صفری سنجانی و لیلا کرمی

قارچ‌های آگاریک خوراکی، سمی، دارویی و دارای ارزش اقتصادی همزیست با راش شرقی..... ۹۱
حامد آقاجانی، سید محمد حجتی، محمدعلی تاجیک قنبری، محمدرضا پورمجیدیان وعلی برهانی

تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) توسط سویه‌های باکتریایی..... ۱۰۷
رضا محمدی‌کیا، علیرضا فلاح نصرت‌آباد و بهمن خوشرو

راهنمای جامع نویسندگان نشریه زیست شناسی خاک

نسخه ۳ – بازبینی تیر ماه ۱۴۰۴ (Version 3.0 - Revised July 2025)

نشریه زیست شناسی خاک، ضمن قدردانی از انتخاب این نشریه برای انتشار دستاوردهای علمی شما، این راهنمای جامع را به منظور همسوسازی با بالاترین استانداردهای نشر بین‌المللی ارائه می‌نماید. هدف ما، انتشار پژوهش‌های اصیل، نوآورانه و تأثیرگذار است که به پیشبرد دانش جهانی در حوزه علوم خاک کمک کند. از شما نویسنده محترم تقاضا داریم پیش از ارسال مقاله، این شیوه‌نامه را به دقت مطالعه فرموده و مقاله خود را بر اساس آن تنظیم نمایید.

فهرست مطالب

مقدمه

۱- انواع مقالات قابل پذیرش (Acceptable Article Types)

۱-۱- مقاله پژوهشی (Original Research Article)

۱-۲- مقاله مروری (Review Article)

۱-۳- مقاله کوتاه (Short Communication)

۱-۴- گزارش علمی (Scientific Report)

۱-۵- یادداشت فنی (Technical Note)

۲- راهنمای کامل تهیه مقاله پژوهشی (Detailed Guidelines for Original Research Articles)

۲-۱- شیوه‌نامه کلی نگارش و صفحه‌آرایی (General Formatting and Layout)

۲-۲- نوع و اندازه فونت‌ها (Font Type and Size)

۲-۳- ساختار کامل مقاله پژوهشی (Full Structure of a Research Article)

۳- ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش (Ethical Considerations and Research Transparency)

۳-۱- اصالت اثر و سرقت علمی (Originality and Plagiarism)

۳-۲- تعارض منافع (Conflict of Interest)

۳-۳- معیارهای نویسندگی (Authorship Criteria)

۳-۴- بیانیه مشارکت نویسندگان (Author Contributions Statement)

۳-۵- بیانیه دسترسی به داده‌ها (Data Availability Statement)

۴- شیوه‌نامه ارجاع‌دهی و تنظیم منابع (Citation and Reference Style Guide)

۴-۱- سیاست‌های کلی (General Policies)

۴-۲- ارجاع‌دهی در متن (In-Text Citation)

۴-۳- فرمت فهرست منابع نهایی (Formatting the Final Reference List)

۴-۳-۱- مقاله مجله علمی (Journal Article)

۴-۳-۲- کتاب (Book)

۴-۳-۳- فصل از کتاب (Book Chapter)

۴-۳-۴- منبع فارسی ترجمه شده (Translated Persian Source)

۴-۳-۵- مقالات کنفرانس (Conference Proceedings)

۴-۳-۶- پایان‌نامه و رساله (Thesis and Dissertation)

۴-۳-۷- منبع آنلاین (Online Source)

۵-پیوست

۱- انواع مقالات قابل پذیرش (Acceptable Article Types)

نشریه زیست شناسی خاک پذیرای انواع مقالات علمی زیر است. این بخش به منظور راهنمایی نویسندگان برای انتخاب بهترین قالب جهت ارائه پژوهش خود تدوین شده است. لطفاً پیش از تهیه مقاله، بخش مربوط به نوع مقاله مورد نظر خود را به دقت مطالعه فرمایید.

۱-۱- مقاله پژوهشی (Original Research Article)

این نوع مقاله، اساس انتشارات علمی نشریه را تشکیل می‌دهد. مقاله پژوهشی باید گزارشی جامع و دقیق از یک **تحقیق اصیل و منتشر نشده** باشد که بر اساس **جمع‌آوری و تحلیل داده‌های دست اول** شکل گرفته است. هدف اصلی آن، ارائه یافته‌های جدید و یک **مشارکت علمی معنادار** در یکی از حوزه‌های تخصصی زیست‌شناسی خاک است. مقاله باید دارای فرضیه یا سؤالات تحقیقی مشخص و روش‌شناسی کاملاً شفاف و قابل تکرار باشد.

- **(جزئیات کامل ساختار، فرمت و الزامات این نوع مقاله در بخش ۲ به تفصیل ارائه شده است).**

۱-۲- مقاله مروری (Review Article)

این نوع مقاله باید یک **تحلیل انتقادی، عمیق و جامع** از وضعیت فعلی دانش در یک زمینه تخصصی و به‌روز در حوزه زیست شناسی خاک باشد. مقاله مروری صرفاً خلاصه‌ای از پژوهش‌های پیشین نیست، بلکه باید با **ترکیب، تلفیق و ارزیابی منتقدانه** منابع، به شناسایی الگوها، تناقضات، شکاف‌های پژوهشی و ارائه دیدگاه‌های نوین بپردازد. نویسندگان و ساختار این نوع مقاله به شرح زیر است:

- **نویسندگان:** این مقالات معمولاً توسط محققان برجسته و صاحب‌نظر که دارای سوابق پژوهشی قابل توجهی در آن حوزه هستند، تهیه می‌شوند. با این حال، نشریه از مقالات مروری با کیفیت بالا که توسط سایر محققان تهیه شده باشد نیز استقبال می‌کند.
- **ساختار:**
  - **عنوان، مشخصات نویسندگان، چکیده‌ها و واژه‌های کلیدی:** مطابق با فرمت مقاله پژوهشی.
  - **توجه:** در چکیده مبسوط مقالات مروری، به جای بخش Materials and Methods، بخش Review Methods (روش جستجو) قرار می‌گیرد (در این بخش به طور بسیار خلاصه به روش شناسی مقاله اشاره می شود. این بخش با "مواد و روش‌ها" در مقالات پژوهشی متفاوت است. در اینجا به مواردی مانند پایگاه‌های اطلاعاتی که در آن‌ها جستجو انجام شده (مثلاً PubMed, Scopus, Web of Science)، کلمات کلیدی مورد استفاده و معیارهای انتخاب یا رد مقالات اشاره می‌شود).
  - **مقدمه:** تعریف دقیق دامنه و محدوده موضوع، بیان اهمیت آن و طرح سؤالات کلیدی که مقاله به آن‌ها پاسخ خواهد داد.
  - **بدنه اصلی:** تقسیم‌بندی موضوع به بخش‌های منطقی (Thematic Sections) و تحلیل عمیق هر بخش.
  - **بحث و چشم‌انداز آینده (Discussion and Future Outlook):** این بخش حیاتی باید شامل تحلیل وضعیت فعلی، شناسایی چالش‌ها و ارائه پیشنهادهای مشخص برای مسیرهای تحقیقاتی آینده باشد.

- **نتیجه‌گیری:** ارائه یک پیام نهایی قدرتمند که حاصل تحلیل جامع انجام شده است.
- **حداکثر حجم:** ۴۵ صفحه.

۱-۳- مقاله کوتاه (Short Communication)

این نوع مقاله برای **انتشار سریع** یافته‌های علمی بسیار مهم، نوآورانه و با پیامدهای قابل توجه در نظر گرفته شده است. این یافته می‌تواند یک کشف پیشگامانه، معرفی یک روش جدید با نتایج اولیه اما بسیار تأثیرگذار، یا مشاهده پدیده‌ای باشد که تئوری‌های موجود را به چالش می‌کشد.

- **ساختار:** ساختار این مقالات فشرده و یکپارچه است. نویسنده باید در متنی روان و بدون تقسیم‌بندی‌های مرسوم، به ترتیب به بیان زمینه و اهمیت یافته، شرح بسیار مختصر روش کار، ارائه یافته کلیدی (حداکثر با ۱ یا ۲ جدول/شکل) و بحثی کوتاه پیرامون اهمیت آن بپردازد. تعداد منابع نیز باید محدود باشد.
- **نکته کلیدی:** این قالب برای مطالعات ناتمام یا نتایج اولیه کم‌اهمیت مناسب نیست. توجیه لزوم **"انتشار سریع"** به دلیل اهمیت بالای یافته، اساس پذیرش این نوع مقاله است.

۱-۴- گزارش علمی (Scientific Report)

تمرکز این نوع مقاله بر ارائه **داده‌های ارزشمند، گسترده و با کیفیت بالا** است که پتانسیل استفاده مجدد توسط سایر محققان را دارند، حتی اگر مقاله مبتنی بر یک فرضیه مشخص نباشد.

- **مثال‌ها:** نتایج یک پیمایش گسترده تنوع زیستی خاک، داده‌های حاصل از پایش بلندمدت یک شاخص اکولوژیک، اعتبارسنجی یک مدل در یک منطقه جدید، یا ارائه یک پایگاه داده جدید و مهم.
- **ساختار:**
  - بخش **"مواد و روش‌ها"** در این نوع مقاله اهمیت حیاتی دارد و باید پروتکل کامل جمع‌آوری داده، کنترل کیفیت و ساختار دیتاست را با جزئیات کامل شرح دهد.
  - بخش "بحث" باید یک **بحث فنی (Technical Discussion)** باشد و بر کیفیت، محدودیت‌ها و پتانسیل استفاده از داده‌ها تمرکز کند. در این بخش باید از تفسیرهای علمی گسترده پرهیز شود.
- **ارزش اصلی:** اعتبار این مقاله در خودِ **داده‌ها** و **شفافیت کامل روش‌شناسی** آن نهفته است.

۱-۵- یادداشت فنی (Technical Note)

این نوع مقاله به معرفی یک **روش، تکنیک، نرم‌افزار یا ابزار آزمایشگاهی جدید یا بهبودیافته** اختصاص دارد که کاربرد مستقیمی در تحقیقات زیست‌شناسی خاک دارد.

- **الزامات اصلی:**
  - مقاله باید به وضوح نشان دهد که روش جدید چه **بهبودی** نسبت به روش‌های موجود ایجاد می‌کند (مثلاً افزایش دقت، کاهش هزینه، سرعت بالاتر).

- مقاله **باید شامل داده‌های اعتبار سنجی** باشد که کارایی و برتری روش جدید را در مقایسه با یک روش استاندارد اثبات کند.

- **ساختار:**
  - **مقدمه:** بیان واضح مشکل یا محدودیت در روش‌های موجود.
  - **شرح فنی:** توصیف دقیق، کامل و گام‌به‌گام روش یا ابزار جدید به گونه‌ای که کاملاً قابل پیاده‌سازی توسط دیگران باشد.
  - **نتایج اعتبارسنجی:** ارائه داده‌هایی که مزیت روش جدید را اثبات می‌کند.
  - **بحث:** خلاصه‌ای از مزایا، محدودیت‌ها و حوزه‌های کاربردی تکنیک جدید.

۲- راهنمای کامل تهیه مقاله پژوهشی (Detailed Guidelines for Original Research Articles)

۲-۱- شیوه‌نامه کلی نگارش و صفحه‌آرایی (General Formatting and Layout)

- **نرم‌افزار:** مقاله باید در نرم‌افزار Microsoft Word (نسخه ۲۰۰۷ یا بالاتر) تهیه شود.
- **اندازه صفحه:** A4
- **حاشیه:** ۳ سانتی‌متر از هر چهار طرف.
- **فاصله خطوط:** ۱,۵
- **ستون‌بندی:** تک ستونی.
- **شماره‌گذاری سطور:** از ابتدای مقاله تا انتها به صورت پیوسته (Continuous).
- **حداکثر حجم:** ۱۸ صفحه (شامل تمام بخش‌ها، جداول و اشکال).

۲-۲- نوع و اندازه فونت‌ها (Font Type and Size)

بخش مقاله	نوع قلم فارسی	اندازه	نوع قلم انگلیسی	اندازه
عنوان مقاله	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۴	Times New Roman (Bold)	۱۳
نام نویسندگان	B Nazanin	۱۲	Times New Roman	۱۱
وابستگی سازمانی	B Nazanin	۱۰	Times New Roman	۹
چکیده فارسی	B Nazanin	۱۲	-	-
واژه‌های کلیدی فارسی	B Nazanin	۱۲	-	-
عناوین اصلی (مانند مقدمه)	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۲	Times New Roman (Bold)	۱۱
متن اصلی مقاله	B Nazanin	۱۲	Times New Roman	۱۱
عنوان جدول و شکل	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۱	Times New Roman (Bold)	۱۰
محتوای داخل جدول/شکل	B Nazanin	۱۰	Times New Roman	۹
منابع	-	-	Times New Roman	۱۰
چکیده انگلیسی مبسوط	-	-	Times New Roman	۱۱

۲-۳- ساختار کامل مقاله پژوهشی (Full Structure of a Research Article)

۱- **عنوان (Title):** باید کوتاه، جامع و منعکس‌کننده محتوای اصلی مقاله (حداکثر ۲۰ کلمه) باشد.

۲- **مشخصات نویسندگان (Authors):** این بخش باید در فایلی جداگانه با عنوان "Title Page" ارسال شود. به منظور حفظ اصل داوری دوسو کور (Double-Blind Peer Review)، هیچ‌گونه اطلاعاتی از مشخصات نویسندگان نباید در فایل اصلی مقاله ذکر گردد.

۳- **چکیده فارسی (Persian Abstract):** به صورت ساختارمند و غیرمبسوط در یک پاراگراف (۲۵۰ الی ۳۰۰ کلمه) شامل بیان مسئله، هدف، روش کار، نتایج و نتیجه‌گیری نهایی باشد.

۴- **واژه‌های کلیدی فارسی (Keywords):** شامل ۳ الی ۶ واژه که در عنوان مقاله به کار نرفته و بر اساس حروف الفبا مرتب شده باشند.

۵- **مقدمه (Introduction):** شامل بیان اهمیت موضوع، مرور انتقادی پژوهش‌های پیشین، برجسته سازی شکاف دانشی (Knowledge Gap) و ارائه شفاف اهداف و فرضیه‌های تحقیق.

۶- **مواد و روش‌ها (Materials and Methods):** شرح دقیق و کامل مراحل تحقیق به گونه‌ای که برای سایر محققان قابل تکرار باشد. تمامی واحدها باید در سیستم استاندارد بین‌المللی (SI) ذکر شوند.

۷- **نتایج (Results):** ارائه عینی یافته‌ها با استفاده از متن، جداول و اشکال استاندارد.

- **اعداد:** اعداد در متن فارسی به صورت فارسی (۱۲۳) و در جداول و نمودارها به صورت انگلیسی (123) تایپ شوند.
- **جداول:** عنوان در بالای جدول قرار گیرد. جداول بدون خطوط عمودی و تنها با سه خط افقی اصلی ترسیم شوند.
- **اشکال:** عنوان در پایین شکل قرار گیرد. اشکال باید با کیفیت بالا (حداقل ۳۰۰ DPI برای تصاویر و ۶۰۰ DPI برای نمودارهای خطی) در فرمت‌های استاندارد (TIFF, JPEG, یا EPS) باشند. فایل اصلی نمودارها (مثلاً Excel) نیز باید ارسال گردد.

۸- **بحث (Discussion):** تحلیل و تفسیر عمیق نتایج، مقایسه با پژوهش‌های بین‌المللی، بیان محدودیت‌ها و توضیح اهمیت یافته‌ها.

۹- **نتیجه‌گیری (Conclusion):** جمع‌بندی روشن و متمرکز بر یافته‌های کلیدی.

۱۰- **سپاسگزاری (Acknowledgments):** قدردانی از حمایت‌های مالی و فنی (حداکثر ۵۰ کلمه).

۱۱- **منابع (References):** فهرست منابع باید بر اساس **بخش ۴ (شیوه‌نامه ارجاع‌دهی)** این راهنما تنظیم شود.

۱۲- **چکیده انگلیسی مبسوط (Extended English Abstract):** در انتهای مقاله و پس از منابع، با حجمی بین ۷۵۰ الی ۱۰۰۰ کلمه و شامل بخش‌های مجزای Background and Objectives, Materials and Methods, Results و Conclusion. **توجه: برای مقالات مروری، ساختار این بخش متفاوت بوده و در توضیحات مربوط به مقاله مروری در بخش ۱-۲ ذکر شده است.**

۳- ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش (Ethical Considerations and Research Transparency)

نشریه زیست شناسی خاک متعهد به رعایت بالاترین استانداردهای اخلاق در نشر (COPE) است.

- **۳-۱- ا صالت اثر و سرقت علمی (Originality and Plagiarism):** مقاله ار سالی نباید پیش از این منت شر شده یا همزمان برای نشریه دیگری ارسال شده باشد. تمام مقالات توسط سامانه‌های مشابه‌یاب بررسی می‌شوند و هرگونه سرقت علمی منجر به رد فوری مقاله خواهد شد.
- **۳-۲- تعارض منافع (Conflict of Interest):** تمام نویسندگان موظف هستند هرگونه ارتباط مالی، شخصی یا حرفه‌ای که می‌تواند بر روی پژوهش تأثیرگذار باشد را به صورت یک بیانیه شفاف در انتهای مقاله (پیش از بخش منابع) ذکر کنند.
- **۳-۳- معیارهای نوی سندگی (Authorship Criteria):** تمام افرادی که به عنوان نویسنده معرفی می‌شوند باید در پژوهش مشارکت قابل توجهی داشته باشند (طراحی، اجرا، تحلیل داده‌ها، نگارش یا بازبینی انتقادی مقاله).
- **۳-۴- بیانیه م شارکت نوی سندگان (Author Contributions Statement):** برای افزایش شفافیت، اکیداً توصیه می‌شود که نقش دقیق هر یک از نویسندگان در بخشی مجزا پس از نتیجه‌گیری مشخص گردد.

مثال: علیر ضا فلاح: مفهوم‌پردازی، روش شنا سی، نگارش-پیش‌نویس ا صلی. **بهمن خو شرو:** نظارت، اعتبار سنجی، نگارش-بازبینی و ویرایش.

- **۳-۵- بیانیه د ستر سی به داده‌ها (Data Availability Statement):** نوی سندگان ت شویق می شوند تا داده‌های خام تحقیق را در یکی از مخازن معتبر داده بارگذاری کرده و نحوه دسترسی به آن را در مقاله‌ی خود اعلام نمایند.

۴- شیوه‌نامه ارجاع‌دهی و تنظیم منابع (Citation and Reference Style Guide)

۴-۱- سیاست‌های کلی (General Policies)

- **زبان:** فهرست منابع نهایی باید صرفاً به زبان انگلیسی باشد.
- **ترجمه:** منابع فارسی باید به انگلیسی برگردانده شده و در انتهای آن عبارت (In Persian) ذکر شود.
- **ترتیب:** الفبایی بر اساس نام خانوادگی نویسنده اول.
- **DOI:** ذکر شناسه DOI برای تمام منابعی که دارای این شناسه هستند، الزامی است.

۴-۲- ارجاع‌دهی در متن (In-Text Citation)

- **فرمت:** (نویسنده, سال). مثال: (Fallah, 2025); (Fallah and Khoshru, 2025); (Fallah et al., 2025).

۴-۳- فرمت فهرست منابع نهایی (Formatting the Final Reference List)

۴-۳-۱- مقاله مجله علمی (Journal Article)

Author Last Name, A.A., Author Last Name, B.B. and Author Last Name, C.C., Year. Title of article. *Full Journal Name*, Volume(Issue), pp.Start-End. DOI: [doi link]

- **مثال:**

Adesemoye, A.O., Torbert, H.A. and Kloepper, J.W., 2009. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(8), pp.876-884. DOI: 10.1139/W09-041

۴-۳-۲- کتاب (Book)

Author Last Name, A.A., Year. *Title of Book*. Edition (if not the first). Publisher.

- **مثال:**

Marschner, P., 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd ed. Academic Press.

۴-۳-۳- فصل از کتاب (Book Chapter)

Author Last Name, A.A., Year. Title of chapter. In: Editor, A.A. (ed.) *Title of Book*. Publisher, pp.Start-End.

- **مثال:**

Olsen, S.R. and Sommers, L.E., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L. (ed.) *Methods of Soil Analysis, Part 2*. 2nd ed. ASA and SSSA, pp.403-430.

۴-۳-۴- منبع فارسی ترجمه شده (Translated Persian Source)

Author Last Name, A.A., Year. Title of article in English. *Translated Journal Name*, Volume(Issue), pp.Start-End. (In Persian). DOI: [doi link]

- **مثال:**

Ahmadi, A. and Hosseini, H., 2025. The effect of biochar on microbial diversity of saline soils. *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp.15-28. (In Persian). DOI: [doi link]

۴-۳-۵- مقالات کنفرانس (Conference Proceedings)

Author Last Name, A.A., Year. Title of paper. In: *Title of the conference proceedings*, Date of conference, Location. Publisher, pp.Start-End.

- **مثال:**

Hanbury, A., 2002. The taming of the hue, saturation and brightness colour Space. In: *7th Computer Vision Winter Workshop*, February 2002, Bad Aussee, Austria. pp.90-108.

۴-۳-۶- پایان‌نامه و رساله (Thesis and Dissertation)

Author Last Name, A.A., Year. *Title of thesis*. PhD/MSc Thesis. Name of University.

مثال:

Khosru, B., 2020. *Interactions between Nanoparticles and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in a Calcareous Soil*. PhD Thesis. University of Tehran.

۴-۳-۷- منبع آنلاین (Online Source)

Author/Organization, Year. *Title of Page*. [Online] Available at: URL [Accessed Day Month Year].

- **مثال:**

Soil Science Society of Iran, 2025. *Publication Ethics Guidelines*. [Online] Available at: https://sbj.areeo.ac.ir/ethics [Accessed 9 July 2025].

۵- پیوست

جدول محدودیت انواع مقالات

نوع مقاله	محدودیت تعداد کلمه	تعداد صفحات هدف	محدودیت جداول/اشکال
مقاله پژوهشی	حدود ۶،۰۰۰ تا ۷،۰۰۰	۱۵ تا ۲۰	ندارد (بسته به ضرورت)
مقاله مروری	حدود ۱۰،۰۰۰ تا ۱۵،۰۰۰	۳۰ تا ۴۵	ندارد (بسته به ضرورت)
مقاله کوتاه	حداکثر ۲،۸۰۰	۵ تا ۸	مجموعاً حداکثر ۴ عدد*
گزارش علمی	حداکثر ۱،۲۰۰	۳	ندارد (با هدف ارائه کامل داده)
یادداشت فنی	حداکثر ۲،۵۰۰	۴ تا ۶	مجموعاً حداکثر ۴ عدد*

* مجموع تعداد جداول و اشکال نباید از ۴ بیشتر شود.

نشریه زیست شناسی خاک

فرم تعهد نامه

نشریه پژوهش‌های خاک

اینجانب ..... نویسنده مسئول مقاله زیر با
عنوان مقاله:

- سال‌های اجراء آزمایش ذکر شود

موارد زیر را به آگاهی می رسانم:

۱. کلیه تهیه کنندگان مقاله از ارسال آن به دفتر مجله شما آگاهند
۲. مقاله قبلاً در هیچ مجله داخلی و خارجی منتشر نشده است
۳. مقاله تا زمان پایان بررسی در آن مجله به مجله دیگری ارسال نخواهد شد.
۴. هیچگونه تغییری در تعداد نویسندگان یا ترتیب ذکر اسامی انجام نخواهد شد.

نام نام خانوادگی نویسنده اول: امضاء نویسنده اول مقاله

نام نام خانوادگی نویسنده دوم: امضاء نویسنده دوم مقاله

نام نام خانوادگی نویسنده سوم: امضاء نویسنده سوم مقاله

نام نام خانوادگی نویسنده چهارم: امضاء نویسنده چهارم‌مقاله

اسامی داوران	تعداد داوری
دکتر احمد اصغرزاده	۲
دکتر کبری ثقفی	۲
دکتر آیدین حمیدی	۱
دکتر بهمن خوشرو	۱۱
دکتر فرهاد رجالی	۱
دکتر سمانه سماوات	۲
دکتر شایان شریعتی	۵
دکتر مهدیه شمشیری پور	۱
دکتر علی عبادی	۳
دکتر فرشید نوربخش	۲

1-17 /Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Effect of biopriming with plant growth-promoting bacteria on seed germination indices of wheat under salinity stress

Ahmad Asgharzadeh*[1], Kobra Saghafi[2] and Bahman Khoshru[3*]

1- Associate Professor of Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj 31785-311, Iran. a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

2- Researcher of Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Karaj 31785-311, Iran.,Organization (AREEO) kobra_saghafi@yahoo.com

3- Postdoctoral Researcher, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Karaj 31785-311, Iran.,Extension Organization (AREEO) bahmankhoshru@yahoo.com

Article Info

Received:2025-02-01

Accepted: 2025-05-13

Keywords: Combined inoculation, growth promotion, seedling vigor, Pseudomonas, synergy

Corresponding author's email: a_asgharzadeh_2000@yahoo.com & bahmankhoshru@yahoo.com

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368422.276

Extended Abstract

Background and Objectives: Soil salinity is a major challenge for global agriculture, especially in arid and semi-arid regions, threatening crop yields and food security. Wheat (Triticum aestivum L.), one of the world's most important staple crops, is particularly sensitive to salinity stress, which hampers seed germination, seedling establishment, and subsequent growth and productivity. The detrimental effects of salinity include reduced germination rates, stunted root and shoot growth, disrupted nutrient uptake, and decreased photosynthetic efficiency. However, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) present an eco-friendly solution to mitigate these adverse effects. PGPR enhance plant growth through mechanisms such as nitrogen fixation, phytohormones production, ethylene reduction, improved nutrient acquisition (e.g., phosphorus solubilization), and systemic resistance induction. This study aimed to explore the potential of seed bio-priming with selected PGPR strains to enhance germination and seedling growth of the salt-tolerant wheat cultivar 'Kavir' under different salinity levels. The objectives included assessing the effects of single and combined (consortium) inoculations of *Azospirillum* (As), *Azotobacter* (Az), and *Pseudomonas* (Ps) on key seedling growth parameters and identifying the most effective bacterial combinations for improving salt tolerance in the 'Kavir' cultivar.

Materials and Methods: A factorial experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) with three replications at the Soil Biology and Biotechnology Research Department of the Soil and Water Research Institute of Iran. The experiment consisted of two factors: salinity levels (control: 0.35 dS/m (tap water), 6, and 14 dS/m) and seed bio-priming treatments. The bacterial treatments included three isolates: *Pseudomonas fluorescens* Strain 169 (Ps), *Azotobacter chroococcum* Strain 5 (Az), and *Azospirillum brasilense* Strain OF (As), applied as single, dual (As+Az, As+Ps, Az+Ps), and triple (Az+As+Ps) inoculations, along with a non-inoculated control. The experiment was carried out in 72 Petri dishes containing sterile filter paper moistened with the respective saline solutions. Seeds of 'Kavir' wheat were surface-sterilized and inoculated with the bacterial treatments before being placed in the Petri dishes. The Petri dishes were incubated under controlled conditions: a temperature of 25 ± 2°C, a 16-hour light/8-hour dark photoperiod, and 70–80% relative humidity. Measured traits included germination percentage and rate (calculated using Maguire's formula), root and shoot length (mm), seedling water content (%), seedling vigor index (calculated as (Germination % × Seedling Length (cm)), and root-to-shoot ratio. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and means were compared using Duncan's multiple range test (DMRT) at the 5% probability level ($P \leq 0.05$). Data analysis was performed using SAS software version 9.1. Prior to conducting mean comparisons, the normal distribution of the data was assessed and confirmed.

Results: The results showed that the main effects of salinity and bacteria were significant at the 1% probability level ($p<0.01$), and their interaction effect on germination percentage, germination rate, root length, shoot length, and seedling vigor index was significant at the 5% probability level ($p<0.05$). The interaction effect of salinity and bacteria on shoot fresh weight was not significant ($p>0.05$). Increasing salinity led to a significant decrease in all indices. For example, in the control condition (without salinity), the seedling vigor index in the control treatment was 20342, which decreased to 7296 (approximately 64% reduction) with increasing salinity to 14 dS/m. However, bacterial treatments had a positive effect on all traits, and combined (consortium) treatments showed a significant improvement in the indices compared to single inoculations. For instance, in the control condition, the Az+As+Ps combined treatment increased the seedling vigor index to 31670.6 (approximately 56% increase compared to the control). At 14 dS/m salinity, the As+Az combined treatment also increased the seedling vigor index to 12757.3 (approximately 75% increase compared to the control of the same salinity level). Regarding root length, in the control condition, the As+Az treatment showed approximately a 36% increase (to 186 mm) compared to the control (137 mm). At 14 dS/m salinity, the same treatment showed approximately a 66% increase (to 106 mm) compared to the control (64 mm). Regarding germination percentage, in the control condition, the Az+Ps treatment showed approximately a 14% increase (to 96%) compared to the control (84%), and at 14 dS/m salinity, the As+Az, Az+As+Ps, and Ps treatments similarly showed approximately a 31% increase (to 67%) compared to the control (51%).

Conclusion: The findings of this study revealed that salinity stress significantly impairs seed germination and seedling growth in the salt-tolerant wheat cultivar 'Kavir,' leading to a reduction in germination percentage and rate, as well as root and shoot length. However, seed bio-priming with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), particularly combined treatments, effectively mitigated the adverse effects of salinity and improved key parameters associated with seedling establishment and growth. The impact of PGPR varied across different salinity levels, indicating that the optimal bacterial combination changes depending on the intensity of stress. In general, triple combinations (e.g., Az+As+Ps under non-saline and mild salinity conditions) and dual combinations (e.g., As+Az or As+Ps under severe salinity) demonstrated superior performance in enhancing seedling growth. This highlights the dependency of PGPR efficacy on salinity levels, emphasizing that no single bacterial combination can be universally recommended for all conditions. Therefore, selecting the appropriate bacterial combination should consider soil salinity levels and environmental conditions. Another significant finding is that 'Kavir,' recognized as a salt-tolerant wheat cultivar, showed further enhancement in its inherent salt tolerance through the use of PGPR. This underscores the potential of PGPR as a tool to boost the resilience of even salt-tolerant genotypes, providing additional protection and improved growth under saline conditions.

Cite this article:Asgharzadeh, A., Saghafi, K., Khoshru,B.,2025. Effect of biopriming with plant growth-promoting bacteria on seed germination indices of wheat under salinity stress. Journal of Soil Biology, 13 (1),1-17.

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368422.276
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر پیش‌تیمار زیستی با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گندم رقم کویر در شرایط تنش شوری

احمد اصغرزاده*[۱]، کبری ثقفی[۲] و بهمن خوشرو*[۳]

۱- دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

۲- محقق موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.kobra_saghafi@yahoo.com

۳- محقق پسادکترا، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. bahmankhoshru@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۲۳

چکیده

به‌منظور بررسی اثر پیش‌تیمار زیستی بذر گندم رقم کویر با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد گیاهچه رقم متحمل به شوری کویر در شرایط تنش شوری، پژوهشی آزمایشگاهی در بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب انجام شد. این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار اجرا گردید. سطوح تنش شوری (شاهد: آب شهر با شوری ۰/۳۵، ۶ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) به عنوان فاکتور اول و سطوح پیش‌تیمار زیستی بذر با سه جدایه باکتریایی از جنس‌های *Azospirillum brasilense* Strain OF (As)، *Azotobacter chroococcum* Strain 5 (Az) و *Pseudomonas fluorescens* Strain 169 (Ps) (به صورت تلقیح تکی، ترکیبی دو یا سه‌تایی و شاهد بدون تلقیح) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. آزمایش در ۷۲ واحد آزمایشی (پتری) روی گندم رقم کویر و تحت شرایط کاملاً کنترل‌شده صورت پذیرفت. صفات اندازه‌گیری‌شده شامل درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، درصد آب گیاهچه و شاخص بنیه گیاهچه بودند. نتایج نشان داد اثرات اصلی شوری و باکتری و اثر متقابل آن‌ها بر صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود ($p<0.01$). با افزایش شوری از ۰/۳۵ به ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، شاخص بنیه گیاهچه در تیمار شاهد (بدون تلقیح) به میزان ۶۴ درصد کاهش یافت. با این حال، تیمار ترکیبی سه‌تایی Az+As+Ps در شرایط بدون شوری، شاخص بنیه گیاهچه را تا ۵۶ درصد افزایش داد. در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس، تیمار ترکیبی دوتایی As+Az توانست شاخص بنیه را تا ۷۵ درصد نسبت به شاهد همان سطح شوری افزایش دهد. همچنین، طول ریشه‌چه در شرایط شاهد بدون شوری برای تیمار As+Az حدود ۳۶ درصد افزایش یافت و در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس، همین تیمار افزایشی ۶۶ درصدی نشان داد. درصد جوانه‌زنی نیز در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس برای تیمارهای As+Az ، Az+As+Ps و Ps حدود ۳۱ درصد بهبود یافت.

کلیدواژه: تلقیح ترکیبی، محرک رشد، بنیه گیاهچه، *سودوموناس*، هم‌افزایی.

استناد: اصغرزاده، ک.، ثقفی، ک.، خوشرو، ب.، ۱۴۰۴. تأثیر پیش‌تیمار زیستی با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گندم رقم کویر در شرایط تنش شوری. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱)۱۳، ۱-۱۷

مقدمه

تنش شوری به عنوان یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های تولید محصولات کشاورزی، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان مانند ایران، شناخته می‌شود (Munns and Tester, 2008; Rengasamy, 2016). این تنش با ایجاد عدم تعادل اسمزی و یونی و سمیت، فرآیندهای حیاتی گیاه از جمله جذب آب، رشد و عملکرد را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Xiong et al., 2024; Seleiman et al., 2020). ایران با وسعت حدود ۳۴ میلیون هکتار اراضی شور (FAO, 2021) و با چالش‌های فزاینده ناشی از تغییرات اقلیمی و کمبود منابع آب، نیازمند راهکارهای پایدار برای افزایش تولید گندم، به‌عنوان محصولی استراتژیک، در این شرایط نامساعد است (Shahsavand Hassani et al., 2021; Mokarian et al., 2022).

در راستای دستیابی به کشاورزی پایدار و کاهش وابستگی به نهاده‌های شیمیایی پرهزینه و زیان‌بار، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[1]) به‌عنوان یک راهکار زیستی مؤثر در مدیریت حاصلخیزی خاک و افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی، ازجمله شوری، موردتوجه قرارگرفته است (Glick, 2012; Backer et al., 2018; Fàtima et al., 2020). پیش‌تیمار زیستی بذر (Bio-priming) با PGPRها، به‌عنوان یک روش ساده، مؤثر و کم‌هزینه، راهکاری امیدبخش برای بهبود جوانه‌زنی و استقرار اولیه گیاهچه در شرایط تنش، به‌ویژه در مراحل حساس ابتدایی رشد، محسوب می‌شود (Shaffique et al., 2023).

باکتری‌های PGPR از طریق مکانیسم‌های متعددی می‌توانند تحمل گیاهان را به شوری افزایش داده و رشد آن‌ها را بهبود بخشند (Khoshru et al., 2025b). این مکانیسم‌ها شامل تولید هورمون‌های گیاهی (مانند اکسین)، تولید آنزیم ACC دآمیناز برای کاهش سطح اتیلن استرس، افزایش دسترسی به عناصر غذایی (مانند فسفر و آهن) از طریق انحلال ترکیبات نامحلول و تولید سیدروفور، و القای مقاومت سیستمیک در گیاه می‌باشند (Khoshru et al., 2025a; Fallah Nosratabad and Khoshru, 2024; Khosravi et al, 2024; Khoshru et al., 2020; Rouphael and Colla, 2020; Glick, 2014; Nadeem et al., 2014; Vessey, 2003). مطالعات متعددی به بررسی اثرات پیش‌تیمار بذر با PGPRها بر جوانه‌زنی و رشد اولیه گندم تحت تنش شوری پرداخته‌اند. برای مثال، گزارش‌شده است که تلقیح بذر گندم با سویه‌های خاصی از *Azospirillum*، *Azotobacter*، *Pseudomonas* و *Bacillus* می‌تواند با تعدیل اثرات منفی شوری، درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و بنیه گیاهچه را بهبود بخشد (Bashan Nascimento et al., 2018; Nadeem et al., 2016; Bashan and de-Bashan, 2010). این اثرات مثبت اغلب به توانایی باکتری‌ها در تولید فاکتورهای محرک رشد و یا افزایش تحمل گیاه به تنش شوری نسبت داده‌شده است.

باوجود پیشرفت‌های اخیر، خلاهای تحقیقاتی مهمی در زمینه کاربرد PGPRها برای بهبود جوانه‌زنی گندم تحت تنش شوری وجود دارد. اولاً، بیشتر پژوهش‌ها بر روی تلقیح تکی باکتری‌ها تمرکز داشته و مطالعات در زمینه استفاده از کنسرسیوم‌ها (ترکیب چند جدایه باکتریایی) از طریق پیش‌تیمار بذر، که پتانسیل هم‌افزایی و هم‌پوشانی مکانیسم‌های مختلف PGPR را دارا می‌باشند، به‌ویژه در شرایط تنش شوری، محدود است. انتظار می‌رود که کنسرسیوم‌های باکتریایی به دلیل تنوع مکانیسم‌های عمل، اثربخشی بیشتری نسبت به تلقیح تکی داشته باشند. ثانیاً، تحقیقات در زمینه پاسخ ارقام خاص و متحمل به شوری گندم ایران، مانند رقم کویر، به پیش‌تیمار با PGPRها، به‌ویژه کنسرسیوم‌های باکتریایی، بسیار اندک است. رقم

[1] *Plant growth–promoting rhizobacteria*

کویر به دلیل سازگاری با شرایط مناطق خشک و نیمه‌خشک و کشت گسترده در اراضی شور، نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر برای بهبود پتانسیل تولید در شرایط تنش است (Ravari et al., 2017). ثالثاً، نیاز به درک عمیق‌تر از مکانیسم‌های عمل کنسرسیوم‌های باکتریایی در سطوح اولیه رشد گیاهچه، به‌ویژه با تمرکز بر شاخص‌های کلیدی مانند بنیه گیاهچه که نشان‌دهنده پتانسیل استقرار گیاه است، وجود دارد.

با توجه به لزوم افزایش پایداری تولید گندم در اراضی شور ایران و پتانسیل بالای پیش‌تیمار زیستی با PGPRها، پژوهش حاضر با هدف پرداختن به خلاهای تحقیقاتی فوق طراحی گردید. این مطالعه با رویکردی نوآورانه، اثر پیش‌تیمار بذر گندم رقم کویر را با جنس‌های مهم باکتری‌های PGPR (*Azospirillum*، *Azotobacter* و *Pseudomonas*) به صورت تلقیح منفرد و کنسرسیوم سه‌گانه، بر شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه در شرایط سطوح مختلف تنش شوری بررسی می‌نماید. این تحقیق، ضمن تکمیل دانش موجود در زمینه اثرات PGPRها بر گندم تحت شوری، به‌طور خاص بر پتانسیل کنسرسیوم‌های باکتریایی در بهبود تحمل به شوری رقم کویر گندم در مراحل اولیه رشد تمرکز دارد و با بررسی شاخص بنیه گیاهچه، اطلاعات ارزشمندی در خصوص مکانیسم‌های احتمالی هم‌افزایی در این مرحله حیاتی فراهم می‌آورد. نتایج این پژوهش می‌تواند مبنای علمی برای توسعه کودهای زیستی اختصاصی و راهکارهای بومی‌سازی شده برای مدیریت تنش شوری در مناطق گندم‌خیز ایران باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹در آزمایشگاه تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور در شهر کرج استان البرز انجام شد.

مواد گیاهی

بذور مورداستفاده در این پژوهش از گندم نان رقم کویر، از نوع بذرهای اصلاح‌شده دارای گواهی[۲]، تهیه‌شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران واقع در کرج تأمین گردید. بذور مورداستفاده مربوط به تولید سال جدید (سال انجام تحقیق) بودند. این رقم، که به دلیل سازگاری مناسب با شرایط کم‌آبی و تحمل نسبی به شوری خاک، در مناطق وسیعی از ایران کشت می‌شود، به‌عنوان نمونه‌ای از ارقام متحمل به تنش شوری انتخاب گردید. پیش از آغاز آزمایشات، بذور به‌منظور حصول اطمینان از یکنواختی و حذف هرگونه بذر آسیب‌دیده، شکسته یا دارای نشانه‌های بیماری، موردبررسی دقیق قرار گرفتند.

تیمارهای آزمایشی

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول شامل سطوح مختلف تنش شوری ناشی از نمک کلرید سدیم (NaCl)در سه سطح بود: شاهد (آب شهر با هدایت الکتریکی ۰/۳۵ دسی‌زیمنس بر متر)، شوری متوسط (۶ دسی‌زیمنس بر متر)، و شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر). عامل دوم این آزمایش، پیش‌تیمار زیستی بذر با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) بود که شامل شش سطح تلقیح بود: بدون تلقیح (شاهد)، تلقیح با *Azospirillum brasilense* Strain OF (As)، تلقیح با *Azotobacter chroococcum* Strain 5 (Az)، تلقیح با *Pseudomonas fluorescens* Strain 169 (Ps)، ترکیب دوگانه (As+Az، As+Ps، Az+Ps)، و ترکیب سه‌گانه (Az+As+Ps). به‌منظور تهیه محلول‌های شوری، ابتدا محلول مادر با غلظت بالا تهیه و سپس با استفاده از آب مقطر، رقیق‌سازی انجام و غلظت‌های موردنظر حاصل گردید. صحت غلظت‌های تهیه‌شده با استفاده از دستگاه

[۲] Certified Improved Seeds

هدایت‌سنج[۳] کالیبره شده، به‌طور دقیق اندازه‌گیری و کنترل شد (Richards, 1954). سویه‌های باکتریایی مورداستفاده در این پژوهش، شامل از بانک میکروبی بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور تهیه گردیدند. بر اساس اطلاعات ارائه‌شده توسط این بانک میکروبی، هر سه باکتری از خاک‌های شور مناطق مختلف ایران جداسازی شده‌اند.

تهیه مایه تلقیح باکتریایی

به‌منظور آماده‌سازی بذور گندم کویر برای آزمایش، ابتدا مایه‌تلقیح‌های باکتریایی شامل *A. chroococcum* Strain 5، *A. brasilense* Strain OF و *P. fluorescens* Strain 169 تهیه گردید. فرایند آماده‌سازی سوسپانسیون به این صورت انجام شد که باکتری‌ها در محیط کشت مشخص (محیط کشت NFB[۴] برای *A. chroococcum* Strain 5 و برای کشت باکتری *A. brasilense* Strain OF از محیط کشت مالات استفاده گردید. باکتری *P. fluorescens* Strain 169 نیز در محیط کشت کینگ B کشت داده شد) در شرایط آزمایشگاهی مناسب کشت داده شدند. پس از دستیابی به مرحله رشد لگاریتمی، غلظت سوسپانسیون‌های باکتریایی با استفاده از روش شمارش کلنی (CFU[۵]/mL) تعیین شد. این کار با انجام رقت‌سازی‌های سریالی و کشت روی محیط جامد انجام گرفت و نتایج به‌منظور تنظیم جمعیت مطلوب بررسی شدند (Madigan et al., 2018). جمعیت مورداستفاده برای هر باکتری در جدول ۱ ارائه‌شده است.

جدول۱- نوع و جمعیت باکتری‌های مورداستفاده در آزمایش

	جمعیت باکتری (CFU/g)		
نوع باکتری	*Azotobacter chroococcum* Strain 5	*Azospirillum brasilense* Strain OF	*Pseudomonas fluorescens* Strain 169
فاز آزمایشگاهی	۷/۴×۱۰^۸	۴/۴×۱۰^۸	۵/۵×۱۰^۸

آماده‌سازی بذر و تلقیح با باکتری

به‌منظور انجام آزمایش جوانه‌زنی گندم کویر و جلوگیری از هرگونه آلودگی میکروبی، ابتدا تمامی ظروف (پتری‌ها) و کاغذ صافی‌های مورداستفاده (واتمن شماره ۱) به‌عنوان محیط کشت، تحت شرایط استریلیزاسیون با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سطوح کاری و ابزارهای مورداستفاده نیز با محلول الکل ٪۷۰ گندزدایی شدند. بذور گندم کویر قبل از تلقیح، طی یک فرایند دو مرحله‌ای ضدعفونی سطحی شدند: ابتدا به مدت یک دقیقه در الکل ٪۷۰ و سپس به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ٪۱/۵ غوطه‌ور شدند و پس از اتمام فرایند ضدعفونی، بذور به‌منظور حذف کامل بقایای هیپوکلریت سدیم، ده مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند(Bashan et al., 2014). سپس، تعداد ۲۵ بذر از بذور استریل شده به هرپتری منتقل و با تیمارهای باکتریایی (مطابق با اطلاعات ارائه‌شده در جدول ۱) به روش غوطه‌وری به مدت ۳۰ دقیقه تلقیح شدند. به‌منظور تلقیح، از سوسپانسیون‌های باکتریایی با غلظت تنظیم شده در چگالی نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای تلقیح ۱۰ گرم بذر گندم، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به کار رفت. در تیمار شاهد، بذور صرفاً با آب مقطر استریل تیمار شدند و هیچگونه پیش‌تیمار زیستی اعمال نگردید. شایان ذکر است که در این پژوهش، از هیچ‌گونه ماده چسباننده (adjuvant) به‌منظور افزایش

[۳] EC meter
[۴] N-Free Broth
[۵] Colony forming unit

چسبندگی باکتری‌ها به بذر استفاده نشد. پس از انجام پیش‌تیمار زیستی، بذور به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط (۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد سلسیوس) و در شرایط سایه خشک شدند تا رطوبت اضافی آن‌ها از بین برود.

شرایط اعمال شوری

برای ایجاد شرایط کنترل‌شده جهت جوانه‌زنی بذور گندم کویر، در هر پتری ۱۵ میلی‌لیتر از محلول‌های شوری با غلظت‌های تعیین‌شده (شامل تیمار شاهد با آب شهر با هدایت الکتریکی ۰/۳۵ دسی‌زیمنس بر متر و سطوح شوری ۶ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) اضافه گردید. برای جلوگیری از تبخیر و تغییر در غلظت محلول‌ها، درب پتری‌ها با پارافیلم به‌طور کامل بسته شد. پتری‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی در داخل دستگاه ژرمیناتور (مدلTAT ، تولید شرکت پویا صنعت رشنو) قرار داده شدند. شرایط محیطی دستگاه شامل دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و محیط کاملاً تاریک تنظیم گردید. در طول دوره آزمایش، وضعیت پتری‌ها به‌صورت دوره‌ای (هر ۱۲ ساعت یک‌بار) بررسی شد و برای حفظ رطوبت بهینه کاغذ صافی‌ها، در صورت نیاز مقدار معینی آب مقطر استریل به آن‌ها افزوده می‌شد (ISTA, 2016; Bewley et al., 2013).

جوانه‌زنی و اندازه‌گیری صفات

برای ارزیابی جوانه‌زنی بذور، مشاهدات به‌صورت روزانه و در ساعت مشخص (۹ صبح) به مدت ۱۰ روز متوالی انجام شد. به‌منظور جلوگیری از تجمع املاح و تأثیر آن بر نتایج آزمایش، کاغذ صافی‌های موجود در پتری‌ها قبل از هر نوبت آبیاری با محلول‌های شوری تازه تعویض می‌شدند. معیار جوانه‌زنی بذر، ظهور ریشه‌چه‌ای با طول ۲ تا ۳ میلی‌متر در نظر گرفته شد (Ranal, and Santana, 2006). تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر پتری به‌صورت روزانه شمارش شده و در فرم‌های مخصوص ثبت می‌گردید. این فرایند شمارش تا زمانی ادامه داشت که به مدت سه روز پی‌درپی، هیچ تغییری در تعداد بذور جوانه‌زده مشاهده نشود. پس از گذشت ۱۰ روز از شروع آزمایش، درصد جوانه‌زنی بذور محاسبه گردید. طول ساقه‌چه بذور با استفاده از خط‌کش میلی‌متری با دقت یک میلی‌متر اندازه‌گیری شد. همچنین طول گیاهچه از نوک ریشه‌چه تا انتهای ساقه‌چه با کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر تعیین گردید (Bewley et al., 2013).

محاسبه شاخص‌های جوانه‌زنی

به منظور تعیین کمی شاخص‌های مرتبط با جوانه‌زنی بذور گندم، از روابط ریاضی زیر بهره گرفته شد:

درصد جوانه‌زنی :(GP) این شاخص به وسیله رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$GP = (\sum Ni / N) \times ۱۰۰$$ رابطه(۱)

در این رابطه، Ni نمایانگر تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و N نشان‌دهنده تعداد کل بذرهای کشت شده در هر پتری می‌باشد (Maguire, 1962).

سرعت جوانه‌زنی :(GS) برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی، از رابطه ۲ استفاده شد:

$$GS = (a/۱) + ((b-a)/۲) + ((c-b)/۳) + ((d-c)/۴) + \ldots + ((n-n-۱)/N)$$ رابطه(۲)

در این رابطه، GS معرف سرعت جوانه‌زنی است و حروف a، b، c، d، ...، nبه ترتیب نشان‌دهنده تعداد بذرهای جوانه‌زده پس از گذشت ۱، ۲، ۳، ۴، ...، N روز از آغاز آبگیری بذور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشند (Hauggaard-Nielsen & Jensen, 2001).

شاخص بنیه گیاهچه :(Vigor Index - VI) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$VI = GP (\%) \times L$$

رابطه(۳)

که در آن GP درصد جوانه‌زنی و L طول گیاهچه (بر حسب میلی‌لیتر) می‌باشد (Bewley et al., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش ، از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید. برای

مقایسه میانگین تیمارها و تعیین تفاوت‌های معنی‌دار بین آن‌ها، آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال مربوطه به‌کار گرفته شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش، اثر سطوح مختلف تنش شوری ناشی از NaCl و همچنین تأثیر پیش‌تیمار بذر با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه گندم کویر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی این اثرات، شاخص‌های مختلفی از جمله درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، درصد آب گیاهچه و شاخص بنیه گیاهچه اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل شدند. جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در مرحله جوانه‌زنی در رقم کویر را ارائه می‌دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در مرحله جوانه‌زنی در رقم کویر

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	درصد آب گیاهچه	شاخص‌بنیه گیاهچه
باکتری	۷	۲۰۳**	۰/۳۴**	۹۰۵**	۱۱۹۵/۷**	۰/۰۳۷۹**	۶۲۴۸۳۷۲۷**
شوری	۲	۳۹۹۹**	۲۸/۷۳**	۲۴۰۷۸**	۱۲۰۶۹/۳**	۰/۰۲۶۸**	۱۲۱۰۲۲۰۲۹۱**
شوری* باکتری	۱۴	۶۴/۵۸*	۰/۰۴**	۱۲۸*	۱۱۸/۹۵*	۰/۰۰۳۴**	۷۲۵۸۵۴۲**
خطا	۴۸	۱۹/۸۲	۰/۰۱	۱۵/۸	۴۱/۴۴	۰/۰۰۰۹۳	۳۱۲۵۹۵۸
ضریب تغییرات		۷/۵۴	۵/۹	۴/۲۸	۳/۱۰	۷/۸۲	۱۳/۸۷

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪ احتمال آماری، ns معنی دار نیست.

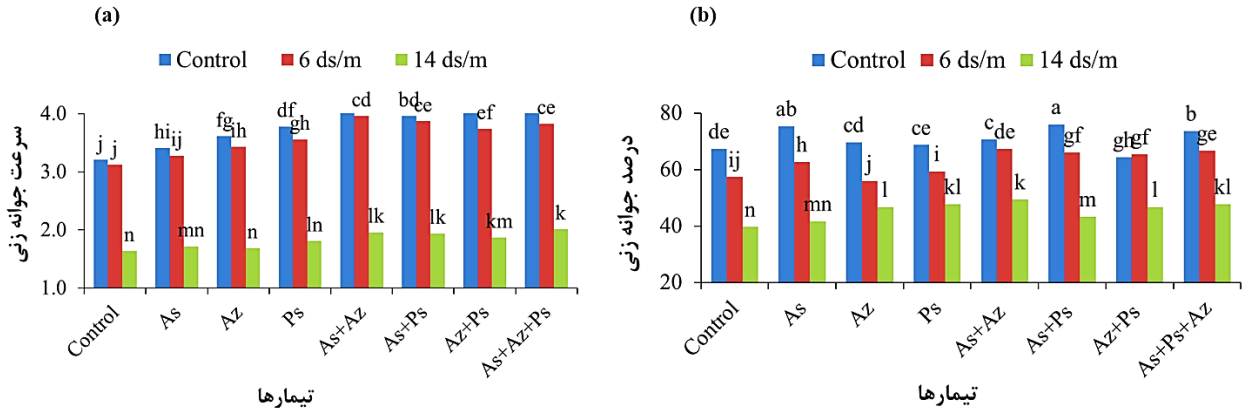
سرعت جوانه زنی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس، همانطور که در جدول ۲ قابل مشاهده است، حاکی از اثر معنی‌دار تنش شوری، تیمار باکتریایی و اثر متقابل این دو بر سرعت جوانه‌زنی گندم بود($p<0.01$).در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، سرعت جوانه‌زنی در تیمار بدون تلقیح (شاهد صفر) ۳/۲۱ بود. تلقیح با باکتری *A. brasilense* Strain OF (As) به طور معنی‌داری سرعت جوانه‌زنی را به ۳/۴۱ افزایش داد. تلقیح با *A. chroococcum* Strain 5 (Az) و *P. fluorescens* Strain 169 (Ps) نیز سرعت جوانه‌زنی را افزایش داده و به ترتیب مقادیر ۳/۶۱ و ۳/۷۸ را نشان دادند. در این شرایط، تیمار ترکیبی سه‌گانه (Az+As+Ps) با سرعت جوانه‌زنی ۴/۱۸، بیشترین تأثیر را در تسریع جوانه‌زنی داشت. با افزایش سطح شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد به ۳/۱۲ کاهش یافت. در این سطح شوری، تلقیح با As، Az و Ps به ترتیب سرعت جوانه‌زنی را به ۳/۲۸، ۳/۴۶ و ۳/۵۶ افزایش دادند. تیمار ترکیبی As+Az با سرعت جوانه‌زنی ۳/۹۶، بیشترین تأثیر را در تسریع جوانه‌زنی در این سطح شوری نشان داد. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد به ۱/۶۲ کاهش یافت. با این حال، تلقیح باAs ، Az و Ps همچنان تأثیر مثبتی داشتند و سرعت جوانه‌زنی را به ترتیب به ۱/۶۹، ۱/۷۲ و ۱/۶۴ افزایش دادند. در این سطح شوری، تیمار ترکیبی As+Ps با سرعت جوانه‌زنی ۱/۷۸، بیشترین تأثیر را در تسریع جوانه‌زنی نشان داد (شکل ۱-a).

درصد جوانه‌زنی

بر اساس تجزیه واریانس انجام شده (جدول ۲)، اثرات اصلی شوری و تلقیح باکتریایی و همچنین اثر برهم‌کنش این دو عامل، به طور معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی تاثیرگذار بود ($p<0.05$). در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، بالاترین درصد جوانه‌زنی (۷۶٪) در تیمار *A. brasilense* Strain OF و *P. fluorescens* Strain 169 (As+Ps)مشاهده شد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی این دو باکتری در بهبود جوانه‌زنی در شرایط بهینه است. در این شرایط، تیمار شاهد بدون تلقیح ۶۷/۳۳٪ جوانه‌زنی داشت و تلقیح با *A. brasilense* Strain OF به تنهایی

نیز منجر به افزایش آن به ۷۵/۳۵٪ شد. با افزایش سطح شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد به ۵۷/۴۲٪ کاهش یافت، اما تیمار سه‌گانه Az+As+Psبا حفظ درصد جوانه‌زنی در سطح ۶۶/۶۷٪، عملکرد مناسبی نشان داد. در این سطح شوری، تلقیح با باکتری‌های *A. brasilense* Strain OF، *A. chroococcum* Strain 5 و *P. fluorescens* Strain 169 به تنهایی نیز به ترتیب درصد جوانه‌زنی را به ۶۲/۶۷٪، ۵۶٪ و ۵۹/۳۴٪ افزایش دادند. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، تأثیر بازدارنده شوری به وضوح دیده شد و درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد به ۳۹/۶۷٪ کاهش یافت. با این حال، حتی در این شرایط سخت، تیمار ترکیبی Az+As+Ps توانست درصد جوانه‌زنی را تا ۴۷/۶۷٪ افزایش دهد و تیمار *A. brasilense* Strain OF و *A. chroococcum* Strain 5 (As+Az)نیز به همین میزان جوانه‌زنی داشت (شکل ۱-b).



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف شوری و پیش‌تیمار باکتریایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذور گندم رقم کویر: (a) سرعت جوانه‌زنی و (b) درصد جوانه‌زنی. تیمارها شامل: شاهد (بدون تلقیح باکتری و بدون تنش شوری)، تلقیح منفرد با باکتری‌های *Azotobacter chroococcum* Strain 5 (Az)، *Azospirillum brasilense* Strain OF (As) و *Pseudomonas fluorescens* Strain 169 (Ps)، و تیمارهای ترکیبی دوتایی (As+Az، As+Ps، Az+Ps) و سه‌تایی(Az+As+Ps). سطوح شوری اعمال شده شامل: شاهد (بدون شوری، ۰ دسی‌زیمنس بر متر)، شوری متوسط (۶ دسی‌زیمنس بر متر) و شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر). حروف کوچک متفاوت بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

نتایج نشان‌دهنده تأثیر معنادار و مثبت تلقیح با PGPRبر درصد و سرعت جوانه‌زنی گندم رقم کویر در شرایط تنش شوری است. تیمارهای ترکیبی مانند Az+As+Psو As+Az بیشترین تأثیر را در بهبود جوانه‌زنی در تمامی سطوح شوری داشتند، که می‌تواند به اثرات هم‌افزایی این باکتری‌ها در افزایش دسترسی به مواد مغذی، تولید هورمون‌های گیاهی (مانند اکسین) و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از شوری نسبت داده شود (Egamberdiyeva, 2007). مکانیزم‌های احتمالی دخیل می‌تواند شامل افزایش حلالیت فسفر توسط *P. fluorescens* Strain 169 و تثبیت نیتروژن توسط *A. brasilense* Strain OF و *A. chroococcum* Strain 5 است که موجب تقویت سیستم ریشه و افزایش قابلیت جذب آب و مواد معدنی می‌شود (Bashan et al., 2014). در شرایط شوری بالا (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر)، کاهش شدید درصد و سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد، ناشی از اثرات مخرب تجمع یون‌های نمکی بر مکانیسم‌های حیاتی بذر است (Zhu, 2001). در این شرایط، PGPRها به‌واسطه کاهش سمیت یونی، بهبود تعادل اسمزی و تحریک تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، توانستند عملکرد جوانه‌زنی را بهبود بخشند (Mollestad et al., 2017). تحقیقات مشابه نیز نقش مثبت PGPR در شرایط شوری را تأیید کرده‌اند (Hassan et al., 2017)؛ برای مثال، مطالعه‌ای توسط Waghunde و همکاران (2020) نشان

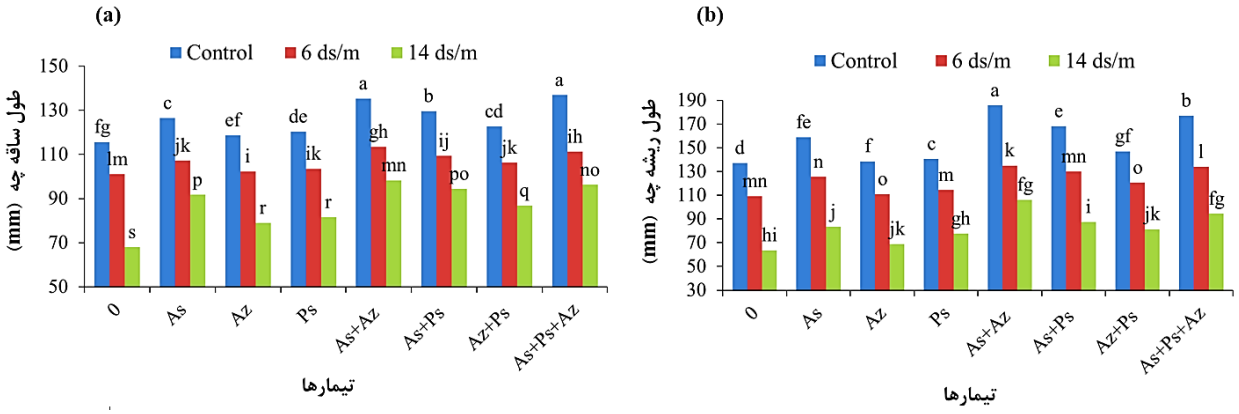
داد که تلقیح با *سودوموناس* در گندم باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و کاهش اثرات منفی تجمع یون سدیم و کلر می‌شود.

طول ساقه‌چه

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که طول ساقه‌چه به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثرات اصلی تنش شوری ($p<0.01$) و تلقیح باکتریایی ($p<0.01$) و همچنین اثر متقابل این دو ($p<0.05$) قرار گرفت. در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، طول ساقه‌چه در تیمار شاهد بدون تلقیح ۱۱۰ میلی‌متر بود. تلقیح با باکتری‌های *A. brasilense* Strain OF (As)، *A. chroococcum* Strain 5 (Az) و *P. fluorescens* Strain 169(Ps) به ترتیب طول ساقه‌چه را به ۱۳۸، ۱۴۰ و ۱۳۰ میلی‌متر افزایش داد. در این شرایط، تیمار ترکیبی سه گانه (Az+As+Ps) با ۱۵۹ میلی‌متر، بیشترین طول ساقه‌چه را نشان داد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت و به ویژه هم‌افزایی این ترکیب باکتریایی در بهبود رشد ساقه‌چه در شرایط بهینه است. با افزایش شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، طول ساقه‌چه در تیمار شاهد به ۱۰۴ میلی‌متر کاهش یافت. در این سطح شوری، تلقیح با As بیشترین تأثیر را در بین تیمارهای تک باکتریایی داشت و طول ساقه‌چه را به ۱۴۲ میلی‌متر رساند، در حالی که تیمار سه گانه Az+As+Ps نیز عملکرد مشابهی (۱۴۱ میلی‌متر) نشان داد. سایر تیمارهای ترکیبی نیز طول ساقه‌چه‌ای در محدوده ۱۲۴ تا ۱۲۸ میلی‌متر ایجاد کردند. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، تأثیر بازدارنده شوری بر رشد ساقه‌چه مشهودتر بود و طول ساقه‌چه در تیمار شاهد به ۷۹ میلی‌متر کاهش یافت. با این وجود، تلقیح با باکتری‌ها، به ویژه تیمارهای ترکیبی As+Az، Az+Ps و Az+As+Ps ، توانست طول ساقه‌چه را تا ۱۰۳ میلی‌متر افزایش دهد و اثرات منفی شوری را تا حدی جبران کند. تلقیح با باکتری‌های منفردAs ، Az و Ps نیز در این سطح شوری به ترتیب طول ساقه‌چه را به ۹۷، ۹۴ و ۹۶ میلی‌متر افزایش دادند (شکل ۲-a).

طول ریشه‌چه

مطابق با نتایج جدول ۲، اثر تنش شوری، تیمار باکتریایی و اثر متقابل آن‌ها بر طول ریشه‌چه در سطح معنی داری ($p<0.01$) قرار داشت. در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، طول ریشه‌چه در تیمار شاهد بدون تلقیح ۱۳۷ میلی‌متر بود. در این شرایط، تلقیح با باکتری‌های *A. brasilense* Strain OF (As)، *A. chroococcum* Strain 5 (Az) و *P. fluorescens* Strain 169(Ps) به ترتیب طول ریشه‌چه را به ۱۵۹، ۱۳۹ و ۱۴۱ میلی‌متر افزایش دادند. تیمار ترکیبی As+Az با ۱۸۶ میلی‌متر، بیشترین طول ریشه‌چه را در شرایط بدون تنش شوری نشان داد که حاکی از اثر مثبت و هم‌افزایی این دو باکتری است. با افزایش سطح شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، طول ریشه‌چه در تیمار شاهد به ۱۰۹ میلی‌متر کاهش یافت. در این سطح شوری نیز تیمار As+Az با طول ریشه‌چه ۱۳۵ میلی‌متر، بیشترین تأثیر را در افزایش طول ریشه‌چه نشان داد، اگرچه تلقیح با As به تنهایی نیز تأثیر قابل توجهی داشت و طول ریشه‌چه را به ۱۲۵ میلی‌متر رساند. سایر تیمارهای ترکیبی نیز طول ریشه‌چه‌ای در محدوده ۱۲۱ تا ۱۳۴ میلی‌متر ایجاد کردند. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، کاهش طول ریشه‌چه در تیمار شاهد به ۶۴ میلی‌متر به وضوح مشاهده شد. با این وجود، تیمار ترکیبی As+Az همچنان با ۱۰۶ میلی‌متر، بیشترین تأثیر را در افزایش طول ریشه‌چه در این شرایط سخت نشان داد و توانست اثرات منفی شوری را تا حدی جبران کند. تلقیح با باکتری‌های منفردAs ، Azو Ps نیز در این سطح شوری به ترتیب طول ریشه‌چه را به ۸۳، ۶۹ و ۷۸ میلی‌متر افزایش دادند. این نتایج نشان می‌دهند که پیش‌تیمار بذر با باکتری‌ها، به ویژه تیمار ترکیبیAs+Az ، می‌تواند تا حدی اثرات منفی شوری بر طول ریشه‌چه بذور گندم کویر را کاهش دهد، اما میزان این تأثیر وابسته به شدت شوری است (شکل ۲-b).



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف شوری و پیش‌تیمار باکتریایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذور گندم رقم کویر: (a) طول ساقه‌چه و (b) طول ریشه‌چه. تیمارها شامل: شاهد (بدون تلقیح باکتری و بدون تنش شوری)، تلقیح منفرد با باکتری‌های *Azotobacter chroococcum* Strain 5 (Az)، *Azospirillum brasilense* Strain OF (As) و *Pseudomonas fluorescens* Strain 169 (Ps)، و تیمارهای ترکیبی دوتایی (As+Az، As+Ps، Az+Ps) و سه‌تایی(Az+As+Ps). سطوح شوری اعمال شده شامل: شاهد (بدون شوری، ۰ دسی‌زیمنس بر متر)، شوری متوسط (۶ دسی‌زیمنس بر متر) و شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر). حروف کوچک متفاوت بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج نشان می‌دهد که تلقیح با PGPR تأثیر مثبتی بر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه گندم رقم کویر در شرایط شوری دارد. تیمارهای ترکیبی، به ویژه As+Az و Az+As+Ps، بیشترین تأثیر را در افزایش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه نشان دادند. این اثرات را می‌توان به مکانیزم‌های هم‌افزایی میانPGPR ها نسبت داد که شامل تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، بهبود جذب مواد مغذی و تقویت مقاومت سیستمیک گیاه می‌شود (Saghafi et al., 2014). به طور خاص *A. brasilense* نقش کلیدی در بهبود رشد طولی ریشه از طریق ترشح اکسین دارد که باعث تحریک تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌های ریشه می‌شود (Ha-Tran et al., 2021). در شرایط شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر)، کاهش رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه در تیمار شاهد به دلیل اثرات بازدارنده تجمع نمک‌ها بر تعادل اسمزی، جذب آب، و فعالیت‌های آنزیمی قابل انتظار بود. با این حال، PGPRها، به ویژه ترکیبAs+Az، با کاهش سمیت یونی، احتمالاً با بهبود دسترسی گیاه به آب و مواد مغذی، توانستند اثرات منفی شوری را جبران کنند (Nawaz et al., 2020). پژوهش مشابهی توسط Desoky و همکاران (2020) تأیید کرده است کهPGPR ها می‌توانند رشد ریشه و ساقه‌چه را در شرایط شوری با کاهش آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو بهبود بخشند. تفاوت در عملکرد تیمارهای مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در مکانیزم‌های تخصصی هر باکتری باشد؛ برای مثال، *P. fluorescens* Strain 169 احتمالاً با تولید سیدروفورها باعث افزایش دسترسی گیاه به آهن شده و در رشد ساقه‌چه مؤثر واقع شده است (Egamberdieva et al., 2015)، در حالی که *آزوسپیریلوم* از طریق تولید اکسین و افزایش تعادل هورمونی رشد ریشه را بهبود می‌بخشد (Gureeva and Gureev, 2023; Degon et al., 2023).

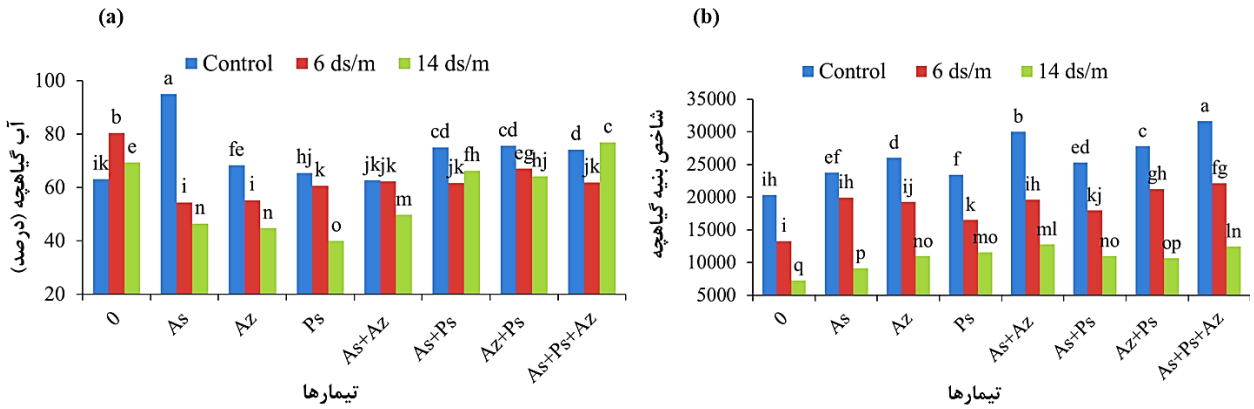
درصد آب گیاهچه

بررسی نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) مشخص نمود که درصد آب گیاهچه به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثرات اصلی شوری ($p<0.01$) و باکتری ($p<0.01$) و همچنین اثر متقابل آن‌ها ($p<0.05$) قرار دارد. در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، درصد آب گیاهچه در تیمار شاهد بدون تلقیح ۶۳/۱۰ درصد بود. در این شرایط، تلقیح با *A. brasilense* Strain OF (As) به طور چشمگیری این درصد را به ۹۵/۰۲ افزایش داد، در حالی که سایر تیمارهای تک و ترکیبی نیز (به جز As+Az که کاهشی

اندک داشت)، افزایش درصد آب گیاهچه را نسبت به شاهد نشان دادند. با افزایش شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، درصد آب گیاهچه در تیمار شاهد به ۸۰/۴ درصد افزایش یافت، اما نکته قابل توجه این است که تمامی تیمارهای تلقیح شده در این سطح شوری، کاهش درصد آب گیاهچه را نسبت به شاهد همان سطح شوری نشان دادند، هرچند تیمار ترکیبی Az+Ps با ۶۶/۹۹ درصد، کمترین کاهش را در بین تیمارهای تلقیح شده داشت. این نشان می‌دهد که در این سطح شوری، اثر منفی خود شوری بر میزان آب گیاهچه غالب بوده و تلقیح نتوانسته به طور کامل آن را جبران کند. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، کاهش درصد آب گیاهچه در تیمار شاهد به ۶۹/۳۶ درصد مشهودتر بود. در این شرایط، تلقیح با باکتری‌های منفردAs، Az و Ps کاهش شدیدتری را در درصد آب گیاهچه نشان دادند، در حالی که تیمار ترکیبی Az+As+Psبا ۷۶/۹۲ درصد، نه تنها از سایر تیمارهای تلقیح شده، بلکه از تیمار شاهد همان سطح شوری نیز فراتر رفت و بیشترین درصد آب گیاهچه را در این شرایط سخت فراهم کرد (شکل ۳-a).

شاخص بنیه گیاهچه

با استناد به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر معنی‌دار تنش شوری، تلقیح باکتریایی و اثر متقابل آن‌ها بر شاخص بنیه گیاهچه در سطح احتمال ۱٪ تایید شد ($p<0.01$). در شرایط شاهد (بدون تنش شوری)، شاخص بنیه گیاهچه در تیمار شاهد بدون تلقیح ۲۰۳۴۲ بود. در این شرایط، تمامی تیمارهای باکتریایی، چه تک و چه ترکیبی، باعث افزایش شاخص بنیه گیاهچه نسبت به شاهد شدند و تیمار ترکیبی سه گانه (Az+As+Ps) با ۳۱۶۷۰/۶ بیشترین تأثیر را نشان داد. با افزایش سطح شوری به ۶ دسی‌زیمنس بر متر، شاخص بنیه گیاهچه در تیمار شاهد به ۱۳۳۱۲ کاهش یافت. با این وجود، تمامی تیمارهای باکتریایی همچنان باعث افزایش شاخص بنیه گیاهچه نسبت به شاهد همان سطح شوری شدند و تیمار ترکیبی سه گانه (Az+As+Ps)با شاخص ۲۲۱۴۴ بیشترین تأثیر را در این سطح شوری نشان داد. در شرایط تنش شوری شدید با غلظت ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر، کاهش شاخص بنیه گیاهچه در تیمار شاهد به ۷۲۹۶ مشهودتر بود. با این حال، تمامی تیمارهای باکتریایی در این شرایط نیز باعث افزایش شاخص بنیه گیاهچه نسبت به شاهد همان سطح شوری شدند و تیمار ترکیبی As+Az با ۱۲۷۵۷/۳ بیشترین تأثیر را نشان داد (شکل ۳-b).



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف شوری و پیش‌تیمار باکتریایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذور گندم رقم کویر: (a) درصد آب گیاهچه و (b) و شاخص بینه گیاهچه. تیمارها شامل: شاهد (بدون تلقیح باکتری و بدون تنش شوری)، تلقیح منفرد با باکتری‌های Azotobacter chroococcum Strain 5 (Az)، Azospirillum brasilense Strain OF (As) و Pseudomonas fluorescens Strain 169 (Ps)، و تیمارهای ترکیبی دوتایی (As+Az، As+Ps، Az+Ps) و سه‌تایی(Az+As+Ps). سطوح شوری اعمال شده شامل: شاهد (بدون شوری، ۰ دسی‌زیمنس بر متر)، شوری متوسط (۶ دسی‌زیمنس بر متر) و شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر). حروف کوچک متفاوت بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد.

در شرایط تنش شوری، کاهش درصد آب گیاهچه در تیمار شاهد نشان‌دهنده اثر منفی تجمع یون‌های نمکی بر تعادل اسمزی و کاهش ظرفیت حفظ آب در گیاه است (Zhou et al., 2024). این اثر مخرب شوری می‌تواند به تخریب ساختار غشای سلولی، کاهش جذب آب و کاهش فعالیت آنزیم‌های حیاتی نسبت داده شود. با این حال، تلقیح باPGPRها، به‌ویژه در تیمار ترکیبیAz+As+Ps، توانستند درصد آب گیاهچه را حتی در سطوح شوری شدید به‌طور معناداری افزایش دهد. این بهبود را می‌توان به مکانیسم‌های چندگانهPGPR ها نسبت داد. از جمله این مکانیسم‌ها، تحریک تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین است که رشد و توسعه ریشه را بهبود می‌بخشد و جذب آب و مواد مغذی را افزایش می‌دهد (Degon et al., 2023). همچنین، PGPRها با تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS[۶])به حفظ رطوبت خاک کمک کرده و از تبخیر و هدررفت آب جلوگیری می‌کنند (Nivetha et al., 2021). افزون بر این، کاهش سمیت یونی و تنظیم تعادل یونی در ناحیه ریشه توسطPGPR ها باعث بهبود تعادل اسمزی گیاه می‌شود (Zhou et al., 2024). مطالعاتی مانند Arora و همکاران (2020) نشان داده‌اند کهPGPR ها با کاهش پتانسیل اسمزی و افزایش کارایی جذب مواد مغذی، ظرفیت حفظ آب گیاه را در شرایط شوری بهبود می‌بخشند. این مکانیسم‌ها به‌ویژه در تیمار ترکیبی Az+As+Ps به‌دلیل هم‌افزایی بین *P. fluorescens* Strain 169، *A. brasilense* Strain OF و *A. chroococcum* Strain 5، عملکرد مؤثرتری داشته است. مطالعات مشابه دیگری نیز این یافته‌ها را تأیید کرده‌اند. به‌عنوان مثال، Bashan و همکاران (2014) نشان دادند که تلقیح باPGPRها می‌تواند تعادل هورمونی و فیزیولوژیکی گیاه را تنظیم کند و مقاومت آن را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش دهد. همچنین Nivetha و همکاران (2021) گزارش کردند که PGPRها با تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه، آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش داده و به حفظ ظرفیت نگهداری آب در سلول‌ها کمک می‌کنند.

شاخص بنیه گیاهچه که ترکیبی از درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است، در شرایط بدون تنش شوری با تلقیح تیمارهای باکتریایی، به ویژه ترکیبAz+As+Ps ، افزایش چشمگیری نشان داد. این موضوع نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی این ترکیب در بهبود پارامترهای رشدی است. تحت تنش شوری، کاهش شاخص بنیه در تیمار شاهد ناشی از اختلال در جذب آب و مواد معدنی و آسیب‌های اکسیداتیو بود. اماPGPR با کاهش تنش اکسیداتیو از طریق مکانیزم‌هایی مانند تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز توانستند این کاهش را جبران کنند (Neshat et al., 2022). در شوری شدید (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر)، تیمار As+Az با بالاترین شاخص بنیه، احتمالاً به دلیل ترکیب اثرات *A. brasilense* Strain OF در بهبود رشد ریشه و *A. chroococcum* Strain 5 در افزایش جذب مواد مغذی، بیشترین تأثیر را داشت. پژوهش مشابهی توسط Kohler و همکاران (2019) نشان داد کهPGPR ها می‌توانند با بهبود جذب پتاسیم و کاهش تجمع یون‌های سمی مانند سدیم، مقاومت گیاه به شوری را افزایش دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری اثرات منفی قابل توجهی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گندم کویر دارد و به کاهش شاخص‌هایی مانند درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه منجر می‌شود. با این حال، پیش‌تیمار بذر با PGPR، به‌ویژه تیمارهای ترکیبی، توانست به طور مؤثری اثرات منفی شوری را کاهش داده و پارامترهای مرتبط با استقرار و رشد گیاهچه را بهبود بخشد. تأثیر این باکتری‌ها در سطوح مختلف شوری متفاوت بود، به‌طوری‌که کنسرسیوم بهینه باکتریایی بر اساس شدت تنش

[۶] Extracellular polymeric substances

تغییر کرد. به‌طور کلی، کنسرسیوم‌های سه‌گانه (مانند Az+As+Psدر شرایط بدون تنش و شوری ملایم) و کنسرسیوم‌های دوگانه (مانند As+Az یا As+Ps در شوری شدید) عملکرد بهتری در بهبود رشد گیاهچه نشان دادند که نشان می‌دهد کارایی PGPR به شدت به سطح شوری وابسته است و نمی‌توان یک ترکیب باکتریایی ثابت را به عنوان بهترین گزینه برای تمامی شرایط معرفی کرد. بنابراین، انتخاب ترکیب مناسب باید با در نظر گرفتن سطح شوری خاک و شرایط محیطی صورت گیرد. نکته مهم دیگر این است که رقم گندم کویر به عنوان یک رقم مقاوم به شوری شناخته می‌شود، اما نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند مقاومت ذاتی این رقم را نیز به طور چشمگیری افزایش دهد. این یافته نشان می‌دهد که حتی در ارقام مقاوم، PGPRها می‌توانند به عنوان یک ابزار مؤثر در افزایش تحمل به تنش شوری و بهبود عملکرد گیاه عمل کنند. این پژوهش همچنین بیانگر آن است که استفاده از PGPRها می‌تواند به کشاورزان در مناطق شور کمک کند تا با کاهش اثرات منفی شوری، استقرار و رشد اولیه گیاهچه ارقام مختلف گندم را بهبود بخشیده و عملکرد نهایی محصول را افزایش دهند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه بخش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب انجام گردیده است که بدین وسیله از کارشناسان محترم این مجموعه سپاسگزاری می‌شود.

Refrences

1. Arora, N.K., Fatima, T., Mishra, J., Mishra, I., Verma, S., Verma, R., Verma, M., Bhattacharya, A., Verma, P., Mishra, P. and Bharti, C., 2020. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. Journal of Advanced Research, 26, pp.69-82. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.003
2. Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. and Smith, D.L., 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science, 9, p.1473. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473
3. Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant and Soil, 378(1), 1-33. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x
4. Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W., & Nonogaki, H. 2013. Seeds: Physiology of development, germination, and dormancy (3rd ed.). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4
5. Degon Z, Dixon S, Rahmatallah Y, Galloway M, Gulutzo S, Price H, Cook J, Glazko G, and Mukherjee A. 2023. Azospirillum brasilense Strain OF improves rice growth under salt stress by regulating the expression of key genes involved in salt stress response, abscisic acid signaling, and nutrient transport, among others. Frontiers in agronomy. 4;5:1216503. https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1216503
6. Desoky, E.S.M., Saad, A.M., El-Saadony, M.T., Merwad, A.R.M. and Rady, M.M., 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria: Potential improvement in antioxidant defense system and suppression of oxidative stress for alleviating salinity stress in Triticum aestivum (L.) plants. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 30, p.101878. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101878
7. Dolati, S., Elmāyi, M., Barani Motlagh, M., and Nouri Radduji, A. M. 2012. Isolation and Identification of Azotobacter Isolates and Measurement of their Plant Growth Promoting Factors. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 2(2), 121-135.
8. Egamberdieva, D., Jabborova, D. and Hashem, A., 2015. Pseudomonas induces salinity tolerance in cotton (Gossypium hirsutum) and resistance to Fusarium root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. Saudi journal of biological sciences, 22(6), pp.773-779. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.019
9. Fallah Nosratabad, A. and Khoshru, B., 2024. Potentials and challenges of biofertilizers in sustainable agriculture. Journal of Sol Biology, 12(1), pp.19-63. (In Persian), https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366090.265.
10. FAO, 2021. The State of Food and Agriculture 2021. Making agrifood systems more resilient to shocks and stresses. Rome.
11. Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica. https://doi.org/10.6064/2012/963401
12. Gureeva, M.V. and Gureev, A.P., 2023. Molecular mechanisms determining the role of bacteria from the genus Azospirillum in plant adaptation to damaging environmental factors. International Journal of Molecular Sciences, 24(11), p.9122. https://doi.org/10.3390/ijms24119122
13. Ha-Tran, D.M., Nguyen, T.T.M., Hung, S.H., Huang, E. and Huang, C.C., 2021. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. International Journal of Molecular Sciences, 22(6), p.3154. https://doi.org/10.3390/ijms22063154
14. Hauggaard-Nielsen, H., and Jensen, E. S. 2001. A review of the effect of legumes in cropping systems on seedling emergence and plant growth. Field Crops Research,

71(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00128-0.

15. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A. and Faridian, L., 2025a. Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: mechanisms, challenges, and future directions. Journal of Sol Biology, 12(2), pp.279-313. (In Persian), 10.22092/sbj.2025.368425.277.
16. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Mahjenabadi, V.A.J., Knežević, M., Hinojosa, A.C., Fadiji, A.E., Enagbonma, B.J., Qaderi, S., Patel, M., Baktash, E.M. and Dawood, M.F.A.M., 2025b. Multidimensional role of Pseudomonas: from biofertilizers to bioremediation and soil ecology to sustainable agriculture. Journal of Plant Nutrition, 48(6), pp.1016-1042. https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2416078
17. Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E.M., Uniyal, N., Mahakur, B., Mohapatra, P.K.D., Panneerselvam, P., Boutaj, H., Alizadeh, M. and Cely, M.V.T., 2020. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. Journal of Plant Nutrition, 43(20), pp.3062-3092. https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1799004
18. Khosravi, H., Khoshru, B., Nosratabad, A.F. and Mitra, D., 2024. Exploring the landscape of biofertilizers containing plant growth-promoting rhizobacteria in Iran: Progress and research prospects. Current Research in Microbial Sciences, p.100268. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100268
19. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. 2018. Brock Biology of Microorganisms (15th ed.). Pearson Education.
20. Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, 2(2), 176-177. https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x
21. Mokarian, K., Maali-Amiri, R., Peighambari, A., Tabatabai, S.M.T. and Daneshmand, F., 2022. Physiological responses and expression pattern of SOS genes of bread wheat to salt stress. Iranian Journal of Field Crop Science, 53(4), pp.275-289.
22. Mollestad, H. H., Andersen, J. M., & Fagerli, C. 2017. PGPR-induced improvement of plant growth under saline stress: A review of current literature. Soil Biology and Biochemistry, 111, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.002
23. Munns, R. and Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59, pp.651-681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
24. Nawaz, A., Shahbaz, M., Asadullah, Imran, A., Marghoob, M.U., Imtiaz, M. and Mubeen, F., 2020. Potential of salt tolerant PGPR in growth and yield augmentation of wheat (Triticum aestivum L.) under saline conditions. Frontiers in Microbiology, 11, p.2019. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02019
25. Neshat, M., Abbasi, A., Hosseinzadeh, A., Sarikhani, M. R., Dadashi Chavan, D., & Rasoulnia, A. 2022. Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. Physiology and Molecular Biology of Plants, 28(2), 347-361. https://doi.org/10.1007/s12298-022-01128-0
26. Nivetha, N., Lavanya, A.K., Vikram, K.V., Asha, A.D., Sruthi, K.S., Bandeppa, S., Annapurna, K. and Paul, S., 2021. PGPR-mediated regulation of antioxidants: Prospects for abiotic stress management in plants. Antioxidants in plant-microbe interaction, pp.471-497. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1350-0_23
27. Ravari, S.Z., Dehghani, H. and Naghavi, H., 2017. Study of genetic control of salinity tolerance in bread wheat cv. Kavir-using generation mean analysis. Crop Breeding Journal, 7(2), pp.57-66.
28. Rengasamy, P., 2016. Soil processes affecting salt accumulation in irrigated soils. Agricultural Water Management, 163, pp.9-17.
29. Richards, L. A. 1954. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils.

United States Department of Agriculture Handbook 60. Washington, D.C.: USDA. https://doi.org/10.1097/00010694-195408000-00012

30. Rouphael, Y. and Colla, G., 2020. Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: from experimental data to practical field application. Agronomy, 10(6), p.848. https://doi.org/10.3390/agronomy10101461
31. Saghafi, K., Ahmadi, J., Asgharzadeh, A., & Esmaeili-Zadeh, A. 2013. Investigating the effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth indices of wheat under salinity stress. Soil Biology Journal, 1(1), 47-59. https://doi.org/10.22092/sbj.2013.120920.
32. Seleiman, M.F., Aslam, M.T., Alhammad, B.A., Hassan, M.U., Maqbool, R., Chattha, M.U., Khan, I., Gitari, H.I., Uslu, O.S., Roy, R. and Battaglia, M.L., 2022. Salinity stress in wheat: effects, mechanisms and management strategies. Phyton (0031-9457), 91(4). https://doi.org/10.32604/phyton.2022.017365
33. Shaffique, S., Imran, M., Kang, S.M., Khan, M.A., Asaf, S., Kim, W.C. and Lee, I.J., 2023. Seed Bio-priming of wheat with a novel bacterial strain to modulate drought stress in Daegu, South Korea. Frontiers in Plant Science, 14, p.1118941. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118941
34. Shahabi, M., Panjeke, N., Asadi Rahmani, H., and Salari, M. 2019. Isolation and Identification of Azospirillum Bacteria from Wheat and Maize Rhizosphere and Determination of Some of Their Plant Growth Promoting Traits. Journal of Soil Biology, 7(2), 135-149.
35. Shahsavand Hassani, H., Roudbari, Z., Mohammadi-Nejad, G. and Esmaeilzadeh-Moghaddam, M., 2021. Study the morphophysiological responses of promising Iranian new and natural trans chromsomal secondary tritipyrum cereal lines to Salinity conditions in Iran. Iranian Journal of Field Crop Science, 52(1), pp.75-86.
36. Venâncio, C., Pereira, R. and Lopes, I., 2020. The influence of salinization on seed germination and plant growth under mono and polyculture. Environmental Pollution, 260, p.113993. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113993
37. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255(1), pp.571-586. https://doi.org/10.1023/A:1026037216893
38. Waghunde, R.R. and Sabalpara, A.N., 2021. Impact of pseudomonas spp. on plant growth, lytic enzymes and secondary metabolites production. Frontiers in Agronomy, 3, p.752196. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.752196
39. Xiong, M., Xu, J., Zhou, Z., Peng, B., Shen, Y., Shen, H., Xu, X., Li, C., Deng, L. and Feng, G., 2024. Salinity inhibits seed germination and embryo growth by reducing starch mobilization efficiency in barley. Plant Direct, 8(2), p.e564. https://doi.org/10.1002/pld3.564
40. Zhou, H., Shi, H., Yang, Y., Feng, X., Chen, X., Xiao, F., Lin, H. and Guo, Y., 2024. Insights into plant salt stress signaling and tolerance. Journal of Genetics and Genomics, 51(1), pp.16-34.https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.08.007
41. Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. Trends in Plant Science, 6(2), 66-71. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0

19-39/Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth

Esmaeil Karimi*[1], Sima Aslyazdani[2], Ezzatallah Esfandyari[3] and Seyed Bahman Mousavi[4]

1- Assistant Professor,Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh.Iran. sm_ka80@yahoo.com

2- M.Sc., Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh. Iran. s.aslyazdani2020@gmail.com

3- Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh. Iran. esfand1977@yahoo.com

4- Associate Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh. Iran. b_mosavi2000@yahoo.com

Article Info

Received: 2024-12-21

Accepted: 2025-06-28

Keywords: *Pantoa* bacterium, *Pseudomonas* bacterium, Root morphology, Harvest index, Crystal violet, 1000 seed weight

Corresponding author's email: sm_ka80@yahoo.com

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368020.273

Extended Abstract

Background and Objectives: Phosphorus bioavailability in soil is a key issue in plant nutrition, especially in calcareous and acidic soils, where it rapidly forms insoluble compounds. Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) have been used as biofertilizers to release available phosphorus from these sources. Barvar 2, a phosphate biofertilizer widely used in the country, contains two strains of phosphate-dissolving bacteria: Pantoea agglomerans P25 and Pseudomonas putida P13. These bacteria release organic acids, which lower soil pH, chelate minerals, and affect ion exchange reactions to mobilize phosphorus. However, the success of these biofertilizers depends on the bacteria's ability to compete with native soil bacteria and colonize plant roots effectively. This aspect of the biofertilizer's functionality is a concern and requires further study. One key factor influencing root colonization is the ability of bacteria to form biofilms in the rhizosphere. Biofilms enhance bacterial survival and colonization by providing protection against environmental stressors and improving bacterial persistence in the soil. Studies suggest that bacteria capable of forming biofilms are more efficient at colonizing roots and promoting plant growth. Biofilm formation is a desirable trait for growth-promoting bacteria, and its effectiveness varies across different bacterial strains. These bacteria typically form biofilms that help retain moisture and improve their overall survival compared to planktonic forms. Given the importance of phosphorus for cereal production, especially barley, understanding how biofilm formation by PSB bacteria affects plant growth under different phosphorus treatments in calcareous soils is crucial. This study aims to explore the ability of Barvar 2 bacteria to form biofilms and their impact on barley growth when used as a biofertilizer in varying soil conditions.

Materials and Methods: Barvar 2 biofertilizer package prepred from market. Barley seed var. Ansar was obtained from the Dryland Agricultural Research Institute. Barley seeds were disinfected with bleach and alcohol and grown under completely sterile conditions until the two-leaf stage (Zadoks Stage 12) in a minimum salt solution, for extracting root exudates. The biofilm formation by the bacterial components of the biofertilizer in the root exudates was assessed using the crystal violet staining method. In this experiment, TSB medium at a concentration of 0.5 X was used as the control. The ability to dissolve phosphate from a phosphate rock source was performed using liquid Sperber medium over a period of 7 days. To investigate the correlation between biofilm formation ability and barley growth, a pot experiment was conducted in a factorial within a completely randomized design. The treatments were including with and without biofertilizer bacteria, and using powdered phosphate rock at three levels: zero, 6 and, 12 mg/kg of soil. The research was conducted in greenhouse of the Faculty of Agriculture at University of

Maragheh. At the end of the experiment, Yield and yield components, including straw weight, number of grains, plant height, leaf weight, biological yield, harvest index, 1000 seed weight, spike weight, and seed weight, were measured. The data obtained were analyzed using SAS software, and mean comparisons were made at a 5% probability level of Duncan's test.

Results: Our results showed that biofilm-forming ability of the bacteria separately in the barley root exudate medium was higher than in the TSB medium. However, this effect was not observed when the two bacteria were mixed. The biofilm-forming ability of P. agglomerans was greater than P. putida, and the bacterial mixture affected biofilm formation. Inoculation of the Sperber medium containing phosphate rock with P. putida increased the EC of the medium to (110µS/cm), whereas inoculation with P. agglomerans increased the EC to (528µS/cm), compared to the control. However, inoculation of the Sperber medium containing phosphate rock with P. putida caused a 2.47-unit drop in pH, and a 3.86-unit drop was observed with P. agglomerans, compared to the control. Linear relationships between the traits of grain weight in the pot, thousand-grain weight, and harvest index with the biofilm formation index by the components of the biofertilizer showed a significant correlation with determination coefficients (R^2) of 74%, 97%, and 97%, respectively.

Conclusion: This study sheds light on the importance of bacterial biofilm formation in the context of biofertilizers, particularly when the bacteria are involved in nutrient solubilization from sources like phosphate rocks. The significant correlations (R^2 of 74% for grain weight, 97% for thousand-grain weight, and 97% for harvest index) with the biofilm formation index suggest that biofilm formation by biofertilizer bacteria is closely related to crop yield parameters. This indicates that assessing biofilm formation could serve as an important criterion in evaluating the efficacy of biofertilizers. It also points to the potential for improving crop yield through the strategic use of biofilm-forming bacteria in agricultural systems.

Cite this article:Karimi, E., Aslyazdani, S., Ezzatallah, E., Mousavi, S.B., 2025. Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth. Journal of Soil Biology, 13 (1),18-38.

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368020.273
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ و اثر آنها همراه با کاربرد خاک فسفات بر رشد جو

اسماعیل کریمی[۱*]، سیما اصل یزدانی[۲]، عزت‌اله اسفندیاری[۳] و سید بهمن موسوی[۴]

۱- استادیار، بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. sm_ka80@yahoo.com

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. s.aslyazdani2020@gmail.com

۳- استاد، فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. esfand1977@yahoo.com

۴- دانشیار، پیدایش، رده‌بندی و ارزیابی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. b_mosavi2000@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۷

چکیده

تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر گیاهان زراعی توسط باکتری‌های حل کننده فسفات نامحلول خاک می‌تواند با بهبود کلنیزاسیون ریشه و افزایش حلالیت فسفر موجب افزایش کارآمدی آنها شود. کود زیستی فسفات بارور۲ حاوی باکتری‌های *Pesudomonas putida* و *Pantoa agglomerans* می‌باشد، که با ترشح اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز باعث تجزیه ترکیبات فسفره نامحلول در خاک شده و امکان جذب این عنصر را برای گیاهان فراهم می‌کند. تاکنون اطلاعاتی در خصوص قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های این کود گزارش نشده است. برای بررسی این موضوع باکتری‌های این کود جداسازی شده و تشکیل بیوفیلم توسط آن‌ها روی سطح پلاستیکی و در حضور ترشحات ریشه جو ارزیابی شد. سپس توانایی انحلال فسفر این باکتری‌ها با کاربرد پودر سنگ فسفات در محیط کشت اسپربر به‌صورت جداگانه و کنسرسیوم دو باکتری اندازه‌گیری شد. در ادامه آزمایشی گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار با تلقیح جو رقم انصار و ۳ سطح فسفر از منبع خاک فسفات (صفر، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) طراحی شد و اجزای عملکرد جو در این تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج دادند که باکتری‌های این کود توانستند در حضور ترشحات ریشه گیاه جو بیوفیلم تشکیل دهند. شاخص بیوفیلم در باکتری‌ها به‌صورت فردی و در حالت کنسرسیوم متفاوت بود و بیشترین میزان آن به مقدار ۰/۸۴ در باکتری *P. agglomerans* مشاهده گردید. برقراری رابطه رگرسیونی میان صفات اجزای عملکرد ارزیابی شده، با شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها نشان داد که شاخص برداشت با ضریب تبیین ۰/۹۷، وزن هزار دانه با شاخص تبیین ۰/۹۷و وزن دانه در گلدان با ضریب تبیین ۰/۷۴ بهترین ارتباط خطی و مستقیم را با آن دارند. بنابراین به‌نظر می‌رسد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند به عنوان یک استراتژی مؤثر در بهبود کارایی کودهای زیستی و افزایش جذب فسفر توسط گیاه جو و احتمالا سایر گیاهان زراعی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه: باکتری *پانتوآ*، باکتری *سودوموناس*، ریخت‌شناسی ریشه، شاخص برداشت، کریستال ویوله، وزن هزار دانه.

استناد: کریمی، الف.، اصل یزدانی، س.، اسفندیاری، ع.، موسوی، س.ب.، ۱۴۰۴. بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ و اثر آنها همراه با کاربرد خاک فسفات بر رشد جو. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱)۱۳، ۱۸-۳۸

مقدمه

فسفر یکی از مهمترین عناصر پرمصرف ضروری برای رشد گیاهان بوده و قابلیت دسترسی زیستی فسفر به‌عنوان یک عنصر پرمصرف در خاک‌های کشور یکی از چالش برانگیزترین موارد مهم در تغذیه گیاهان می‌باشد (Asadi et al., 2022). قابلیت دسترسی زیستی فسفر به شدت به pH خاک وابسته بوده و در خاک‌های اسیدی و آهکی به سرعت با ورود به ساختارهای نامحلول از دسترس گیاهان خارج می‌شود. این موضوع نه تنها فسفر خاک بلکه یکی از مهمترین مشکلات کاربرد کودهای حاوی عنصر فسفر را نیز در بر می‌گیرد. درحقیقت، فسفر محلول با کاتیون‌هایی مانند Ca^{2+} ، Mg^{2+}، Fe^{3+} و Al^{3+} یا کربنات کلسیم، اکسید آلومینیوم و اکسید آهن وارد واکنش شده و به سرعت به اشکال نامحلول رسوب می‌کند (Leytem and Westermann, 2003). با عنایت به آهکی بودن اغلب خاک‌های کشور تخمین زده می‌شود که بالغ بر ۸۰ درصد کودهای فسفر به شکل رسوب در آمده که موجب کاهش کارایی آنها می‌گردد. این مهم در حالی اتفاق می‌افتد که منابع تولید کودهای فسفری در کشور وارداتی بوده و سالیانه ارز زیادی از کشور خارج می‌شود (Rejali et al., 2014). تجربه سالیان اخیر در کشور نشان داده که تامین این عنصر با توجه به مسایل سیاسی، مشکلاتی را در بخش کشاورزی ایجاد نموده است و این مهم با توجه به منابع محدود ذخایر فسفات در جهان که طی ۵۰ تا ۱۰۰ سال آینده تمام خواهد شد (Kauwenbergh, 2010) دور نمای تاریکی را پیش روی کشور قرار داده است. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از پتانسیل‌های میکروبی خاک در این زمینه می‌تواند به عنوان یک راه حل اساسی مورد توجه قرار گیرد (Fallah Nosratabad and Khoshru, 2024). با تکیه بر این امر، کود زیستی بارور ۲ در کشور ایران به عنوان یک کود میکروبی جهت کمک به تغذیه گیاهان با استفاده از منابع نامحلول فسفر در خاک تولید و روانه بازار شده است. این کود حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات[۱] به‌نام‌های *Pesudomonas putida* P13 و *Pantoa agglomerans* P25 می‌باشد که قادر هستند با ترشح اسیدهای آلی و پی‌آمد آن کاهش pH خاک، کلاته نمودن و دخالت در واکنش‌های تبادلی، فسفات غیر قابل جذب را آزاد و در اختیار گیاه قرار دهند (Khan et al., 2020). از آنجایی‌که با توجه به افزایش چشمگیر قیمت کودهای شیمیایی فسفره این نوع کودها مورد توجه کشاورزان قرار گرفته است و در عین‌حال قابلیت رهاسازی فسفر توسط این باکتری‌ها به عوامل گوناگونی مانند نوع گیاه، رقم گیاه، میزان فسفر قابل دسترس خاک و سایر عوامل بستگی دارد (Rehman et al., 2020). انجام تحقیقات در خصوص بهینه‌سازی عوامل موثر بر تاثیر آن‌ها می‌تواند زمینه کاهش موثر مصرف کودهای شیمیایی را فراهم نماید (Tohidinia et al., 2014). توان رقابت باکتری‌های این کودها با جمعیت بومی ساکن خاک وکلنیزاسیون موفق ریشه گیاه توسط آن یکی از نقاط تاریک تلقیح گیاهان با این نوع کودها محسوب می‌شود که می تواند به شدت بر پاسخ گیاهان به کاربرد کود زیستی موثر باشد (Karimi et al., 2023). بنابراین این موضوع شایسته توجه بوده و بایستی مورد مطالعه قرار گیرد (Fallah, 2022). توانایی تشکیل بیوفیلم[۲] در ریزوسفر توسط باکتری ها یکی از ویژگی‌های مطلوبی است که بر طبق نتایج برخی از مطالعات انجام شده گمان می‌رود باکتری‌های مولد آن در امر کلنیزاسیون ریشه گیاهان موثرتر عمل نمایند (Beauregard et al., 2013). به عبارت دیگر احتمال می رود، کلنیزاسیون موفق ریشه گیاه و افزایش زنده‌مانی باکتری در مقابل شرایط نامساعد محیطی از جمله خواص منتج از تشکیل بیوفیلم باکتریایی باشد (Joshi et al., 2021) و بنابراین نتایج حاصل از تلقیح با آنها نیز بهتر خواهد بود (Habibi et al., 2022). تلقیح گیاه جو با باکتری *B. amyloliquifaciens* با تشکیل بیوفیلم در

[۱] Phosphate solubilizing bacteria (PSB)

[۲] Biofilm formation

ریزوسفر توانست موجب افزایش ۲۳ درصدی وزن خشک ریشه و ۴۳ درصد رشد ساقه را افزایش دهد (Kasim et al., 2016). در شرایط تنش کم‌آبی گزارش شده است که تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم *B. amyloliquefaciens* 54 توانسته است با بهبود محتوای رطوبت نسبی در برگ‌ها به افزایش عملکرد آن کمک نماید (Wang et al., 2019). یافته‌های کریمی و همکاران (Karimi et al, 2022) نشان داد که تلقیح چاودار با با باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم *Bacillus atrophaeus* توانست با ممانعت از ورود کادمیوم به گیاه موجب افزایش عملکرد آن در شرایط آلودگی کادمیم شود.

بیوفیلم‌ها ساختارهایی هستند که به سبب ماهیت پلی‌ساکاریدی که دارند علاوه بر اینکه باعث جذب رطوبت و عملکرد بهتر گیاه می‌شوند، در اثر تشکیل کمپلکس میان اگزوپلی‌ساکاریدهای موجود در ساختار بیوفیلم با یون‌های Al^{+3}، Cu^{+2}، Zn^{2+}، Fe^{+3}، Mg^{+2} و K^{+} میزان فسفر قابل دسترس در خاک افزایش پیدا می‌کند (Ochoa-Loza et al., 2001). بر این اساس گزارش شده است که باکتری-هایی با توان مطلوب در تشکیل بیوفیلم می‌توانند موجب افزایش ۱۵ برابری فسفر قابل جذب در خاک شوند (Seneviratne and Jayasinghearachchi, 2005). اگر چه تشکیل بیوفیلم توسط اغلب باکتری‌ها انجام می‌شود و زندگی بیوفیلمی نسبت به زندگی پلانکتونی (آزادزی) ارجحیت دارد. ولی با این حال قدرت تشکیل بیوفیلم در آن‌ها متفاوت بوده و متعاقب آن تاثیرات ناشی از کاربرد این نوع باکتری‌ها به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد تاثیرات متفاوتی را در پی خواهد داشت (Karimi et al., 2022). در گیاه برنج تلقیح شده با باکتری *Serratia marcescens* تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر توسط این باکتری یک راهکار موثر در حلالیت فسفر گزارش شده است (de Oliveira et al., 2024). همچنین مشخص شده که تشکیل بیوفیلم قوی توسط باکتری‌های رشته ای در اطراف هیف‌های مایکوریز *Rhizoglomus irregulare* (*Ri*) DAOM 197198 می‌تواند در مقایسه با باکتری‌های که قدرت چسبندگی و توانایی تشکیل بیوفیلم اندکی داشتند فسفر را به شکل موثرتری در خاک از منابع نامحلول آن آزاد نماید (Taktek et al., 2017) تولید غلات به ویژه جو اهمیتی حیاتی برای کشور داشته و برای تولید مطلوب نیازمند کاربرد کودهای فسفر می‌باشند. هیچگونه اطلاعاتی در خصوص توان تشکیل بیوفیلم یا کلنیزاسیون ریشه گیاه جو با باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ گزارش نشده است لذا با توجه به اهمیت تشکیل بیوفیلم به‌عنوان معیاری از توان کلنیزاسیون، هدف از این مطالعه در ابتدا بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ در برهمکنش با این گیاهان و سپس تاثیر تلقیح این باکتری‌ها بر رشد جو در شرایط مختلف تیمارهای کودی با خاک فسفات به عنوان غالب‌ترین منبع فسفر نامحلول در خاک‌های آهکی بود. همچنین انتظار می‌رود نتایج حاصل از این مطالعه بتواند در بهبود تولید سایر کودهای زیستی موثر باشد.

مواد و روشها

تهیه کود و جداسازی باکتری

کود زیستی فسفاته بارور۲ تازه تولید شده از بازار تهیه و باکتری‌های آن در آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه مراغه جداسازی شدند. بر طبق اطلاعات موجود در سایت اینترنتی تولیدکننده کود زیستی فسفاته بارور۲ حاوی $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۸}$ باکتری حل کننده فسفات در هر گرم از محصول است که با تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز در اطراف ریشه باعث آزاد شدن یون فسفات می‌شوند.

تهیه بذر جو و جمع‌آوری ترشحات ریشه

بذر جو رقم انصار از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه تحقیقاتی مراغه) تهیه شد. جهت ضدعفونی سطحی بذور تعداد ۵۰ عدد بذر یکنواخت به مدت یک دقیقه در داخل آب حاوی مایع ظرفشویی شستشو داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در وایتکس ۵ درصد

(برند اکتیو) غوطه‌ور شدند، سپس شستشو داده شده و به مدت دو دقیقه در قارچ‌کش ۲ درصد غوطه‌ور و چهار بار شستشو داده شدند، بعد از آن بذور به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (برند رازی) غوطه‌ور و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (Karimi et al., 2023). بذور ضدعفونی شده روی کاغذ خشک استریل داخل پتری‌دیش استریل ریخته شده و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به داخل آن افزوده شد. پس از رشد بذر و ظهور جوانه و ریشه‌ها پس از ده روز در شرایط این آزمایش با رعایت کلیه اصول استریل گیاهچه‌ها به داخل بطری‌های حاوی محیط نمک معدنی حداقل (MSM[۳]) منتقل گردیده و دهانه ظروف با پنبه پوشانده شد، و به مدت یک هفته بر روی شیکر در اتاق کشت در دور کند ۸۰ دور در دقیقه در شرایط نوری ۱۶ ساعت با شدت نور ۸۰۰۰ لوکس و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد کردند. پس از کدر شدن محیط‌های کشت ناشی از ورود ترشحات ریشه در عین ارزیابی رشد مطلوب تا مرحله دو برگی، گیاهچه‌ها حذف و ترشحات مذکور به عنوان ترشحات ریشه مورد استفاده قرار گرفتند (Valetti et al, 2018).

ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم در حضور و عدم حضور ترشحات

توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها بر مبنای روش Stepanović و همکاران (2007) با اندکی تغییر در روش انجام شد. برای این منظور ابتدا یک لوپ پر از اسلنت هر باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت سویا براس (TSB[۴]) تلقیح و این لوله به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در داخل شیکر انکوباتور در ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل (TSB 0.5 X حاوی یک درصد گلوکز) و ۰/۵ میلی‌لیتر ترشحات ریشه به صورت مجزا درون میکروتیوپ‌های پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۱۴ الی ۱۶ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. سپس، محتوای داخل میکروتیوب‌ها تخلیه و سه بار با سرم فیزیولوژیک استریل به آرامی شستشو داده شدند تا سلول‌های غیر متصل به دیواره میکروتیوب‌ها خارج شوند. سپس تثبیت سلول‌ها با گذاشتن این میکروتیوب‌ها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آون به‌مدت یک ساعت انجام شد. در ادامه کار میکروتیوب-ها با ۰/۵ میلی‌لیتر کریستال ویوله ۰/۲ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه، رنگ‌آمیزی شدند. بعد از ۳۰ دقیقه، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته شده و با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۱ درصد به‌عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۲۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب‌ها به آرامی به میکروپلیت منتقل شده و مقدار جذب نوری در چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader Mpr4 هایپروین آلمان خوانده شد.

ارزیابی توانایی انحلال فسفات، تغییرات pH و هدایت الکتریکی در محیط کشت

کشت تازه ۱۲ ساعته باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت براث (NB) تهیه شده و برای بررسی توان حل‌کنندگی فسفات آن، هر باکتری با سه تکرار درمحیط کشت اسپربر مایع[۵] استریل (۱۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم پودر خاک فسفات، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلریدکلسیم و ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم در یک لیتر) تلقیح شد. اسیدیته محیط کشت پیش از استریل کردن و تلقیح باکتری‌ها، روی ۷ تنظیم شد. ارلن‌هایی با ظرفیت ۳۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اسپربر با ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری‌های ذکر شده تلقیح شدند. نمونه‌های دارای باکتری و شاهد (بدون باکتری) برای یک هفته در

[۳] Minimum Salt Media

[۴] Tryptic Soy Broth

[۵] Liqiud Sperber medium

شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ در دقیقه تکانده شدند. برای برداشت نمونه از محیط کشت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از بخش رویی آن نمونه‌برداری شد. فسفر به روش آبی (روش آسکوربیک‌اسید- مولیبدات) اندازه‌گیری شد. در پایان، ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره آماده‌شده برداشته و با ۴ میلی‌لیتر محلول کاری آمونیوم‌هپتامولیبدات، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید کنسرسیوم شد و هم‌زمان، استانداردها نیز آماده شدند. پس از ۱۵ دقیقه شدت رنگ در طول موج ۷۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-1800 شیمادزو خوانده شد. در خاتمه این آزمایش، میزان هدایت الکتریکی با دستگاه EC متر ۴۵۱۰ Jenway و اسیدیته محیط‌های کشت مجددا با پی‌اچ متر ۳۵۲۰ Jenway اندازه‌گیری شدند (Ebrahimi et al., 2018).

پژوهش‌های گلخانه‌ای

به منظور بررسی تأثیر تلقیح باکتری های مورد استفاده بر عملکرد گیاه جو در آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی مراغه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۶۰٪ انجام شد. تیمارهای این پژوهش شامل چهار سطح باکتریایی (تلقیح باکتریایی *P. agglomerans, P. putida* و کنسرسیوم دو باکتری و عدم تلقیح) و سه سطح فسفر (صفر، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از منبع خاک فسفات تولیدی داخل کشور توسط شرکت پارس شیمی بود، که در ۳ تکرار انجام شد. تلقیح باکتری در مرحله جوانه‌زنی توسط این باکتری‌ها به صورت جداگانه و کنسرسیوم با جمعیت ($cfu\ ml^{-1}$) 10^9 انجام شد. ویژگی‌های خاک مورد استفاده در کشت گلدانی در جدول (۱) آورده شده است. میزان پتاسیم این خاک به روش عصاره‌گیری با استفاده از استات آمونیوم و توسط دستگاه فلیم‌فتومتر شرکت شروود مدل M410 ، فسفر به روش عصاره‌گیری با بی‌کربنات سدیم و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-1800 شیمادزو، آهک به روش تیتراسیون، میزان هدایت الکتریکی و pH در عصاره گل اشباع بر اساس روش کار ارایه شده توسط سازمان تحقیقات خاک و آب کشور اندازه‌گیری شدند (Ali-Ehiayi and Behbahani, 1993). برای اندازه‌گیری رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای میزان مشخصی از خاک در یک گلدان با زه‌کش مناسب قرار گرفته و با آب اشباع گردید. اختلاف وزن آن پس از گذشت ۲۴ ساعت با وزن اولیه اشباع به عنوان ظرفیت مزرعه‌ای در نظر گرفته شد. این خاک قبل از کاشت به میزان لازم به غیر از فسفر جهت تامین عناصر دیگر با توجه به نیاز غذایی گیاه جو بر اساس دستورالعمل فنی تهیه شده توسط موسسه تحقیقات کشاورز دیم کشور جهت زراعت جو دیم در مناطق مختلف کشور کوددهی گردید. بر این اساس در گلدان‌های دارای ۵ کیلوگرم خاک در این پژوهش ۰/۱۱ گرم کود اوره و ۱/۵ گرم کود سولفات پتاسیم افزوده شد.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش گلدانی

Soil texture	Field capacity (%W/W)	pH	EC µs/M	TNV %	Available P mg/Kg	Available K mg/Kg
لوم شنی	۱۶/۹	۷/۸	۵۲۳	۸	۶/۰۵	۷۵

سطح بذور قبل از کاشت با وایتکس ۱۰٪ به مدت ۵ دقیقه و شستشوی مکرر با آب مقطر استریل و سپس غوطه ور سازی به مدت ۴۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و شستشوی مکرر با آب مقطر استریل تا رفع بوی وایتکس و الکل ضدعفونی سطحی شدند. این بذور به مدت ۲۴ ساعت در داخل پارچه نم‌دار استریل قرار گرفتند تا جوانه‌زنی ابتدایی انجام شود. جهت تولید مایه تلقیح از باکتری‌های فوق و تلقیح بذور گندم، یک لوپ از اسلنت حاوی باکتری در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح گردید. پس از رسیدن جمعیت باکتری به 10^9واحد تشکیل دهنده کلونی

در میلی‌لیتر (تخمین با روش مک فارلند) سوسپانسیون باکتریای در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، به آرامی در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول استریل کلرید سدیم ۰/۱ درصد (وزنی–حجمی)، مجدداً سوسپانسیون شده و برای بذرمال نمودن بذور در حال جوانه‌زنی جو به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید (Mishra and Barolia, 2020).

سپس مطابق با تیمارهای آزمایشی تلقیح باکتریایی انجام گرفت. چهار روز بعد از کشت بذرهای جوانه‌زده تعداد ساقه‌های رشد کرده شمارش شده و ده عدد از هر گیاه در گلدان‌ها باقی ماند. آبیاری گلدان‌ها به صورت وزنی بر اساس کاهش آب، نسبت به رطوبت مزرعه‌ای گلدان انجام گرفت. اندام هوایی جو بعد از رسیدن به مرحله فیزیولوژیکی به صورت کف‌بر برداشت شده و سپس وزن سنبله (دانه + غلاف) و تعداد سنبله و وزن دانه‌ها، وزن ساقه‌ها، تعداد دانه و ارتفاع ساقه، وزن برگ، در انتها وزن هزار دانه و وزن کل اندام هوایی اندازه‌گیری شد. شاخص برداشت نیز از تقسیم وزن دانه در گلدان بر وزن عملکرد زیستی محاسبه گردید (Karimi et al., 2023). سپس خاک گلدان‌ها به آرامی با شستشوی ملایم خاک با آب شهری خارج شده و ریشه‌ها در درون الک دو میلی لیتری، با آب شهری خارج شده و آب اضافی ریشه‌ها با دستمال کاغذی دو لایه گرفته شد. وزن تازه ریشه‌ها با ترازوی دقیق تعیین شده و حجم ریشه‌ها با روش جابجایی سیال (آب) به دست آمد. وزن خشک ریشه‌ها پس از قرارگرفتن آن‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس با ترازو تعیین شده و سایر ویژگی‌های ریشه مانند چگالی بافت ریشه، طول ریشه، سطح ریشه، قطر ریشه و تراکم سطح ریشه به شرح زیر محاسبه شدند (Karimi et al., 2022; Alizadeh, 1999; Naseri et al., 2019; Akhavan et al., 2012):

(۱)

چگالی بافت ریشه ($g\ cm^{-3}$) =

وزن خشک ریشه (g) / حجم ریشه (cm^{-3})

(۲)

طول ریشه (m) = وزن ریشه (g) × ۰/۸۹

(۳)

سطح ریشه^{۲} (mm^2) =

۲((cm^{-3}) حجم ریشه × (π (cm) طول ریشه)$^{۰/۵}$

(۴)

قطر ریشه^{۳} (mm) =

(۴ ×(g) وزن تازه ریشه / ((m) طول ریشه × π)$^{۰/۵}$

(۵)

تراکم سطح ریشه^{۴} ($cm^2\ cm^{-3}$) =

((mm) قطر ریشه × (m) طول ریشه × π)

تجزیه آماری داده‌های آزمایشی پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها، با نرم‌افزار MSTAT C انجام شده و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

توانایی تشکیل بیوفیلم

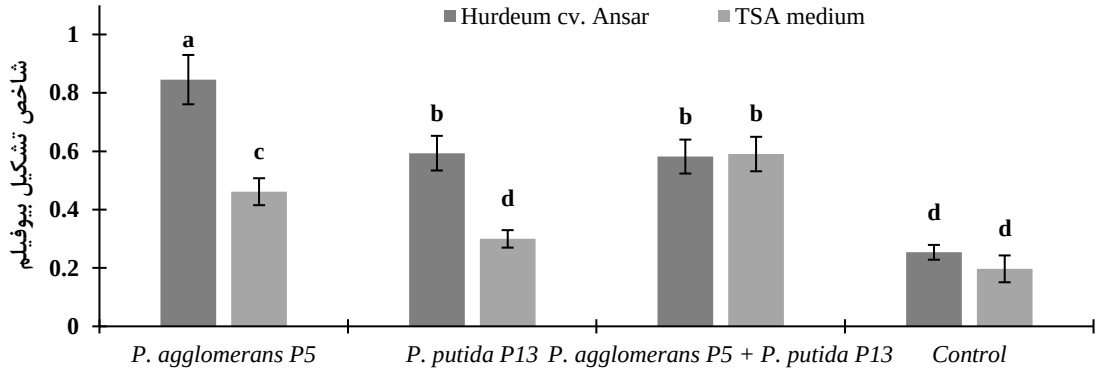
نتایج حاصله نشان دادند که اثر نوع محیط کشت و نوع باکتری در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل باکتری در محیط کشت در سطح احتمال ۵ درصد بر تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد مطالعه معنادار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تشکیل بیوفیلم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۳	۰/۵۱۲**
محیط کشت	۱	۰/۰۱۹**
باکتری × محیط کشت	۳	۰/۰۵۲*
خطا	۱۶	۰/۰۳۵
ضریب تغییرات (٪)		۱۲/۴۸

* و ** به ترتیب بیانگر معناداری در سطح احتمال ۵ درصد و یک درصد می‌باشند.

بر اساس نتایج مقایسات میانگین (شکل ۱) قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *P. agglomerans* در حضور ترشحات ریشه ٪۴۲ و در محیط کشت TSB ٪۵۸ بیشتر از باکتری *P. putida* بود، اما در کنسرسیوم باکتری از نظر تشکیل بیوفیلم تفاوتی بین محیط کشت‌ها وجود نداشت.



شکل۱- شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ در محیط کشت مصنوعی و طبیعی (ترشحات ریشه جو رقم انصار). تیمار کنترل فقط محیط کشت بوده و به ان باکتری تلقیح نشده است.

Beauregard و *همکاران* (۲۰۱۲) نشان دادند که ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم برای کلنیزاسیون ریشه گیاه *Arabidopsis thaliana* با باکتری *B. subtilis* بسیار ضروری هستند و در تشکیل بیوفیلم برخی از پلی-ساکاریدهای گیاهی نقش سیگنالی و محرک در تشکیل بیوفیلم داشته و در عین حال می‌توانند توسط باکتری به-عنوان منبع کربن برای تولید اگزوپلی‌ساکارید در ساختار بیوفیلم استفاده می‌شوند. برای شکل‌گیری و توسعه بیوفیلم‌های چندگونه‌ای، برهمکنش‌های سلول به سلول، که به عنوان چسبندگی[۶] و هم‌انباشتگی[۷] شناخته می‌شوند، ارتباطات متقابل بین سلول‌های مجاور را در یک بیوفیلم تقویت می‌کنند. مرحله چسبندگی به شدت وابسته به خصوصیات فیزیکوشیمیایی باکتری وابسته بوده و مختص همان باکتری هست ولی در مرحله هم انباشتگی که مرحله توسعه بیوفیلم می‌باشد، بسیار وابسته به تولید پلی‌ساکاریدها بوده که به عنوان سیمان بین سلولی عمل نموده و باکتری‌ها را در کنار هم نگه می‌دارد (Joshi et al., 2021). کلنیزاسیون ریشه گیاهان زراعی توسط مایه تلقیح‌های معرفی‌شده جهت بهره‌مندی از کارکردهای اکولوژیکی آنها مهم است. نوع باکتری و نوع گیاه در جهت افزایش این توان موثر بوده و پیشنهاد می‌شود که توان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های محرک رشد به‌عنوان معیاری در گزینش

[4] Co-adhesion

[۷] Co-aggregation

آنها و برای گیاهان خاص مورد آزمون قرار گیرد. علاوه بر این رفتارهای متفاوت در تشکیل بیوفیلم توسط کنسرسیوم گونه‌های باکتریایی نشان می‌دهد که متابولیت‌های باکتریایی می‌توانند اثرات هم افزایی و یا کاهشی و یا خنثی در تشکیل بیوفیلم داشته باشند لذا این موضوع در تهیه مایه تلقیح‌های چند گونه‌ای بایستی مورد توجه قرار بگیرد.

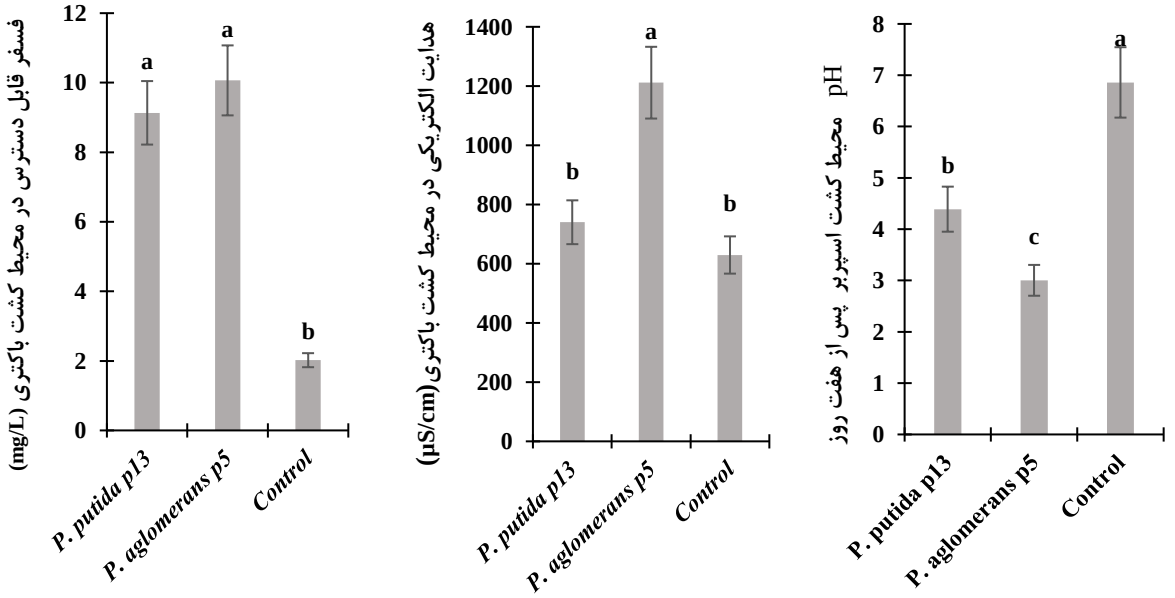
جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر باکتری‌های کود زیستی بر حلالیت فسفر، هدایت الکتریکی و pH محیط کشت اسپر در مدت هفت روز

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فسفر قابل دسترس	هدایت الکتریکی	pH
باکتری	۲	۱۱/۴۴**	۴۸۹۸۹۶ **	۵۸/۱۰**
خطا	۴	۰/۰۰۶۵	۱۴۹۴	۰/۹۶۸۶
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۲۵	۸/۶۷	۱۰/۳۵

** بیانگر معناداری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

توانایی آزادسازی فسفر از خاک فسفات در محیط کشت اسپربر مایع

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر باکتری بر میزان قابلیت دسترسی به فسفر، هدایت الکتریکی و pH محیط کشت در سطح احتمال یک درصد معنادار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بیانگر آن بود که تلقیح محیط کشت اسپربر حاوی خاک فسفات با باکتری *P. putida* باعث افزایشEC محیط کشت برابر با (S/cmμ) ۱۱۰ و تلقیح محیط کشت با باکتری *P. agglomerans* موجب افزایش EC برابر با (S/cmμ) ۵۲۸ در مقایسه با تیمار شاهد گردید. اما تلقیح محیط کشت اسپربر حاوی خاک فسفات با باکتری *P. putida* باعث افت ۲/۴۷ واحدی pH و ۳/۸۶ واحدی pH با باکتری *P. agglomerans* در مقایسه با تیمار شاهد گردیدند (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات میزان فسفر قابل دسترس، هدایت الکتریکی و pH در محیط کشت اسپربر توسط باکتری‌های *P. putida* p13 و *P. agglomerans* p5 پس از ۷ روز. تیمار کنترل بدون افزودن باکتری می‌باشد.

مشخص شده است که باکتری‌های حل‌کننده فسفات با ترشح اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید گلوکونیک، اسید اگزالیک و اسید مالیک، نقش کلیدی در انحلال منابع نامحلول فسفات در خاک ایفا می‌کنند، این اسیدهای آلی با ایجاد شرایط اسیدی در محیط اطراف ریشه (ریزوسفر)، باعث کاهش موضعی pH می‌شوند. کاهش pH به نوبه خود باعث افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول فسفات مانند فسفات‌های کلسیم، آهن و آلومینیوم می‌شود. در نتیجه، فسفر که قبلاً در شکل‌های نامحلول و غیرقابل دسترس برای گیاهان بود، به شکل‌های محلول و قابل جذب تبدیل می‌شود (Ebrahimi et al., 2018). با انحلال ترکیبات نامحلول فسفات و آزادسازی یون‌های فسفات و کاتیون‌های همراه، غلظت یون‌ها در محلول خاک افزایش می‌یابد. این افزایش غلظت یونی منجر به افزایش هدایت الکتریکی (EC) محیط می‌شود. EC بالاتر نشان‌دهنده افزایش حلالیت و دسترسی به عناصر غذایی مانند فسفر است. با توجه به مکانیسم‌های ذکر شده، کاهش pH و افزایش EC در نتیجه فعالیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، پدیده‌ای کاملاً منطقی و قابل انتظار است.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های ریشه جو

در این مطالعه ۹ ویژگی رشدی ریشه مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی این بخش نشان داد که وزن‌تر، وزن خشک، حجم، طول، سطح و تراکم سطح ریشه معنادار نشدند. اما اثر تیمارهای آزمایشی بر چگالی بافت، درصد رطوبت ریشه و قطر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار شدند (جدول ۴).

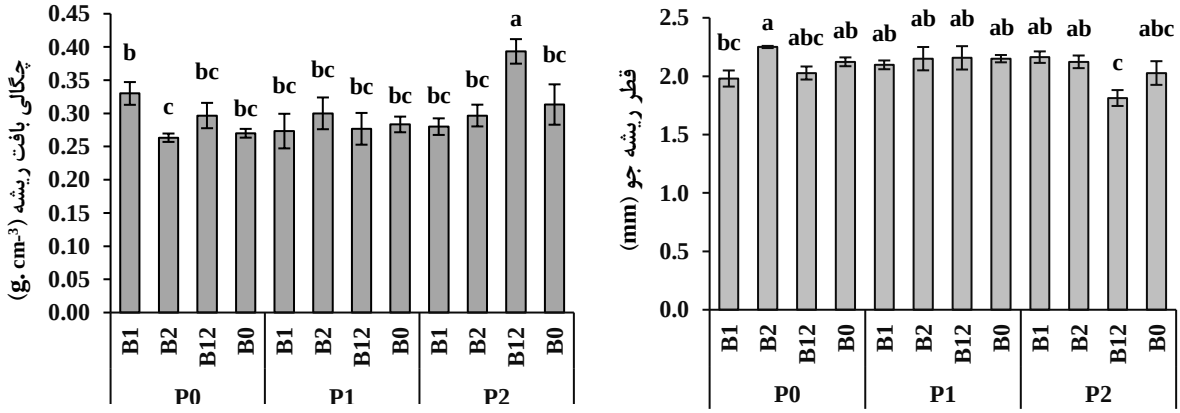
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های ریشه جو

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		وزن تر	وزن خشک	حجم	چگالی بافت	رطوبت	طول	سطح	قطر ریشه	تراکم سطح
بلوک	۲	۱/۴۸ ns	۰/۰۹۷ ns	۱/۱۳ ns	۰/۰۰۳ ns	۱۹۳۰/۷ ns	۰/۰۷۷ ns	۳/۲۲۶ ns	۰/۰۲۲ ns	۴/۰۴۷ ns
باکتری	۳	۰/۶۱ ns	۰/۰۰۵ ns	۰/۵۳ ns	۰/۰۰۲ ns	۳۸۷۵/۴ *	۰/۰۰۴ ns	۰/۷۹۴ ns	۰/۰۴۷ *	۰/۸۷۳ ns
فسفر	۲	۱/۲۵ ns	۰/۰۴۲ ns	۱/۶۹ ns	۰/۰۰۵ *	۲۵۷۸/۲ ns	۰/۰۳۴ ns	۳/۰۷۹ ns	۰/۰۳۵ ns	۲/۷۱۳ ns
باکتری × فسفر	۶	۰/۶۵ ns	۰/۰۵۳ ns	۱/۱۱ ns	۰/۰۰۴ *	۲۶۹۶/۳ ns	۰/۰۴۲ ns	۲/۳۹۹ ns	۰/۰۳۶ *	۱/۸۰۱ ns
خطا	۲۲	۰/۷۹	۰/۰۶۷	۰/۸۲	۰/۰۰۱	۱۲۵۹/۹۵	۰/۰۵۳	۲/۴۵۳	۰/۰۱۵	۲/۴۹
ضریب تغییرات (٪)		۲۸/۶۴	۲۱/۹۸	۲۲/۵۰	۱۲/۲۶	۱۷/۲۴	۲۱/۹۶	۲۱/۶	۵/۹۶	۲۱/۶۵

* معنی داری در سطح آماری پنج درصد و ns از لحاظ آماری غیر معنی دار.

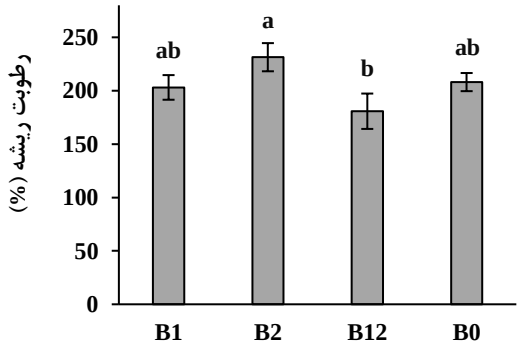
اثر اصلی باکتری بر چگالی بافت ریشه غیرمعنادار، اثر اصلی فسفر و اثر متقابل فسفر× باکتری بر چگالی بافت ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری نشان داد بیشترین میزان چگالی بافت ریشه در تیمار P2B12 (سطح ۱۲ میلی‌گرم فسفر و کنسرسیوم دو گونه باکتری) مشاهده شد و کمترین میزان چگالی بافت ریشه در تیمار P0B2 (سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans*) مشاهده شد (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری و اثر متقابل باکتری و فسفر بر قطر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود و اثر اصلی فسفر بر قطر ریشه غیر معنادار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر قطر ریشه نشان داد بیشترین قطر ریشه در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت معنی داری با تیمار B12 (کنسرسیوم دو باکتری) داشت و کمترین مقدار آن در تیمار B12 (کنسرسیوم دو باکتری) مشاهده شد. میان تیمارهای سویه باکتری *P. agglomerans* و *P. putida* و تیمار شاهد تفاوت معناداری از نظر اثر بر قطر ریشه وجود نداشت (شکل ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر قطر ریشه نشان داد بیشترین میزان قطر ریشه در سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد و کمترین میزان قطر ریشه

در سطح ۱۲ میلی‌گرم فسفر و تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر چگالی بافت و قطر ریشه جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13 ، *P. agglomerans* p5 ، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری بر میزان رطوبت ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی فسفر و اثر متقابل باکتری و فسفر بر میزان رطوبت ریشه غیر معنادار بود (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نیز نشان داد که کمترین میزان رطوبت در تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد که تفاوت آن با شاهد و باکتری *P. putida* غیرمعنادار بود (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر رطوبت ریشه جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13 ، *P. agglomerans* p5 ، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و حروف مشترک در بالای ستون‌ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد و اجزای عملکرد جو

در این بخش ۹ ویژگی مورد مطالعه قرار گرفتند که از میان آنها تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تعداد دانه، عملکرد زیستی غیرمعنادار بود (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد و اجزای عملکرد جو

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		وزن کاه و کلش	تعداد دانه	ارتفاع بوته	وزن برگ	عملکرد بیولوژیک	شاخص برداشت	وزن هزار دانه	وزن سنبله	وزن دانه	غلظت فسفر در دانه
بلوک	۲	۰/۰۲۰ ns	۱۱/۶ * ۱	۲/۴ ns	ns ۰/۰۰۲	۰/۰۵۲ ns	۲۲ *	۲/۳۰ ** ۰	۰/۰۹۸ ns	۰/۰۸۵ ns	۲۱۴۵۷۸ ns
باکتری	۳	۰/۰۴۹ **	۷۹/۶ ns	۱۴/۴ **	ns ۰/۰۲۲	۰/۵۶۳ ns	۲۳ *	۱/۰۸ ** ۶	۰/۳۲۶ *	۰/۳۰۶ ns	۲۵۲۲۷۵ **
فسفر	۲	۰/۰۳۲ ns	ns ۵۱/۲	۵/۳ ns	ns ۰/۰۶۳	۰/۵۵۵ ns	۳۷ *	** ۲۲/۷۶	۰/۳۱۱ ns	۰/۳۱۳ *	۱۵۹۴۱۳ **
باکتری × فسفر	۶	۰/۰۳۰ ns	ns ۲۴/۴	۴/۹ ns	۰/۰۷۵ *	۰/۳۵۸ ns	۱۷ ns	۵/۱۷ ns	۰/۱۱۵ ns	۰/۰۵۷ ns	۳۲۱۵۹ **
خطا	۲۲	۰/۰۱۵	۳۱/۶	۲/۱	۰/۰۲۴	۰/۲۳۳	۷	۳/۲۷	۰/۰۹۷	۰/۰۷۰	۷۹۴۵
ضریب تغییرات (٪)		۹/۴۱	۹/۳۱	۴/۲۶	۱۴/۳۱	۹/۱۰	۶/۱۰	۴/۵۷	۱۱/۷۴	۱۱/۰۴	۱۲/۴۵

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

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری بر وزن کاه و کلش و ارتفاع بوته در سطح احتمال ۱ درصد و بر وزن سنبله در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی فسفر و اثر متقابل باکتری و فسفر بر این صفات غیرمعنادار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد که کمترین مقدار وزن کاه و کلش از تیمار کنسرسیوم دو باکتری حاصل شد که با تیمار شاهد (بدون باکتری) تفاوت غیرمعنادار داشت. بیشترین مقدار وزن کاه و کلش در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت غیرمعنادار با تیمار باکتری *P. putida* داشت (جدول ۶). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر ارتفاع جو نشان داد بیشترین ارتفاع بوته در تیمار باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد که تفاوت غیرمعنادار با تیمار باکتری *P. putida* داشت. کمترین مقدار ارتفاع بوته در تیمار شاهد باکتری (B0) مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار کنسرسیوم دو باکتری نداشت (جدول ۶). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر وزن سنبله جو نشان داد بیشترین وزن سنبله در تیمار باکتری *P. putida* مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار باکتری *P. agglomerans* نداشت. کمترین مقدار وزن سنبله در تیمار شاهد (B0) مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار کنسرسیوم دو باکتری نداشت (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری بر برخی از صفات جو

تیمار	وزن سنبله (گرم در گلدان)	ارتفاع بوته (cm)	شاخص برداشت (٪)	وزن هزار دانه (گرم)	وزن کاه و کلش (گرم در گلدان)
B1	۳/۰۸a	۳۴/۴۹a	۴۶/۶۸a	۴۰/۰۵ab	۱/۳۸a
B2	۳/۰۴a	۳۵/۰۰a	۴۵/۵۹a	۴۰/۸۹a	۱/۳۹a
B12	۲/۸۰ab	۳۳/۹۶ab	۴۵/۲۲a	۳۹/۵۸ab	۱/۲۳b
B0	۲/۶۹b	۳۲/۱۰b	۴۲/۸۷b	۳۷/۷۳b	۱/۲۹ab

B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13، *P. agglomerans* p5 ، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنا دار میان تیمارها می باشد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرهای اصلی فسفر و باکتری بر شاخص برداشت جو در سطح احتمال ۵ درصد و بر وزن هزار دانه در سطح احتمال یک درصد معنادار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر نشان داد بیشترین شاخص برداشت در تیمار شاهد فسفر مشاهده شد که اختلاف غیرمعنادار با تیمار ۱۲ میلی‌گرم فسفر داشت. در حالی که تیمار ۶ میلی‌گرم فسفر منجر به حصول کمترین شاخص برداشت گردید. مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد بین تیمارهای باکتری تفاوت غیرمعناداری از نظر شاخص برداشت وجود نداشت. میزان شاخص شاخص برداشت در تیمار شاهد به طور معناداری از تیمارهای حاوی باکتری کمتر بود (جدول ۷). مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر نشان داد بیشترین وزن هزار دانه در تیمار ۱۲ میلی‌گرم فسفر مشاهده شد که اختلاف غیرمعنادار با تیمار شاهد فسفر داشت. در حالی که تیمار ۶ میلی‌گرم فسفر منجر به حصول کمترین وزن هزار دانه گردید (جدول ۷). مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری نشان داد بین تیمارهای باکتری تفاوت معناداری از نظر شاخص برداشت وجود نداشت. میزان وزن هزار دانه در تیمار شاهد به طور معناداری از تیمارهای حاوی باکتری (تیمار *P. agglomerans* و تیمار *P. putida*) کمتر بود (جدول ۷). نتایج تجزیه واریانس نشان داد، اثر اصلی فسفر بر وزن دانه در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. اثر اصلی باکتری و اثر متقابل باکتری و فسفر بر وزن دانه جو غیرمعنادار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر بر وزن دانه جو نشان داد تقاوت بین تیمار شاهد و ۱۲ میلی گرم فسفر از نظر اثر بر وزن دانه، غیرمعنادار بود و تیمار ۱۲ میلی‌گرم فسفر دارای بیشترین وزن دانه بود. کمترین وزن دانه در تیمار ۶ میلی گرم فسفر مشاهده شد که تفاوت معنادار با سطوح شاهد و ۱۲ میلی‌گرم فسفر داشت (جدول ۷).

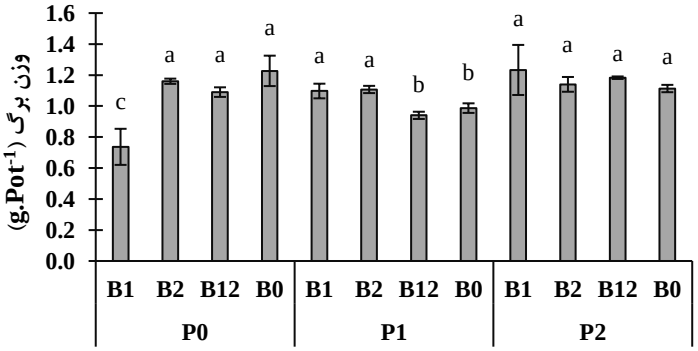
جدول ۷- مقایسه میانگین اثر اصلی فسفر بر شاخص برداشت جو

تیمار	وزن دانه در گلدان (گرم)	شاخص برداشت (٪)	وزن هزار دانه (گرم)
P0	۲/۱۴a	۴۶/۸۷a	۴۰/۰۵ab
P1	۲/۲۱b	۴۳/۳۸b	۳۸/۰۱b
P2	۲/۵۰a	۴۵/۰۳ab	۴۰/۶۳a

P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فسفات در خاک می‌باشند. حروف مشترک درهر ستون نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می باشد.

وزن برگ

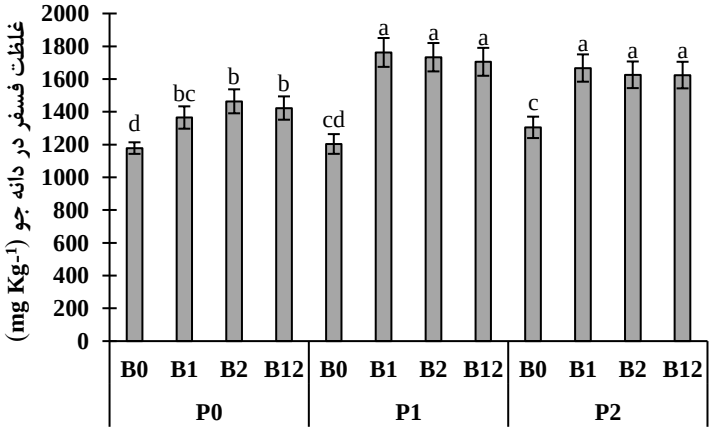
نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی باکتری و اثر اصلی فسفر بر وزن برگ جو غیر معنادار بود. اثر متقابل باکتری و فسفر بر وزن برگ جو در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر وزن برگ نشان داد بیشترین میزان وزن برگ در سطح صفر فسفر و باکتری *P. agglomerans* مشاهده شد و کمترین میزان سطح برگ در سطح ۱۲ میلی گرم فسفر و تیمار کنسرسیوم دو باکتری مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر وزن برگ جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13 ، *P. agglomerans* p5 ، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

غلظت فسفر در دانه جو

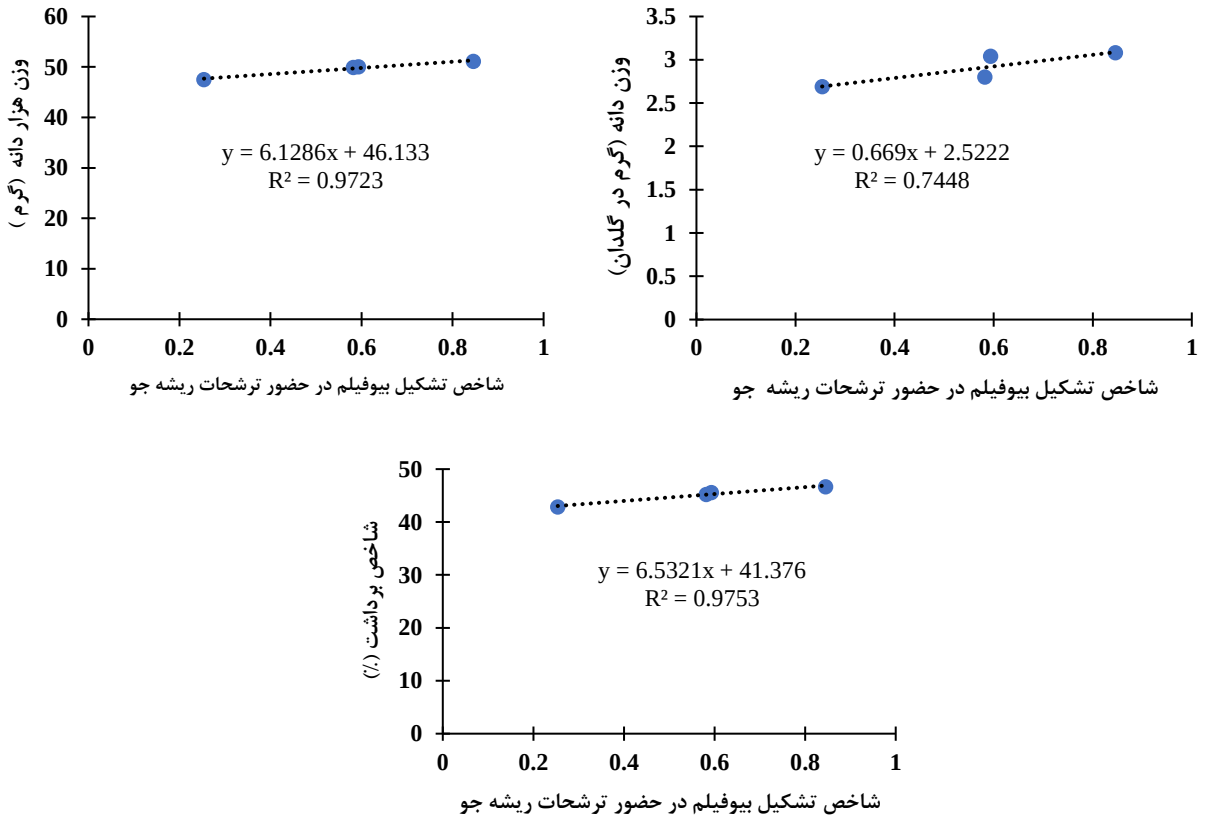
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی باکتری و فسفر و اثرات متقابل آنها بر میانگین غلظت فسفر در دانه جو در بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنادار بود (جدول ۵). در تمامی سطوح فسفر بیشترین میزان غلظت فسفر در اثر تلقیح باکتری‌ها مشاهده گردید که در داخل هر سطح اختلاف معناداری باهم نداشتند و بطور متوسط در سطح صفر فسفر باعث افزایش ۲۰ درصدی فسفر دانه، در سطح P1 باعث افزایش ۴۴ درصدی و در سطح P2 باعث افزایش ۲۵ درصدی میزان فسفر دانه در مقایسه با تیمار بدون باکتری در هر سطح فسفر شدند. بیشترین میزان فسفر در سطح ۱ و ۲ فسفر مشاهده گردید. کمترین میزان فسفر دانه در تیمار بدون کاربرد خاک فسفات و بدون مایه‌زنی باکتری مشاهده گردید (شکل۶).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفر و باکتری بر مقدار فسفر دانه جو. B1، B2، B12 و B0 به ترتیب بیانگر *P. putida* p13 ، *P. agglomerans* p5 ، کنسرسیوم دو باکتری و شرایط بدون باکتری بوده و P0، P1 و P2 بیانگر سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم خاک فسفات در کیلوگرم خاک می‌باشند. حروف مشترک در بالای ستون‌ها نیز بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار میان تیمارها می‌باشد.

ارتباط میان قدرت تشکیل بیوفیلم توسط اجزای زیستی کود فسفات بارور ۲ و عملکرد جو

برقراری ارتباط رگرسیونی میان صفات وزن دانه در گلدان، وزن هزار دانه و شاخص برداشت با شاخص توانایی تشکیل بیوفیلم توسط اجزای کود زیستی فسفات بارور ۲ نشان داد که همبستگی معناداری میان آنها وجود دارد (شکل ۷).



شکل ۷- رابطه رگرسیونی بین شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ و صفات وزن هزار دانه، وزن دانه در بوته و شاخص برداشت در جو. مدل رگرسیونی در سطح احتمال ۵٪ معنادار است.

شدت وقوع تنش‌های غیرزیستی و زیستی در خاک‌های زراعی بالا می‌باشد، بنابراین زندگی به شکل بیوفیلم و بهره-برداری از مزایای آن می‌تواند میکروب‌های خاک را در برابر این شرایط نامساعد حفاظت نماید. کمبود مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل محرک تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های خاک‌زی به شمار می‌رود (Costerton et al., 1999). یافته‌های Ghosh و همکاران (2019) در خاک‌های دچار فقر فسفر قابل جذب، نشان داد که باکتری‌های *Burkholderia tropica* P4 و *B. unamae* P9 بر روی ذرات خاک فسفات و سنگریزه‌های آن بیوفیلم تشکیل داده و موجب رهایش فسفر از آن می‌شوند. این محققان همچنین بر مبنای مطالعات با میکروسکوپ الکترونی گزارش کردند که میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های یاد شده با میزان کمبود فسفر رابطه مستقیم داشته و در شرایط کمبود فسفر قابل دسترس، میزان تشکیل بیوفیلم زیادتر است. بنابراین به‌نظر می‌رسد تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های حل کننده فسفات، انواع مکانیسم‌های درگیر در رهاسازی فسفر از منابع نامحلول را به‌طور کارآمدتری نسبت به شرایط آزادزی فعال می‌نماید (Valetti et al., 2018).

وجود فسفر برای رشد محصولات کشاورزی حیاتی است و در تمام مراحل رشد محصول نقش دارد چندین فرآیند کلیدی گیاهی، از جمله بیوسنتز اجزای اصلی سلولی (مانند اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدهای غشایی، ATP و غیره) به این عنصر بستگی دارند، بنابراین، تولید غذای جهانی به طور جدایی‌ناپذیری به کودهای فسفر وابسته است (Bindraban et al., 2020). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از خاک فسفات توانست میزان تولید دانه جو در گلدان را افزایش دهد (جدول ۷). این نتیجه اولا با عنایت به نقش حیاتی فسفر در تولید ماده خشک دور از انتظار نیست. ثانیا نشان می‌دهد که احتمالا یا گیاه جو به‌واسطه ترشح برخی از اسیدهای آلی توانسته است از خاک فسفاتی که به شکل پودری به خاک افزوده شده بود، بهره‌برداری نماید یا از آنجایی که این مطالعه در بستر خاکی غیراستریل انجام شد، میکروب‌های بومی خاک توانسته‌اند در بهره‌برداری از این منبع فسفات نقش داشته باشند.

در خاک‌های کشاورزی فقیر از فسفر قابل جذب، میکروارگانیسم‌های عرضه کننده فسفر، اعم از باکتری‌ها یا قارچ‌ها از طریق انحلال، تحرک یا معدنی‌سازی، به طور قابل توجهی بر سه پدیده دینامیکی چرخه فسفر جذب–واجذب، انحلال–رسوب و کانی‌سازی–تحرک تأثیر می‌گذارند (Sharma et al, 2013). با عنایت به اینکه این آزمایش در خاکی با میزان فسفر قابل جذب حدود ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک (خاک نسبتا فقیر از نظر فسفر) انجام شد و از آنجایی که باکتری‌های کود زیستی فسفات بارور ۲ توانستند برخی از ویژگی‌های رشدی در جو را متاثر سازند، لذا به نظر می‌رسد در این خصوص بر دینامیک فسفر در خاک موثر بوده باشند. این احتمال با توجه به میزان فسفر دانه جو (شکل ۶) در تیمارهای مختلف تقویت می‌شود و نشان دهنده پاسخ به تیمارهای میکروبی در این‌گونه خاک‌ها می‌باشد. وجود رابطه رگرسیونی معنی‌دار بین شاخص‌ها عملکردی مانند وزن هزار دانه، وزن دانه و شاخص برداشت (شکل ۹) و شاخص تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های کود زیستی احتمالا بیانگر تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر جو و نقش آن در تغییرات مفید بین تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد می‌باشد.

باکتری‌های حل کننده فسفات با افزایش میزان فسفر قابل دسترس و همچنین توسعه رشد ریشه گیاه و یا ایجاد تغییرات ریخت شناسی می‌توانند شرایط مساعدتری را در جذب فسفر از خاک فراهم کنند (Hussain et al., 2019). به عبارت دیگر، تلقیح باکتری‌های حل‌کننده فسفر در گیاهان علاوه بر اینکه می‌تواند بیان ژن ناقل Pi را در ریشه‌ها تنظیم کند، می‌تواند تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده فسفر (جهت استفاده از منابع آلی و معدنی) و فیتوهورمون‌های موثر در تغییرات ریخت شناسی ریشه را که در جذب فسفر موثر هستند را تحریک کند (Batool and Iqbal, 2019). ایندول ۳- استیک اسید از جمله هورمون‌هایی است که تولید آن منشا میکروبی در ریزوسفر داشته و ارتباط میان تولید آن و حضور باکتری‌های حل کننده فسفات جهت ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی ریشه برای جذب بهتر فسفر گزارش شده است (Emami et al., 2019). باکتری‌های *سودوموناس* قادر به تولید هورمون‌های اکسین، جیبرلین و ویتامین‌ها است و نقش احتمالی آنها در افزایش عملکرد ماده خشک را نمی‌توان نادیده گرفت (Sarikhani and Amini, 2020). بنابراین نظر به بروز برخی تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از تلقیح باکتری‌های جداسازی شده از کود زیستی فسفات بارور ۲ به نظر می‌رسد که این تغییرات می‌تواند از هورمون‌هایی مانند ایندول استیک نیز ایجاد شده باشد (Khosravi, 2023).

نتیجه‌گیری

باکتری‌های موجود در کود زیستی فسفات بارور ۲ توانستند در حضور ترشحات ریشه جو بیوفیلم تشکیل دهند. توان تشکیل بیوفیلم در بین باکتری‌ها متفاوت بود و در باکتری *P. agglomerans* بیشترین میزان را نشان داد. همچنین اختلاط دو باکتری توانست بر قدرت تشکیل بیوفیلم اثر گذار باشد. این موضوع با توجه به اینکه بین

شاخص تشکیل بیوفیلم و شاخص‌های عملکردی مهم در جو مانند شاخص برداشت، وزن هزار دانه و وزن دانه ارتباط خطی و مستقیم داشت، بایستی در تهیه مایه تلقیح-های تجاری بویژه در مایه‌تلقیح‌های چند گونه‌ای مورد توجه قرار بگیرد. به این مفهوم که احتمالا انتخاب باکتری-هایی با توان تشکیل بیوفیلم قوی‌تر و همچنین در صورت استفاده ترکیبی از آنها در تهیه مایه تلقیح ضرورت توجه به هم افزایی در تشکیل بیوفیلم‌های قوی تر کارایی آنها را افزایش خواهد داد. این موضوع می‌تواند در تهیه سایر کودهای زیستی بسیار مهم باشد.

سپاسگزاری

به این‌وسیله از مدیریت پژوهشی دانشگاه مراغه و آزمایشگاه‌های بیولوژی و حاصلخیزی خاک گروه علوم و مهندسی خاک آن دانشگاه جهت حمایت‌های مالی و فنی تقدیر و تشکر می‌شود.

Refrences

1. Akhvan, S., Sha'banpour, M., & Esfahani, M. (2012). The effect of soil density and texture on root and shoot growth of wheat. Water and Soil, 26(3), 727-735. (In Persian)
2. Ali-Ehiayi M and Behbahani AA, 1993. Description of soil chemical analysis methods. Soil and Water Research Institute. No: 892 Iran. (In Persian)
3. Alizadeh, A. (1999). The relationship of water, soil, and plant. Astan Quds Razavi Publishing, Imam Reza University.353 pages. (In Persian)
4. Asadi, H., & Gorji, M. (2022). Challenges and limitations of soil and land resources in Iran. *Land Management Journal*, *10*(1), 111-134. (In Perisan)
5. Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi journal of biological sciences*, *26*(7), 1400-1410.
6. Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Bacillus subtilis biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), E1621-E1630.
7. Bindraban, P. S., Dimkpa, C. O., & Pandey, R. (2020). Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. *Biology and Fertility of Soils*, *56*(3), 299-317.
8. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, *284*(5418), 1318-1322.
9. de Oliveira, R. S., Gonçalves, A. R., Ajulo, A. A., Oliveira, L. R., Lanna, A. C., & de Filippi, M. C. C. (2024). Survey and genomic characterization of Serratia marcescens on endophytism, biofilm, and phosphorus solubilization in rice plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
10. Ebrahimi, M., Safari-sinegani, A. A., Sarikhani, M., & Aliasgharzad, N. (2018). Study on phosphate solubilizing ability of some bacterial isolates and determination of solubilized phosphorus fractionation in supernatant and microbial biomass. *Journal of Microbial Biology*, *7*(25), 109-125. (In Perisan)
11. Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 19804-19813.
12. Fallah Nosratabad, A. and Khoshru, B. (2024). Potentials and challenges of biofertilizers in sustainable agriculture. *Journal of Sol Biology*, *12*(1), 19-63.
13. Fallah, A. R. (2022). Solubilization Mechanisms of insoluble phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of Sol Biology*, *10*(1), 93-110.
14. Ghosh, R., Barman, S., & Mandal, N. C. (2019). Phosphate deficiency induced biofilm formation of Burkholderia on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate. *Scientific Reports*, *9*(1), 5477.
15. Habibi, M. , Rejali, F. , Zaefarian, F. and Bagheri, N. A. (2022). Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer. *Journal of Sol Biology*, *10*(1), 65-80.
16. Hussain, A., Adnan, M., Iqbal, S., Fahad, S., Saeed, M., Mian, I. A., ... & Andaleeb, S. (2019). 78. Combining phosphorus (P) with phosphate solubilizing bacteria (PSB) improved wheat yield and P uptake in alkaline soil. *Pure and Applied Biology (PAB)*, *8*(2), 1809-1817.
17. Joshi, R. V., Gunawan, C., & Mann, R. (2021). We are one: multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 635432.
18. Karimi, E., Aliasgharzad, N., & Esfandyari, E. (2023). Evaluation of biofilm formation ability by biofilm growth promoting bacteria at the root

surface of wheat (*Triticum aestivum* L.) and their effects on grain yield. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *33*(2):133-146. (In Perisan)

19. Karimi, E., Aliasgharzad, N., Esfandiari, E., Hassanpouraghdam, M. B., Neu, T. R., Buscot, F., ... & Tarkka, M. T. (2022). Biofilm forming rhizobacteria affect the physiological and biochemical responses of wheat to drought. *AMB Express*, *12*(1), 93.
20. Karimi, E., Alisgharzad, N., Mousavi, S. B., & Aliloo, A. (2022). The effect of growth promoting bacteria on barley yield and morphological root characteristics under different water conditions. *Journal of Soil and Plant Interactions*, *13*(2): 67-81. (In Perisan)
21. Karimi, E., Mohammadi, S. & Esfandyari, E. (2022). Effect of biofilm-forming plant growth promoting bacterium and tryptophan on yield and Cadmium uptake in Rye (*Secale cereale*). *Journal of Soil Biology*, 10(2), 177-191. (In Persian)
22. Kasim, W. A., Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., & Hewait, H. M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61, 217–227.
23. Khosravi, H. (2023). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Inoculation on Wheat Growth Indices in Saline Irrigation Conditions. *Journal of Sol Biology*, *11*(1), 17-31.
24. Leytem, A. B., & Westermann, D. T. (2003). Phosphate sorption by Pacific Northwest calcareous soils. *Soil science*, *168*(5), 368-375.
25. Mishra, B. K., & Barolia, S. K. (2020). Quality assessment of microbial inoculants as biofertilizer. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(10), 3715-3729.
26. Naseri, R., Barary, M., Zarea, M. J., Khavazi, K., & Tahmasebi, Z. (2019). Wheat-root system influenced by application of phosphate solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi under different levels of phosphorous chemical fertilizer. Journal of Soil Biology, 6(2), 137-155. (In Persian)
27. Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. J Environ Qual 30:479–485.
28. Rehman, F. U., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M., & Zulfiqar, A. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: a review. *SunText Rev. Biotechnol*, *1*(2), 1-6.
29. Rejali, F., Asadirahmani, H., Khavazi, K., Asgharzadeh, A., & Esmaeilizad, A. (2014). The place of phosphatic biofertilizers and necessity to develop them in Iranian agriculture. *Land Management Journal*, *2*(1), 27-39. (In Perisan)
30. Sarikhani, M. R., & Amini, R. (2020). Biofertilizer in sustainable agriculture: review on the researches of biofertilizers in Iran. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *30*(1), 329-365. (In Perisan)
31. Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H.S., 2005. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. Soil Biol. Biochem. 37, 1975–1978.
32. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, *2*, 1-14.
33. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*(8), 891-899.
34. Taktek, S., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J. A., & Antoun, H. (2017). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglomus irregulare* DAOM 197198. *Mycorrhiza*, *27*, 13-22.
35. Tohidinia, M. A., Mazaheri, D., Bagher-Hosseini, S. M., & Madani, H. (2013). Effect of biofertilizer Barvar-2

and chemical phosphorus fertilizer application on kernel yield and yield components of maize (*Zea Mays* Cv. Sc704). *Iranian Journal of Crop Science*, *4*(60): 295-307. (In Persian)

36. Valetti, L., Iriarte, L., & Fabra, A. (2018). Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*, *132*, 1-10.
37. Van Kauwenbergh, S. J. (2010). World phosphate rock reserves and resources (p. 48). Muscle Shoals: Ifdc.
38. Wang, D., Jiang, C., Zhang, L., Chen, L., & Zhang, X. (2019). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54 induced drought tolerance in tomato plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6271.

41-65/Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Comparison of the plant growth-stimulating ability of epiphyton and epiphyton microbial communities in some rice fields of Guilan province

Mahdiyeh Leylasi Marand [1], HoseinAli Alikhani*[2], AhmadAli Pourbabaie[3] and Shayan Shariati [4]

1- Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mahdiyeh.leyasi@ut.ac.ir
2- Corresponding Author, Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: halikhan@ut.ac.ir
3- Department of Soil Science Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: pourbabaei@ut.ac.ir
4- Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shayan_shariati@ut.ac.ir

Article Info

Received: 2024-12-21
Accepted: 2025-07-9

Keywords: drought, fallow, mineral phosphate, organic phosphate, periphyton, salinity

Corresponding author's email: halikhan@ut.ac.ir

DOI: 10.22092/SBJ.2025.367936.272

Extended Abstract

Background and objectives: Rice paddies provide over half of the world's food, yet chemical fertilizers used in them are inefficient with high losses. Hence, biological approaches to enhance rice growth are gaining importance. Epipelon and epiphyton microbial communities form a diverse and dynamic system in paddies, consisting of phototrophs (such as algae and cyanobacteria) and heterotrophs (such as bacteria and fungi). Their biodiversity boosts microbial activity, increasing stress tolerance and production of growth-promoting substances. Nutrient accumulation and gene transfer within biofilm layers further strengthen microbial resilience. However, the role of periphytic biofilms in promoting plant growth remains unstudied.

Materials and methods: Sampling was conducted in July 2022 from rice paddies located in the villages of Khaleh sara, Gileh sara and Vajargah, as well as from fallow soils in Masal, Guilan Province with three replications. In this study, 21 experimental treatments were sampled. Epipelon (Ep) samples were taken from the surface soil of the rice paddies using a rectangular box-shaped device (fully open at the front and 1 cm open at the back), while epiphyton (Eph) samples were collected from suspended periphytons in the water that used larger algae as an attachment surface, using sterilized bottles. Fallow field (FF) samples were also taken from the surface of dry soil. The collected samples were transported to the laboratory in iceboxes, revived in BBM liquid medium, and maintained in a greenhouse at a temperature of 28–30°C under a light intensity of 5000 lux. The quantitative potassium solubilization assay was carried out in a modified BBM culture medium containing muscovite and phlogopite over a 7-day period and was read using a flame photometer. Quantitative assays of mineral and organic phosphate solubilization were conducted in Sperber and modified Sperber media containing inositol, respectively, and measured using a spectrophotometer at 470 nm. For siderophore evaluation, CAS-agar medium was prepared, and the drop plate method was used; the diameter of the orange halo around the colony was considered as the evaluation criterion. To assess auxin (IAA) production capability, salkowski reagent was used, and absorbance was measured by a

spectrophotometer at 535 nm. Hydrogen cyanide production was tested in TSA medium, with a change in the color of filter paper placed on the lid of the Petri dish as the indicator. Salt stress was induced in both liquid and solid BBM media with NaCl concentrations of 0% and 8%. Drought stress testing was performed using polyethylene glycol to create osmotic pressures of 0, -2, -5, -10 and -15 bar in BBM medium, and absorbance was measured using a spectrophotometer at 630 nm. Statistical analysis of the results of all experiments (except for the water stress test) was performed using a completely randomized design with three replications, utilizing SAS software. The water stress experiment was conducted using a factorial design with two factors: microbial treatments at 22 levels and osmotic pressure treatments at 4 levels.

Results: The results showed that the highest potassium dissolution was in treatment PF3 Eph(3) (Vajargah Epiphytic sample), with a 3.4-fold increase compared to the control within 7 days. The next ranks were treatments PF1 Eph(1) and PF3 Eph(2), which were in the same statistical group as treatment PF3 Eph(3). The values of these treatments were higher in samples containing phlogopite than in those containing muscovite. For the phosphate dissolution test from the tricalcium phosphate source, treatment PF3 Eph(2) showed a value of 1121 mg/L. Following that, treatments PF2 Eph(2) and PF3 Eph(3) added 989 and 935 mg/L of soluble phosphate to the culture medium, respectively. The lowest dissolution power of insoluble mineral phosphorus was measured in the fallow soil sample, with an average of 266 mg/L. All epiphytic samples had a significantly higher phosphorus dissolution rate compared to the epipelon samples from the same sampling point, showing a statistically significant difference. The phosphate dissolution test from the inositol hexaphosphate source, yielded 427.25 mg/L. The lowest organic phosphate dissolution was reported in treatment FF (1), which pertains to the fallow soil. This treatment, along with the other fallow soil treatments (FF(2) and FF(3)), was placed in the same statistical group. The highest hydrogen cyanide production was observed in epiphytic treatments in the Vajargah rice paddy during the 5-day incubation. The highest siderophore production was measured in periphyton samples number PF1 Eph(2) and then PF1 Eph(1), with halo to colony diameters of 1.62 and 1.41, respectively. These treatments pertain to the Khale Sara rice paddies, and both are from epiphytic samples. However, comparing the halo-to-colony diameter of other treatments shows that epiphytic samples had a higher siderophore production capability. The results of the indole acetic acid test indicate that the highest amount was observed in Gile Sara epipelic sample. This treatment shows a statistically significant difference compared to all other treatments. The results of the salinity test showed that under natural culture conditions, microbial growth was completely normal and turned the culture green, while culturing periphyton in a medium with 8% salt made the culture turbid. Reculturing the periphyton on solid medium showed that in 0% salt conditions, algae, bacteria, and fungi grew, whereas in the solid medium with 8% salt, only fungi were observed. It is noteworthy that no microorganisms grew in the fallow soil samples and treatment number PF3 Eph(3). Comparison of the average results of drought stress showed that the highest density was recorded at zero osmotic pressure, followed by osmotic pressures of -2 and -5, which were in the same statistical group. The highest optical density measured was in periphyton treatment PF2 Ep(3) at zero pressure, which was in the same statistical group as periphytons PF3 Eph(3), PF2 Ep(2), PF3 Ep(2), and PF3 Ep(1). In all experiments except for the drought stress test, the lowest values were recorded from the fallow soil treatment

Conclusion: The overall conclusion of this research indicates that periphyton, including epipelon and epiphyton, has a high potential for growth-promoting characteristics. It is recommended that more greenhouse and field studies be conducted on periphyton, so that if confirmed, it can be utilized in the development of biofertilizers.

Cite this article:Leylasi Marand, M., Alikhani, H.A., Shariati, SH.,Pourbabaei, A.A., 2025. Investigating of plant growth promoting mechanisms of Epipelone and Epiphyton microbial communities in some rice paddies of Giulan province. Journal of Soil Biology, 13 (1),39-63.

DOI: 10.22092/SBJ.2025.367936.272
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

مقایسه توانایی تحریک‌کنندگی رشد گیاه جوامع میکروبی اپی‌فایتون و اپی‌پلون در برخی از شالیزارهای استان گیلان

مهدیه لیلاسی مرند[۱]، حسینعلی علیخانی*[۲]، احمد علی پوربابائی[۳] و شایان شریعتی[۴]

۱- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahdiyeh.leyasi@ut.ac.ir

۲- نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: halikhan@ut.ac.ir

۳- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: pourbabaei@ut.ac.ir

۴- گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: shayan_shariati@ut.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۱۸

چکیده

پریفایتون به عنوان جامعه زیستی پیچیده با ترکیب جوامع اتوتروف و هتروتروف، توانایی تنظیم چرخه عناصر غذایی و انرژی را دارد. هدف این مطالعه مقایسه ویژگی‌های محرک رشدی پریفایتون شالیزارها (خاله‌سرا، گیله‌سرا و واجارگاه) با خاک آیش ۵ ساله (ماسال) استان گیلان بود. آزمایشات به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با تیمارهای آزمایشی شامل نمونه‌برداری از اپی‌پلون و اپی‌فایتون سه شالیزار و سطح خاک آیش (۲۱ نمونه) انجام شد. طبق نتایج، تمام آزمایشات در سطح احتمال ۱٪ اختلاف آماری معنی‌دار با خاک آیش داشتند. بالاترین میزان انحلال پتاسیم در طی ۷ روز در محیط مایع BBM در تیمار اپی‌فایتونی شالیزار واجارگاه، به طور میانگین ۳/۴ برابر شاهد بود. بالاترین میزان انحلال فسفات معدنی در محیط کشت اسپربر در طول ۵ روز، به مقدار ۱۱۲۱ mg/L در تیمار اپی‌فایتونی شالیزار واجارگاه ثبت شد. بالاترین میزان فسفات آلی از تیمارهای اپی‌فایتونی شالیزارهای گیله‌سرا و واجارگاه با میانگین ۴۲۷/۲۵ mg/L ثبت شد. تولید سیانید هیدروژن در مدت ۵ روز، در تمام تیمارهای اپی‌فایتونی شالیزار واجارگاه، مقدار بیش‌تری داشت. بالاترین میزان تولید سیدروفور بعد از یک هفته در دو نمونه اپی‌فایتون خاله‌سرا به ترتیب با قطر هاله به کلنی ۱/۶۲ و ۱/۴۱ اندازه‌گیری شد. در آزمایش تولید اکسین (IAA) بعد از سه روز، نمونه اپی‌پلونی واجارگاه با مقدار ۸۸/۹۳ µg/ml بیش‌ترین مقدار را داشت. در آزمون تنش خشکی که به روش فاکتوریل دو فاکتوره (تیمار میکروبی، فشار اسمزی) انجام شد، بالاترین رشد میکروبی در فشارهای اسمزی اعمال شده با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (۰، ۲-، ۵-، ۱۰- و ۱۵- bar)، در نمونه‌های اپی‌پلونی بود که با افزایش فشار اسمزی رشد میکروبی کاهش یافت. طبق نتایج تنش شوری، در شوری ۸٪ فقط قارچ‌ها رشد کردند. کمترین عملکرد به دست آمده به جز تنش خشکی، در تیمارهای خاک آیش بود. نتایج نشان‌دهنده اهمیت بالای کشاورزی در افزایش عملکرد از طریق تأثیر بر جامعه میکروبی فعال می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آیش، پریفایتون، خشکی، شوری، فسفات معدنی و آلی

استناد: لیلاسی مرند، م.، علیخانی، ح.، پوربابائی، ا.ع.، شریعتی، ش.، ۱۴۰۴. مقایسه توانایی تحریک‌کنندگی رشد گیاه جوامع میکروبی اپی‌فایتون و اپی‌پلون در برخی از شالیزارهای استان گیلان. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱)۱۳، ۶۳-۳۹.

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش جمعیت جهان و محدودیت منابع، افزایش تقاضا برای تأمین مواد غذایی وجود داشته و بنابراین استفاده بهینه از منابع موجود بسیار مهم می‌باشد (Etesami and Glick., 2020). این در حالی است که غذای بیش از نیمی از جمعیت دنیا از طریق شالیزارها تأمین می‌شود و سطح زیر کشت آن در سراسر جهان معادل ۱۷×۱۰^۶ ha است (Ali et al., 2020). طبق آمارهای رسمی در سال ۲۰۲۰ مصرف سرانه برنج در ایران ۳۷/۴ Kg و تقاضای سالانه جمعیت ایران برای این محصول حدود ۳/۵۹×۱۰^۶ ton است (FAO., 2020). کل سطح برداشت و تولید برنج در ایران به ترتیب حدود ۵۲۹۰۰۰ ha و ۲/۳*۱۰^۶ ton برآورد شده است (Kouchaki-Penchah., 2023). بر اساس آخرین گزارش، رتبه اول سطح زیر کشت برنج کشور مربوط به استان گیلان و بعد از آن مربوط به استان مازندران است. استان گیلان یکی از مناطق عمده تولید برنج با سطح خالص کل اراضی شالیزاری حدود ۲۱۸۱۳۵ ha می‌باشد (Rezaei et al., 2024). بنابراین توجه به افزایش تولید برنج اهمیت روزافزونی خواهد داشت. اما به دلیل شرایط حاکم بر زمین‌های غرقاب، کارایی مصرف کودهای شیمیایی در شالیزارها کم هست. این مقدار برای مصرف کودهای نیتروژنی ۳۰-۳۵٪ و برای کودهای فسفری ۱۰-۲۰٪ گزارش شده است (Li et al., 2018 ;Zhou et al., 2014). به عنوان مثال آزاد شدن فسفر از خاک به آب سطحی و هدررفت آن و همچنین کاهش فراهمی زیستی این عنصر به دلیل تشکیل فسفات‌های نامحلول، از عواملی هستند که باعث کاهش کارایی مصرف فسفر در شالیزارها می‌شود. این مسأله باعث مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی در شالیزارها با هدف افزایش عمکلرد برنج شده و مشکلاتی مانند آلودگی در آب‌های زیرزمینی، احتمال وجود مواد سمی و فلزات سنگین در محیط آبی، تأثیرات منفی بر آبزیان، افت کیفیت خاک، صدمه به ریشه گیاه و در نهایت کاهش عملکرد و تولید محصولات کشاورزی می‌شود (Suseendran et al., 2020). بنابراین اهمیت استفاده از کودهای زیستی بیش‌تر نمایان شده و می‌توانند باعث کاهش مصرف کودهای شیمیایی استفاده شود. این امر می‌تواند منجر به بهبود رشد گیاه، ایجاد محیط زیست سالم و افزایش باروری خاک شود (Etesami and Glick., 2020).

پریفایتون‌ها[1] یک مجموعه پیچیده میکروبی در اکوسیستم‌های آبی هستند که شامل انواع مختلف جلبک، قارچ، باکتری، پروتوزوآ و متازوآ می‌باشند (Alikhani et al., 2021). پریفایتون‌ها به عنوان یک جامعه زیستی فعال که بیش‌ترین جمعیت آن‌ها مربوط به جامعه فتواتوتروفی می‌باشد، توانایی جذب مقدار زیادی مواد غذایی، تولید آنزیم‌های خارج سلولی را داشته و می‌توانند pH و شرایط رداکس را در طی فتوسنتز با مصرف کربن دی‌اکسید و آزادسازی اکسیژن تغییر دهند (Liu et al., 2016). لایه‌های زیستی[2] پریفایتیک می‌توانند به عنوان تنظیم کننده چرخه عناصر غذایی، جریان انرژی و همچنین بافر زیستی فعال باشند که باعث ایجاد تغییرات پی در پی شکل عناصر غذایی شده و عملاً مخزن/ منبع عناصر غذایی بین خاک و لایه غرقاب بالای آن[3] باشند (Singh et al., 2017). همچنین دارای توانایی پاسخ به شرایط محیطی هستند (Huang et al., 2018). گروه‌بندی پریفایتون‌ها در اکوسیستم‌های آبی بر اساس بستری است که بر روی آن تشکیل می‌شوند که شامل

[1] Periphyton
[2] Biofilms
[3] Overlying Water

اپی‌فایتون[۴] (متصل به گیاهان یا جلبک‌های بزرگ)، اپی‌لیتون[۵] (متصل به مواد سخت)، اپی‌پلون[۶] (متصل به سطح رسوبات خاک)، اپی‌سامون[۷] (روی دانه‌های شن و ماسه) و اپی‌زایلون[۸] (سطح چوب درختان) می‌باشد (Allan and Castillo., 2007).پریفایتون‌ها نقش بسیار مهمی در بالابردن پتانسیل تولید اکوسیستم‌های آبی/ غرقاب داشته و همچنین باعث ایجاد تعادل اکولوژیکی می‌شوند که این فرآیندها به دلیل دخالت لایه زیستی پریفایتونی در چرخه عناصر غذایی، محصولات اولیه این اکوسیستم‌ها، بهبود تنوع زیستی و فعالیت‌های بیوژئوشیمیایی انجام می‌گیرد (Alikhani et al., 2021). در لایه‌های زیستی، تجمع عناصر غذایی و انتقال افقی ژن‌ها بین ریزجانداران حاضر در لایه، منجر به افزایش مقاومت بیوفیلم و اجزای میکروبی آن از تنش‌ها، شرایط نامساعد محیطی و همچنین ترکیبات سمی شده، که این عامل باعث ایجاد استقرار پایدار در شرایط ناپایدار می‌شود (Sun et al., 2022 ;Rummel et al., 2017). از طرفی مواد پلی‌مری برون سلولی تولید شده در این زیست لایه، دارای ترکیبات آلی متنوع مثل پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و مواد هیومیک هستند (Naveed et al., 2019). از عملکردهای این مواد پلی‌مری می‌توان به تولید کربن آلی، عناصر غذایی برای ریزجانداران و ایجاد شرایط دفاعی برای تمام ساکنین این لایه در برابر تنش‌ها اشاره کرد (Decho and Gutierrez., 2017; Borah et al., 2018). بنابراین این تنوع زیستی بسیار قدرتمند می‌تواند شامل باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه باشد و به عنوان یک کود زیستی عمل کند. سال‌های زیادی است که نقش بسیار قابل توجه باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه به خوبی شناخته شده است و در علم کشاورزی به صورت کود زیستی در جهت افزایش عملکرد و تولید محصولات مختلف کشاورزی به کار گرفته می‌شود. میکروفلور محرک رشد گیاه با مکانیسم‌هایی مانند تولید ایندول استیک اسید (Duca and Glick., 2020)، ترشح سیدروفور (Guo et al., 2020; Kour et al., 2013) انحلال کانی‌های نامحلول فسفر (Tian et al., 2021) و تولید سیانید هیدروژن (Naziya et al., 2020; Farhat et al., 2023) می‌توانند منجر به بهبود رشد گیاه و در نتیجه افزایش عملکرد شوند.Luو همکاران (2017a,b) با شبیه‌سازی شرایط شالیزار، به بررسی تأثیر پریفایتون بر جوانه‌زنی، رشد بذر برنج و دسترسی فسفر پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد، افزایش شاخص جوانه‌زنی، کنترل علف‌های هرز، رشد بهتر گیاه برنج و افزایش دسترسی زیستی آن به فسفر در حضور پریفایتون انجام شد. مطالعات Haghani و همکاران (2024) نیز که با هدف بررسی پتانسیل پریفایتون‌های غنی شده با باکتری‌های حل کننده فسفات (شباهت ۹۹/۸۶٪ به *Bacillus Cereus*) بر روی ویژگی‌های رشدی و عملکردی برنج انجام شد، نشان داد پریفایتون غنی شده می‌تواند به عنوان کود زیستی کنترل شده باشد. به طوری‌که در مراحل رشد ابتدایی گیاه، هدر رفت فسفر کاهش (به دلیل جذب در ساختار پریفایتون) و در زمان نیاز بیش‌تر گیاه، دسترسی آن به فسفر را افزایش (تجزیه پریفایتون و آزادسازی عناصر) می‌دهد.انجام مطالعات مرتبط با ویژگی‌های محرک رشد گیاه توسط پریفایتون‌ها در سراسر جهان، محدود به مطالعات توانایی انحلال فسفر بوده و در موارد معدود به تأمین نیتروژن و انحلال پتاسیم پرداخته شده است. اما در زمینه دیگر ویژگی‌های محرک رشدی این جامعه میکروبی هیچ مطالعه‌ای انجام نشده است. بنابراین بررسی این ویژگی‌ها می‌تواند بسیار مهم بوده و در صورت موفقیت،

[۴] Epiphyton
[۵] Epilithon
[۶] Epipelon
[۷] Epissamon
[۸] Epixylon

راه‌کاری مفید برای استفاده از آن به عنوان کود زیستی باشد. از علل دیگر اهمیت و ضرورت این مطالعه می‌توان به مهم بودن برنج در سبد غذایی مردم ایران و همچنین تمرکز شالیزارهای کشور در استان‌های شمالی اشاره کرد. این عوامل باعث افزایش نیاز به کشت زمین‌های آیش می‌شود. بنابراین مقایسه توانایی پریفایتون حاضر در شالیزار و جوامع میکروبی خاک آیش در زمینه ویژگی‌های محرک رشدی گیاه، می‌تواند بسیار مهم باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های مورد استفاده برای این پژوهش در ابتدای تیر ماه سال ۱۴۰۱ که اکثراً پریفایتون در شرایط بلوغ خود است (۱/۵ ماه بعد از شروع رشد پریفایتون)، از بخش‌های مختلف استان گیلان تهیه شد نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل نمونه اپی‌پلون (سطح خاک تا عمق ۵ cm) و اپی‌فایتون (پریفایتون‌های معلق در آب که اکثراً از جلبک‌های بزرگ‌تر برای استقرار استفاده می‌کنند) جمع‌آوری شده از شالیزارهای واقع در روستاهای خاله‌سرا، گیله‌سرا و واجارگاه و نمونه سطح خاک از زمین آیش با هدف مقایسه توانمندی جوامع میکروبی موجود در آن از نظر ویژگی‌های محرک رشدگیاه واقع در ماسال بود (جدول ۱). لازم به ذکر است برای نمونه‌برداری از اپی‌پلون‌ها، وسیله‌ای به شکل مکعب مستطیل با ارتفاع ۵ cm (تا فقط سطح خاک دارای اپی‌پلون جمع‌آوری شود) طراحی شد که قسمت جلوی آن برای ورود نمونه کاملاً باز و قسمت انتهای مکعب به میزان ۱ cm باز بود تا بتوان آب موجود در نمونه برداشته شده را خارج کرد. اما برای نمونه‌برداری اپی‌فایتون‌ها از بطری‌های ضدعفونی شده استفاده شد. حجم هر نمونه اپی‌پلون و اپی‌فایتون، ۲۵۰ ml بود. انجام نمونه‌برداری از هر زمین در سه تکرار انجام گرفت و در کل تعداد ۲۱ نمونه در جعبه یخ با دمای ۴ °C به آزمایشگاه منتقل شد.

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری

	نامگذاری در آنالیزها	طول و عرض جغرافیایی
شالیزار ۱ (خاله‌سرا)	PF1 Eph (1), PF1 Eph (2), PF1 Eph (3), PF1 Ep (1), PF1 Ep (2), PF1 Ep (3)	X= ۴۸° ۵ ′ ۵۹ ″ Y= ۳۷° ۳۱ ′ ۴۱ ″
شالیزار ۲ (گیله سرا)	PF2 Eph (1), PF2 Eph (2), PF2 Eph (3), PF2 Ep (1), PF2 Ep (2), PF2 Ep (3)	X= ۴۹° ۱۱ ′ ۷ ″ Y= ۳۷° ۱۶ ′ ۲۳ ″
شالیزار ۳ (واجارگاه)	PF3 Eph (1), PF3 Eph (2), PF3 Eph (3), PF3 Ep (1), PF3 Ep (2), PF3 Ep (3)	X= ۵۰° ۴۹ ′ ۲۴ ″ Y= ۳۷° ۴۹ ′ ۳ ″
زمین آیش (ماسال)	FF (1), FF (2), FF (3)	X= ۴۹° ۱۳ ′ ۷ ″ Y= ۳۷° ۲۷ ′ ۲۳ ″

در جدول فوق، PF (Paddy Field) نشان دهنده شالیزار، Ep (Epipelon) نشان دهنده نمونه‌های اپی‌پلونی، Eph (Epiphyton) نمونه‌های اپی‌فایتونی، FF (Fallow Field) نمونه‌های خاک آیش، اعداد ۱، ۲ و ۳ نشان دهنده شماره شالیزار، (۱)، (۲) و (۳) نشان دهنده تکرارهای مربوط به هر نمونه می‌باشد.

بازکشت

نمونه‌ها (شامل اپی‌پلون، اپی‌فایتون و خاک آیش) بعد از انتقال به آزمایشگاه، به میزان ۵۰ ml در ۵۰۰ ml محیط کشت BBM[۹] استریل (جدول ۲) (Haghani et al., 2024) مایه‌زنی شدند. لازم به ذکر است نمونه خاک آیش در ابتدا توسط آب مقطر به حالت فوق اشباع مشابه نمونه‌های پریفایتون (حدود ۱ cm آب روی سطح خاک) درآمد تا بتوان به میزان برابر با نمونه‌های پریفایتونی مایه‌زنی کرد. نمونه‌های تلقیح شده تا زمان بلوغ پریفایتون‌ها که معمولاً بین سه تا شش هفته به طول می‌انجامد، نگهداری شدند تا برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار بگیرند. در طول زمان رشد میکروبی برای ایجاد شرایط

[۹] Bold's Basal Medium

مناسب‌تر در انکوباتور، طبق جدول ۳ نگهداری و از تکان‌ها دستی برای هوادهی نمونه‌ها استفاده شد.

جدول ۲- محیط کشت BBM

اجزاء محیط کشت	غلظت در محلول مادری (گرم در لیتر آب مقطر)	اضافه کردن به یک لیتر محیط کشت (میلی‌لیتر)
$NaNO_3$	۲۵	۱۰
$MgSO_4.7H_2O$	۷/۵	۱۰
NaCl	۲/۵	۱۰
K_2HPO_4	۷/۵	۱۰
KH_2PO_4	۱۷/۵	۱۰
$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	۰/۵	۱۰
NaEDTA	۵۰	۱
KOH	۳۱	۱
$FeSO_4.\ 7H_2O$	۴/۹۸	۱
H_3BO_3	۱۱/۴۲	۱
$ZnSO_4.7H_2O$	µM۰/۳۰۷	۱
$MnCl_2.4H2O$	µM۷/۲۸	۱
MoO_3	µM ۴/۹۳	۱
$CuSO_4.5H2O$	µM ۶/۲۹	۱
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	µM ۱/۶۸	۱

جدول ۳- شرایط مناسب برای رشد پریفایتون

دما (درجه سلسیوس)	شدت نور (لوکس)	طول دوره روشنایی/خاموشی (ساعت)
۳۰-۲۸	۵۰۰۰	۱۲/۱۲

ارزیابی کمی انحلال پتاسیم

برای این آزمون از محیط کشت BBM اصلاح شده دارای میکای موسکویت[۱۰] و فلوگوپیت[۱۱] استفاده شد. برای این منظور نمک‌های KH_2PO_4 و K_2HPO_4 از محیط کشت حذف و به مقدار ۲/۵ g/L کانی‌های آون خشک شده به محیط کشت اضافه شدند. ۱۰ ml مایه تلقیح در ۱۰۰ ml محیط کشت، مایه‌زنی شده و شرایط نگهداری نمونه‌ها مشابه شرایط نور، دما و طول روشنایی/خاموشی فوق انجام شد (جدول ۳). در نمونه شاهد نیز تمام شرایط یکسان بوده اما به جای ۱۰ ml مایه تلقیح، ۱۰ ml آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت ۷ روز، پتاسیم محلول توسط فلیم فتومتر (Jenway PFP7) اندازه‌گیری شد (Lu et al., 2016).

ارزیابی کمی انحلال فسفر از منبع معدنی

برای انجام این آزمون از محیط کشت اسپربر مایع (شامل: ۱۰ g گلوکز، ۰/۵ g عصاره مخمر، ۰/۱۴ g کلرید کلسیم، ۰/۳۲ g سولفات منیزیم در ۱۰۰۰ ml آب مقطر) به میزان ۱۵ ml در ارلن‌های ۵۰ ml استفاده شد که منبع فسفر معدنی نامحلول آن تری کلسیم فسفات به میزان ۲/۵ g/L بود. نمونه‌های پریفایتون بازکشت شده (به مدت حداقل سه

[۱۰] Muscovite

[۱۱] Phlogopite

هفته) به مقدار µl ۲۵ در آن مایه‌زنی و در دمای °C ۲۸ به مدت ۱۲۰ ساعت شیک (g ۱۲۵) شدند. در مرحله بعد با سانتریفیوژ نمونه‌ها (rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه)، به ml ۱ محلول شفاف رویی، ml ۳ آب مقطر و ml ۱ آمونیوم مولیبدو وانادات اضافه و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، توسط اسپکتروفتومتر مدل Unico UV-2100 با طول nm ۴۷۰ قرائت شدند. (Wang et al., 2018). برای نمونه شاهد تمام مراحل بدون مایه‌زنی میکروبی انجام شد. لازم به ذکر است از K_2HPO_4 برای تهیه محلول‌های استاندارد ۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۲ ppm استفاده شد. شدت رنگ در این استانداردها قرائت، منحنی کالیبراسیون رسم شده و سپس شدت جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

ارزیابی کمی انحلال فسفر از منبع آلی

محیط کشت مورد استفاده در این آزمون، محیط ISP[۱۲] که حالت اصلاح شده محیط کشت اسپربر است، استفاده شد. در این محیط به جای منبع تری کلسیم فسفات، g/L ۲/۵ منبع اینوزیتول هگزافسفات استفاده شد. ادامه مراحل بعد، مانند آزمون انحلال فسفات معدنی انجام و توسط اسپکتروفتومتر مدل Unico UV-2100 با طول موج nm ۴۷۰ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Wang et al., 2018). تهیه استاندارد و تیمار شاهد نیز مانند انحلال فسفر معدنی انجام شد.

ارزیابی توان تولید سیدروفور

برای انجام این آزمون از محیط کشت CAS-Agar استفاده شد که دارای چهار محلول معرف رنگی (یک mmol $FeCl_3$-$6H_2O$ در HCL ۱۰ mmol، CAS ۵۰ ml، ۴۰ ml محلول HDTMA) ، محلول بافر (g ۳۰/۲۴ بافر Pipes، ۷۵۰ ml محلول حاوی g ۰/۳ H_2PO_4، g ۰/۵ NaCl، g ۱ NH_4Cl و g ۱۵ آگار)، محلول غذایی (g ۲ گلوکز، g ۲ مانیتول، mg ۴۹۳ $MgSO_4.7H_2O$، mg ۱۱ $CaCl_2$، mg ۱/۱۷ $MnSO_4.7H_2O$، mg ۱/۴ H_3BO_3، mg ۰/۰۴ $CuSO_4.5H_2O$، mg ۱/۲ $ZnSO_4.2H_2O$، mg ۰/۱ $Na_2MoO_4.2H_2O$ و ml ۷۰ آب مقطر) و محلول کازآمینواسید (ml ۳۰ محلول کازآمینواسید ۱۰٪) است. محلول‌های فوق به طور جداگانه تهیه، استریل و مخلوط شدند. از سوسپانسیون‌های میکروبی به میزان µl ۵ میکرولیتر در وسط پتری قطره‌گذاری و در دمای °C ۲۸ درجه سلسیوس به مدت یک هفته انکوبه شدند. تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی نشان‌دهنده تولید سیدروفور بود که اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی در اطراف کلنی باکتری معیار ارزیابی سیدروفور بود (Twisha and Minocheherhomji., 2018).

ارزیابی توان تولید ایندول استیک اسید

برای سنجش توان تولید این هورمون از روش رنگ‌سنجی با محلول سالکوفسکی (ml ۴۹/۳ اسیدپرکلریک ۷۱٪، ml ۲ محلول mol/L ۰/۵ کلرور آهن سه ظرفیتی) استفاده شد. برای این کار از محیط کشت LB (شامل: g ۱۰ تریپتون، g ۵ عصاره مخمر و g ۵ سدیم کلرید) دارای تریپتوفان به میزان mg/Kg ۱۰۰ ، استفاده شد. µl ۵۰ از سوسپانسیون میکروبی به ml ۲۵ محیط کشت منتقل شده و نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۲۸ با سرعت g ۱۲۰ شیک شدند. ml ۳۰ از سوسپانسیون میکروبی برداشته و با دور rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی به نسبت ۲ به ۱ با محلول سالکوفسکی ترکیب شده و توسط اسپکتروفتومتر مدل Unico UV-2100 با طول موج nm ۵۳۵ قرائت شد. (Castellano-Hinojosa., 2017). برای ترسیم منحنی استاندارد غلظت‌های مختاف از IAA (۰، ۲/۵،

[۱۲] Inositol Sperber

۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ mg/L) به روش فوق با محلول سالکوفسکی تیمار و مقدار جذب نوری آن‌ها قرائت شد.

ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن

برای این منظور محیط کشت TSA[۱۳] (۱۵ g Pancreatic digest of casein، ۵ g Peptic digest of soybean meal، ۵ g سدیم کلرید، ۱۵ g آگار، ۱ L آب مقطر)، غنی شده با گلایسین (۴/۴ g/L) استفاده و در هر پلیت ۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی مایه‌زنی شد. در داخل درب پلیت یک عدد کاغذ صافی آغشته به محلول معرف (شامل: کربنات کلسیم ۲٪ و اسید پیکریک ۰/۵ ٪) قرار گرفت. ظروف پتری به طول کامل درزگیری شدند تا تمام گاز سیانید هیدروژن تولید شده در داخل پتری محبوس شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ °C نگهداری شدند. سپس تغییر رنگ کاغذ صافی به کرمی، نارنجی، قهوه‌ای روشن و آجری بررسی شد (Donate-Correa et al., 2004).

ارزیابی تحمل شوری

برای این کار از محیط کشت BBM مایع دارای غلظت‌های (۰٪ و ۸٪) نمک NaCl (مازاد بر میزان NaCl مصرفی در داخل خود محیط کشت BBM) استفاده شد. در این آزمایش به ۲۵ ml محیط کشت، ۵۰µl از سوسپانسیون میکروبی اضافه و بعد از قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ °C به مدت ۵ روز، رشد آن‌ها بر اساس کدر شدن محیط و مقایسه با نمونه شاهد بدون مایه‌زنی میکروبی، مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای بررسی بیش‌تر، کشت در محیط کشت جامد BBM نیز انجام شد. برای این کار سوسپانسیون میکروبی به روش قطره‌گزاری به میزان ۷ µl در پتری‌های دارای نمک ۰٪ و ۸٪، مایه‌زنی شد و بعد از گذشت ۵ روز میزان رشد در پلیت‌ها بررسی شد (Castiglione et al., 2021).

ارزیابی تحمل به تنش کم آبی

برای ارزیابی میزان تحمل به سطوح مختلف خشکی از پلی‌اتیلن‌گلیکول[۱۴] (با استفاده از PEG6000) استفاده شد تا فشار اسمزی با ۰، ۲-، ۵-، ۱۰- و ۱۵- bar در محیط کشت BBM ایجاد شود. ۵ ml نمونه میکروبی در ۵۰ ml محیط کشت مایه‌زنی شد و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر دورانی در دمای ۲۹ °C قرار گرفت. میزان رشد در این محیط کشت‌ها، با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۶۳۰ nm توسط اسپکتروفتومتر مدل Unico UV-2100 تعیین شد (Noha et al., 2022).

آنالیز آماری

نتایج تمام آزمون‌های انجام شده (به غیر از آزمون تحمل تنش کم آبی) در این بخش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار SAS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون تحمل تنش کم آبی به روش آزمایش فاکتوریل (فاکتورهای آزمایش شامل ۱- تیمارهای میکروبی در ۲۲ سطح (۹ نمونه اپی‌فایتون، ۹ نمونه اپی‌پلون، ۳ نمونه خاک آیش و شاهد)، ۲- تیمار فشار اسمزی اعمال شده در چهار سطح ۰، ۲-، ۵-، ۱۰- و ۱۵-) بود. مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی کمی انحلال پتاسیم

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) میزان پتاسیم محلول توسط تیمارهای آزمایشی در محیط دارای کانی

[۱۳] Tryptic Soy Agar

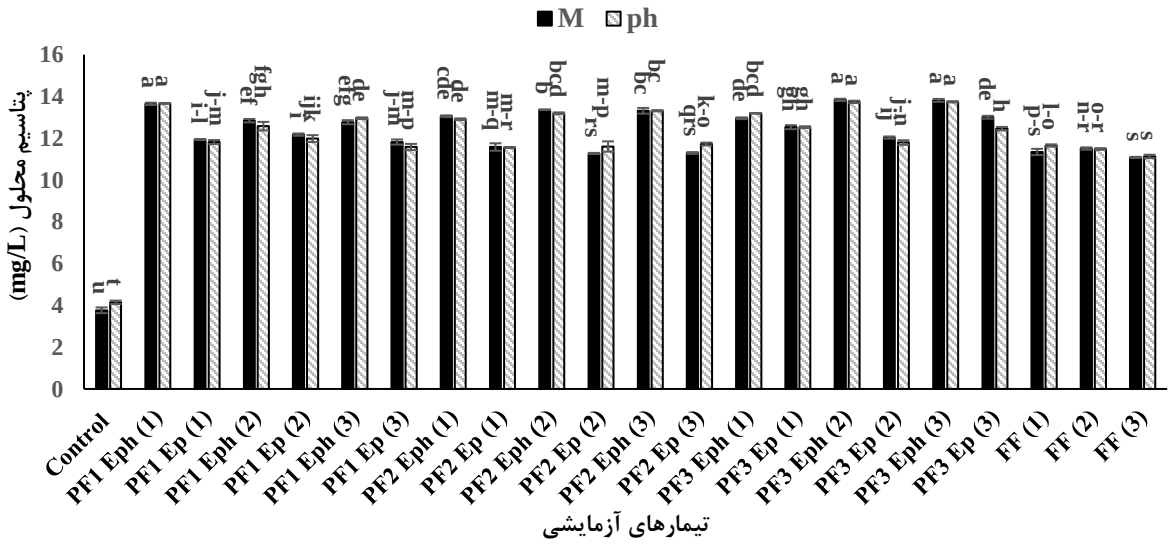
[۱۴] Polyethylene glycol (PEG)

نامحلول پتاسیمی در سطح احتمال ۹۹ درصد ($P < ۰/۰۱$) معنی‌دار بود. تمام نمونه‌ها در تیمارهای موسکویتی و فلوگوپیتی دارای تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به شاهد هستند. به طوری‌که بالاترین میزان پتاسیم محلول در بین تیمارها مربوط به پریفایتون PF3 Eph(3)، PF1 Ep(1) و PF3 Eph(2) بود که در تیمارهای موسکویتی به ترتیب ۱۳/۸۱، ۱۳/۶۴ و ۱۲/۷۶ و در تیمارهای فلوگوپیتی به ترتیب ۱۳/۷۴، ۱۳/۶۶ و ۱۲/۹۵ mg/L می‌باشد. از نظر تفاوت انحلال در بین تیمارهای فلوگوپیتی و موسکویتی به غیر از پریفایتون‌های PF2 Ep(2)، PF2 Ep(3)، PF3 Ep(3) و FF(1) بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری باهم ندارند اما در کل میزان انحلال در اکثر نمونه‌های دارای فلوگوپیت بالاتر از تیمارهای دارای موسکویت می‌باشد (شکل ۱). این نتیجه در تیمار شاهد به وضوح دیده می‌شود که دلیل این مسأله مربوط به انحلال پذیری بالاتر و ناپایداری بیش‌تر فلوگوپیت نسبت به موسکویت می‌باشد. آزمایش صادقی‌آزاد و همکاران هم نشان داد که سویه‌های قارچی مورد استفاده در آزمایش قادر به آزادسازی پتاسیم از سیلیکات‌ها بودند اما بیش‌ترین میزان رهاسازی پتاسیم از منابع مورد استفاده به ترتیب بیوتیت، فلوگوپیت، ایلایت و موسکویت بود (صادقی‌آزاد و همکاران، ۱۳۹۷). همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود کمترین میزان انحلال پتاسیم متعلق به تیمارهای مایه‌زنی شده با خاک آیش می‌باشد که با شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار است و بالاترین مقادیر پتاسیم محلول در پریفایتون‌های معلق در آب (اپی‌فایتون‌ها) بوده است. می‌توان این‌گونه استدلال کرد، چون این گروه از پریفایتون‌ها در تمام قسمت‌های محیط کشت رشد می‌کنند، احتمالاً دسترسی بالاتری به کانی‌های نامحلول پیدا کرده و از این طریق باعث افزایش میزان انحلال می‌شوند. مطالعات متعددی ریزجانداران مفید خاک مانند باکتری‌های ساپروفیت، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها برای انحلال پتاسیم از مکانیسم‌هایی مانند تولید اسیدهای آلی و معدنی، پلی‌ساکاریدها، کلاته کردن و تبادل استفاده می‌کنند (Sadeghi et al., 2017 ; Etesami et al., 2017). از این بین گونه‌های میکروبی مثل *Pisolithus*، *Cenococcum*، *Bacillus*، *Acidithiobacillus*، *Pseudomonas*، *Aspergillus* و *Clostridium* در انحلال پتاسیم بسیار مؤثر بوده و باعث افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند (Liu et al., 2012; Meena et al., 2015; Sarikhani et al., 2018).

جدول۴- تجزیه واریانس پتاسیم محلول در محیط BBM

منابع تغییر	درجه آزادی	K
تیمار	۴۳	۱۱/۶۹۲**
خطای آزمایشی	۸۸	۰/۲۵۸
ضریب تغییرات (٪)		۱/۳۳۵

**معنی‌دار در سطح ۱٪



شکل ۱- پتاسیم محلول محیط کشت BBM (mg/l) از منبع M (موسکویت) و Ph (فلوگوپیت)
حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن)

ارزیابی کمی انحلال فسفر از منبع معدنی

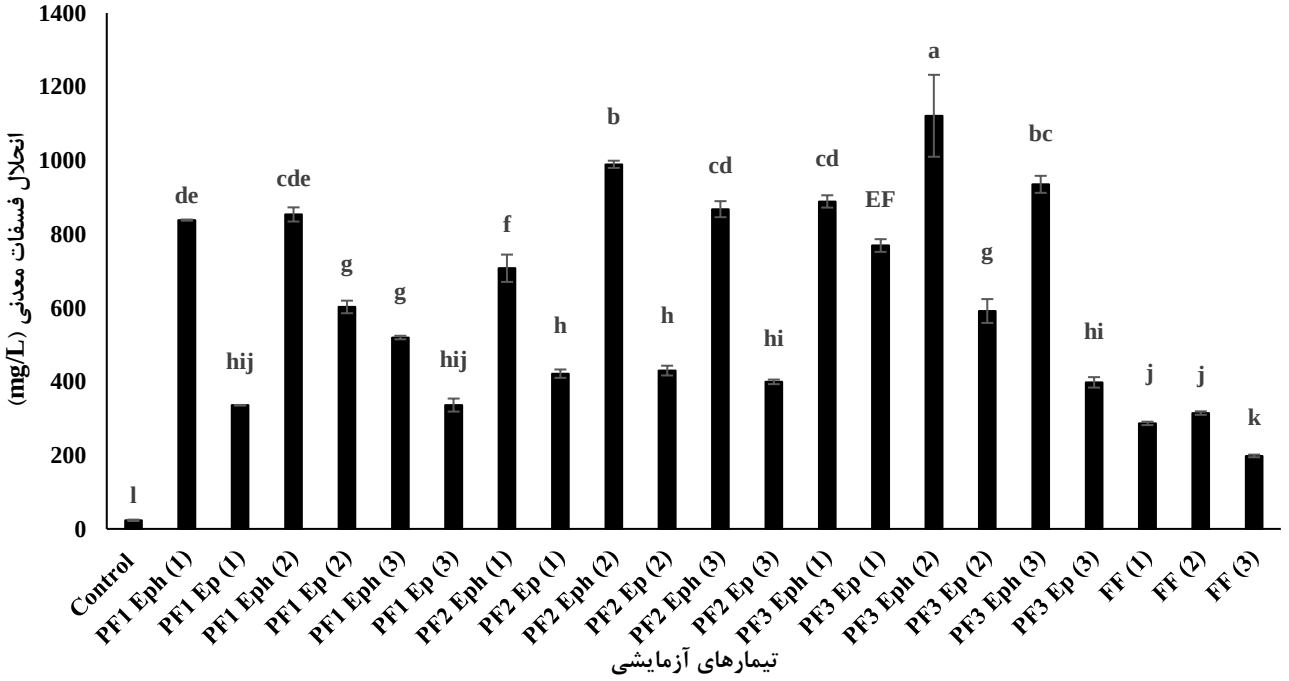
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) میزان انحلال فسفر از منبع معدنی تری کلسیم فسفات توسط تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال ۹۹ درصد ($P < ۰/۰۱$) معنی‌دار بود. با توجه به شکل (۲)، پریفایتون شماره PF3 Eph(2) با ۱۱۲۱ mg/L بیش‌ترین میزان انحلال فسفر را داشته که مربوط به اپی‌فایتون شالیزار واجارگاه بود و با بقیه تیمارها دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد. پریفایتون PF2 Eph(2) و PF3 Eph(3) به ترتیب با مقادیر ۹۸۹ و ۹۳۵ mg/L در رده بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان قدرت انحلال فسفر نامحلول معدنی در نمونه‌های خاک آیش (با میانگین ۲۶۶ mg/L) اندازه‌گیری شد. تمام نمونه‌های اپی‌فایتونی نسبت به نمونه اپی‌پلونی همان نقطه نمونه‌برداری (به عنوان مثال PF1 Eph(1) در مقابل PF1 Ep(1)) میزان انحلال پتاسیم بیش‌تری داشتند و دارای اختلاف آماری معنی‌دار با هم هستند. علت این امر می‌تواند به دلیل معلق بودن اپی‌فایتون‌ها در آب مربوط باشد که امکان ارتباط با فضای بیش‌تری را به آن‌ها داده و در نتیجه باعث افزایش انحلال شود. عامل دیگر این نتیجه می‌تواند به ترکیب جمعیتی متفاوت اپی‌پلون‌ها و اپی‌فایتون‌ها مربوط باشد. در پژوهشی با شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در مزارع شالیزاری هند، مشخص شد بیش‌ترین باکتری‌های جداسازی شده از جنس *Bacillus, Burkholderia, Paenibacillus* sp. بودند. مهم‌ترین ساز و کار باکتری‌ها برای انحلال فسفات تولید اسیدهای آلی از نوع گلوکونیک، سیتریک، تارتاریک، اگزالیک، سوکسونیک و فورمویک اسید می‌باشد (Chawngthu et al., 2020). Yin و همکاران (2015) عنوان کردند از جدایه‌های قارچی مهم در انحلال فسفات‌های نامحلول می‌توان به *Penicillium* و *Aspergillus* اشاره کرد که میزان انحلال کلسیم فسفات از محیط مایع را بین ۱۴۰۰–۱۸۰۰ mg/L گزارش کردند. Qarni و همکاران (2021) نیز میزان انحلال تری‌کلسیم فسفات را برای دو جدایه جدایه *Bacillus firmus* و *Bacillus safenis* ۸۸/۶۷ و ۶۷/۹۱ mg/L گزارش کردند. از بین این میکرواورگانیسم‌ها، قارچ‌های حل‌کننده فسفات توانایی بالاتری نسبت به باکتری‌ها دارند که می‌تواند به دلیل ساختار هیف و توان نفوذ در اعماق بیش‌تر خاک باشد (Kouhad et al., 2011). تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز مهم‌ترین مکانیسم قارچ‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد (Doilom et al., 2020). گزارش شده است قارچ‌های حل کننده فسفات

می‌توانند توانایی‌های دیگری از جمله تولید اکسین، سیدروفور و سیانید هیدروژن نیز داشته باشند (Naziya et al., 2020; Inaji et al., 2020; Meents et al., 2019; Debasis et al., 2020). باکتری‌های حل کننده فسفات موجود در مجموعه پرفایتون می‌توانند ترکیبات فسفات کلسیم را به طور مؤثر حل کرده و آن‌ها را از فرم رسوب به شکل فعال درآورند (Shujie et al., 2020; Yang et al., 2021). در مطالعه‌ای که به جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات از جوامع پریفایتونی پرداخته بودند، نشان داد بالاترین میزان توان انحلال فسفات از منبع تری کلسیم فسفات مربوط به یک جدایه قارچی (جداسازی شده از اپی‌فایتون و به میزان ۸۱۸ ±۷ mg/L) بود. نتیجه شناسایی مولکولی این جدایه قارچی نشان داده بود که به سویه *Talaromyces miniluteu* بیش‌ترین شباهت را داشت (Alikhani et al., 2023). در مطالعه Fallah و همکاران (2024) که به بررسی کارایی حل‌کنندگی فسفات معدنی چند سویه سیانوباکتر پرداختند، نتایج نشان داد بیش‌ترین قدرت انحلال برای تری‌کلسیم فسفات ۴۷/۵ mg/L و مربوط به سویه Microcystis sp. بود.

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس صفات فسفر معدنی، فسفر آلی، سیدروفور و ایندول استیک اسید

		میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	انحلال فسفر معدنی	انحلال فسفر آلی	سیدروفور	ایندول استیک اسید
تیمار	۲۱	۲۵۸۲۰۳/۱۹**	۴۰۱۵۰/۷۱**	۰/۲۷**	۷۲۹/۲۶**
خطای آزمایشی	۴۴	۲۴۶۳/۸۱	۲۶۱/۰۶	۰/۰۰۸	۳/۸۶
ضریب تغییرات (٪)		۸/۵۱	۷/۱۸	۸/۰۵	۴/۸۹

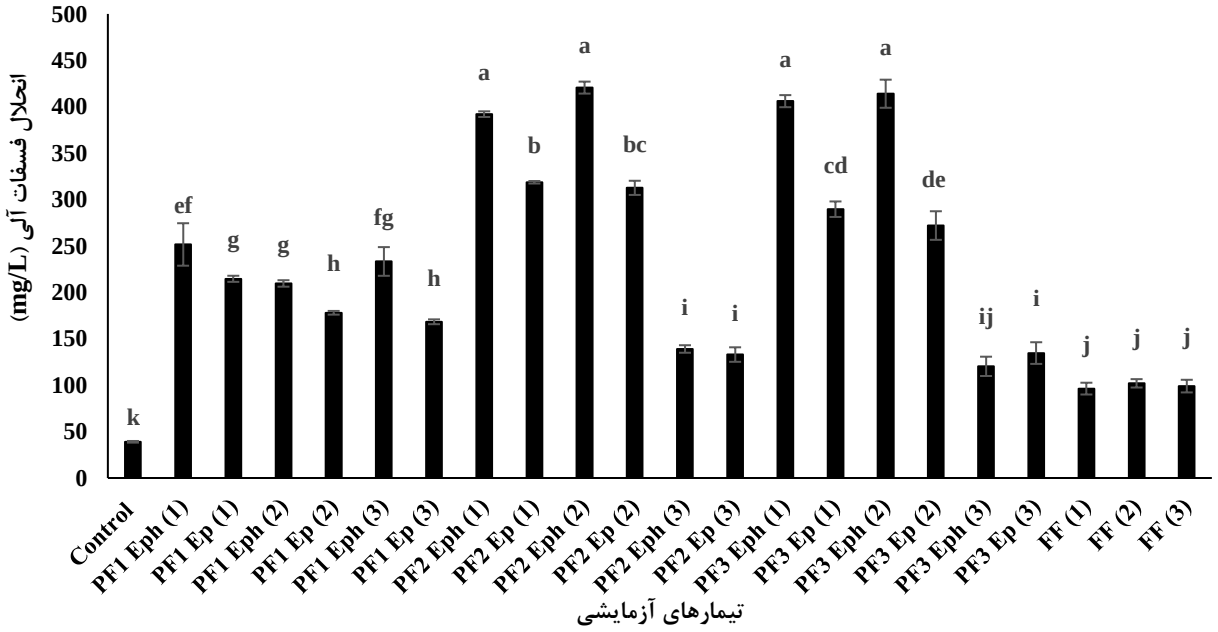
**معنی‌دار در سطح ۱٪



شکل ۲- انحلال فسفات معدنی (mg/l) در محیط کشت اسپربر دارای تری کلسیم فسفات، حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن)

ارزیابی کمی انحلال فسفر از منبع آلی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) میزان انحلال فسفر از منبع آلی اینوزیتول هگزافسفات توسط تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال ۹۹ درصد ($P < ۰/۰۱$) معنی‌دار بود. بالاترین میزان انحلال در پریفایتون‌های شماره PF2 Eph(2)، PF3 Eph(1)، PF3 Eph(2) و PF2 Eph(1) (مربوط به نمونه‌های اپی‌فایتونی شالیزارهای خاله‌سرا و گیله‌سرا) به ترتیب با مقادیر ۴۹۰، ۴۱۹، ۴۱۰ و ۳۹۰ mg/L به دست آمد و با هم در یک گروه آماری قرار گرفتند. نمونه FF(1) مربوط به خاک آیش کمترین توان انحلال فسفر آلی را داشت که با FF(2)، FF(3) (خاک آیش) و PF3 Eph(3) در یک گروه آماری قرار گرفتند. در مطالعات متعددی گزارش شده است که پریفایتون نقش خیلی مهمی در چرخه فسفر داشته و می‌تواند یک منبع بالقوه از فسفر باشد (Weigelhofer et al., 2018). پریفایتون می‌تواند با تولید فسفاتازهای قلیایی فسفات‌های نامحلول آلی را به فرم قابل استفاده معدنی تبدیل کند (Lu et al., 2014). Shujie و همکاران (2021) بیان کردند فسفاتازهای لایه پریفایتون دارای ویژگی‌های پیچیده‌تری نسبت به جوامع تک میکروبی و تک گونه‌ای بوده و در آن فسفتازهای قلیایی بیش‌تر از فسفاتازهای اسیدی است. همچنین گزارش کردند هیدرولیز اینوزیتول هگزافسفات توسط لایه زیستی پریفایتون بسیار شدید بوده و همین امر اهمیت بیش‌تر پریفایتون برای فراهمی زیستی فسفر را نشان می‌دهد.

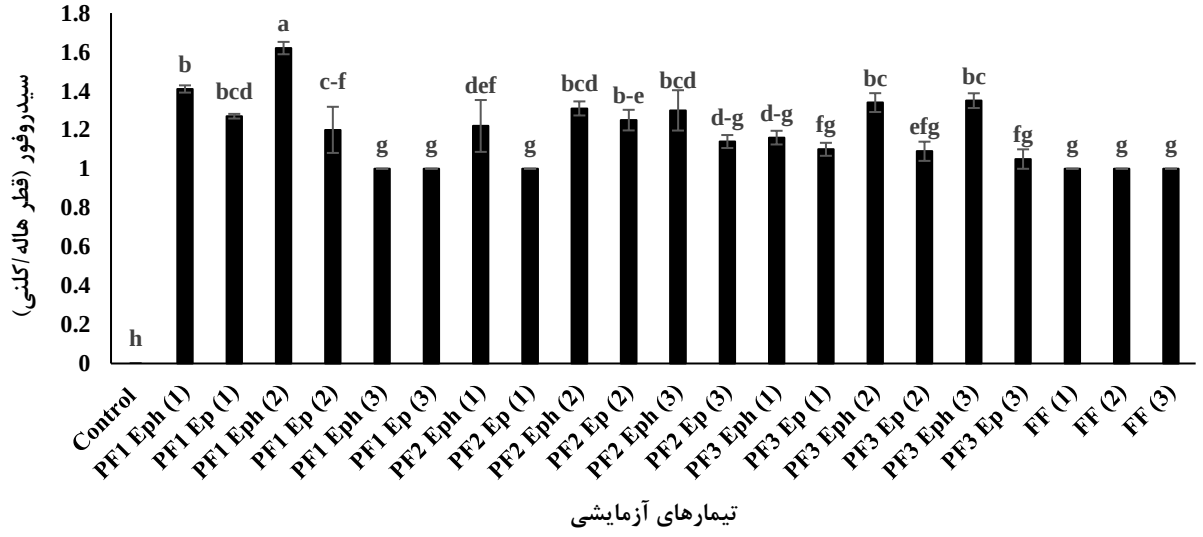


شکل ۳- انحلال فسفات آلی (mg/l)در محیط کشت اسپربر دارای اینوزیتول هگزافسفات، حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن)

ارزیابی توان تولید سیدروفور

تولید سیدروفور که ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی در محیط کشت و در نتیجه تعیین نسبت قطر هاله به کلنی به دست آمده است، نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد میزان تولید سیدروفور توسط تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال ۹۹ درصد ($P < ۰/۰۱$) معنی‌دار بود. نشان داد بالاترین میزان سیدروفور در تیمار PF1 Eph(2) و PF1 Eph(1) به ترتیب با نسبت ۱/۶۲ و ۱/۴۱ به دست آمد. این تیمارها متعلق به شالیزار خاله‌سرا بوده و هر دو از نمونه‌های اپی‌فایتون

می‌باشند. به غیر از تیمار PF1 Ep(2) که تشکیل هاله نارنجی در آن دیده نشد و هیچ تفاوتی بین نمونه‌های اپی‌فایتون و اپی‌پلون وجود ندارد، در بقیه تیمارها، نمونه‌های اپی‌فایتونی قطر هاله به کلنی بیش‌تری نسبت به نمونه‌های اپی‌پلونی داشتند. تیمارهای خاک آیش ((FF(1)، FF(2) و FF(3)) نیز هاله‌ای در اطراف کلنی‌ها تشکیل نشد. در مطالعه Beheshti (2021) بیش‌ترین قطر هاله به کلنی در آزمون تولید سیدروفور در باکتری‌ها با نسبت ۳/۷ و کمترین آن با نسبت یک بود که توانایی در تولید سیدروفور نشان ندادند. در نمونه‌های قارچی بالاترین و پایین‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی ۶/۸ و ۱ بود. مطالعه Peek و همکاران (2012) و Saharan و Nehra (2011) گزارش کردند *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus enthracis* سویه‌های تولید کننده سیدروفور هستند. در مطالعه Otadi و همکاران (2025) چهار گروه باکتری *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Bacillus* و *Azospirillum* جداسازی شده از خاک‌های ایران از نظر تولید سیدروفور مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج نشان داد تولید سیدروفور در گروه *Pseudomonas* با بقیه دارای اختلاف آماری معنی‌دار بوده و بیش‌ترین میزان قطر هاله به کلنی ۳/۳۸ ثبت شد.

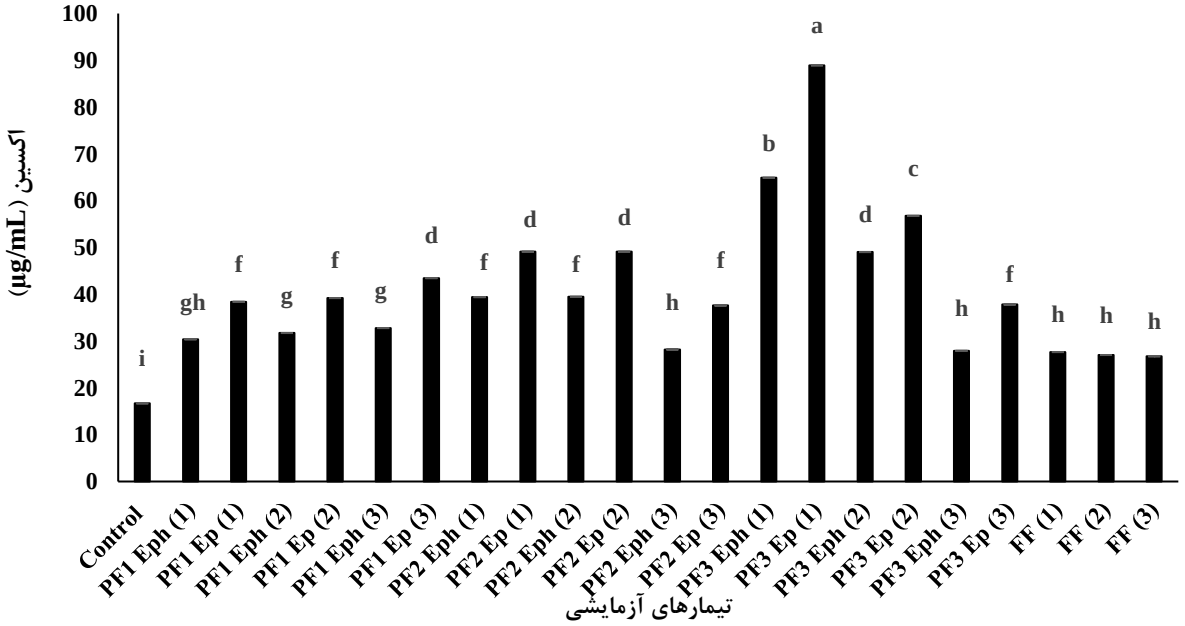


شکل ۴- نتایج قطر هاله به کلنی در تولید سیدروفور، حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن)

ارزیابی توان تولید ایندول استیک اسید

تجزیه واریانس نتایج تولید ایندول استیک اسید (جدول ۵) نشان داد، این صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۱٪ تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. با توجه به شکل (۴) بالاترین میزان تولید ایندول استیک اسید مربوط به نمونه PF3 Ep(1) و بعد از آن PF3 Eph(1) می‌باشد که با هم دارای اختلاف آماری معنی‌دار بوده و هر دو مربوط به شالیزار واجارگاه هستند. کمترین میزان تولید IAA مربوط به تیمار شاهد بود و با تمام تیمارها از نظر آمارای دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. مطالعه Beheshti و همکاران (2022) که به بررسی توان تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط جدایه‌های باکتریایی و قارچی جدا شده از پریفایتون پرداختند، نشان داد بالاترین و پایین‌ترین میزان IAA تولید شده توسط باکتری‌ها به ترتیب ۲۰۵/۷ و ۱۱/۷ µg/ml و در

قارچ‌ها ۳۱۷/۷ و ۴۵ µg/ml می‌باشد. Qarni و همکاران (2021) در دو جدایه *Penicillium* sp. و *Penicillium* Oxalicum میزان تولید هورمون ایندول استیک اسید را ۲۵ و ۲۳ µg/ml گزارش کردند. Bag و همکاران (2022) اعلام کردند بیش از ۸۰٪ باکتری‌های ریزوسفری توان تولید ایندول استیک اسید را دارند که از آن جمله می‌توان به *Azospirillum*، *Azotobacter*، *Enterobacter*، *Pseudomonas* و *Staphylococcus* اشاره کرد.



شکل ۴- تولید ایندول استیک اسید (میکروگرم بر میلی‌لیتر)، حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن)

ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن

نتایج جدول (۶) نشان می‌دهد بالاترین میزان تولید سیانید هیدروژن در تیمارهای PF3 Eph(1)، PF3 Eph(2) و PF3 Eph(3) (شالیزار خاله‌سرا) بود و نمونه‌ها باعث تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ نارنجی شد که نشان دهنده تولید نسبتاً کم سیانیدهیدروژن هستند. سپس نمونه‌های PF1 Eph(1)، PF1 Eph(2)، PF1 Eph(3) (شالیزار واجارگاه) (به رنگ کرمی) که نشان دهنده توان تولید حداقل سیانید هیدروژن می‌باشد، قرار گرفتند. نمونه‌های فوق با نتیجه مثبت در تولید سیانید هیدروژن مربوط به نمونه‌های اپی‌فایتون می‌باشند. Faridian و همکاران (2023) توان تولید سیانید هیدروژن را در تعدادی جدایه قارچی بررسی و بیان کردند تنها ۶/۹۲٪ جدایه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشتند و بالاترین میزان تولید در قارچ *Penicillium* oxalicum مشاهده شد. Prasad و همکاران (2017) گزارش کردند قارچ‌های حل‌کننده فسفات توانایی تولید سیانید هیدروژن را دارند.

جدول۶- نتایج توان تولید سیانید هیدروژن

تیمارهای آزمایشی	رنگ کاغذ صافی	درجه‌بندی
PF1 Eph(3) PF1 Eph(2), PF1 Eph(1),	کرمی	۲
PF2 Eph(2), PF2 Eph(3), PF2 Ep(1), PF1 Ep(1), PF1 Ep(2), PF1 Ep(3), PF2 Eph(1), FF(1), FF(2), FF(3) PF2 Ep(3), PF3 Ep(1), PF3 Ep(2), PF3 Ep(3), PF2 Ep(2),	زرد	۱
PF3 Eph(1), PF3 Eph(2), PF3 Eph(3)	نارنجی	۳

ارزیابی تحمل شوری

نتایج آزمایش (جدول ۷) نشان داد کشت پریفایتون در محیط مایع در غلظت نمک ۰٪ که شرایط طبیعی محیط کشت BBM می‌باشد، شرایط رشد طبیعی بوده و باعث سبز شدن محیط کشت شد. اما در زمان کشت در محیط مایع دارای ۸٪ نمک محیط کشت در تمام تیمارها کدر شد. به همین دلیل برای بررسی بیش‌تر در محیط جامد بدون نمک و دارای نمک ۸٪ کشت دوباره انجام شد. نتایج نشان داد در محیط جامد بدون نمک میکروارگانیسم‌های رشد یافته روی پلیت در تمام تیمارها شامل باکتری، قارچ و جلبک/سیانوباکتر می‌باشد. اما در پلیت‌های حاوی ۸٪ نمک به غیر از نمونه‌های خاک آیش و نمونه شماره PF3 Ep(3)، فقط قارچ رشد کرد. در کل رشد قارچی در نمونه‌های اپی‌فایتونی (به غیر از نمونه PF3 Eph(3)) بیش‌تر از نمونه‌های اپی‌پلونی بود. مطالعه Giri و Mukerji (2004) بیان کرد قارچ *میکوریزا* از طریق جذب برقرار رابطه همزیستی و جذب عناصر غذایی باعث بهبود تحمل شرایط نامساعد و تنش شوری می‌شود.

Safarzadeh و همکاران (2023) توان رشد ۱۰ جدایه باکتری را در سطوح شوری مختلف بررسی کردند، نتایج نشان داد در سطح شوری ۲ mol/L، تمام جدایه‌ها، در سطح شوری ۳ mol/L ، ۸ جدایه و در ۴ mol/L فقط دو جدایه *Klebsiella* و *Halomonas* قادر به رشد بودند. ریزوباکترهای محرک رشد گیاه در برابر شرایط محیطی نامناسب غذا، دما، رطوبت، تنش اکسیداتیو و شوری تکامل پیدا کرده‌اند (Remonsellez et al., 2018;Barbaccia et al., 2022). قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* نیز تحمل به شوری بالایی داشته و در حد ۴۰۰ mmol کلرید سدیم را از طریق ساز و کارهای مختلف تحمل می‌کند (Zarea et al., 2014). در پژوهش‌های مختلف تأثیر مثبت مایه‌زنی قارچ اندوفیت بر افزایش زیست‌توده گزارش شده است (Farias et al., 2020; Saddique et al., 2018; Zaman et al., 2021). Morsy و همکاران (2020) نیز تأثیر مثبت قارچ *Penicillium brevicompactum* در تنش شوری را گزارش کردند.

جدول۷- نتایج تنش شوری

پریفایتون	نمک ۰٪ محیط مایع	نمک ۸٪ محیط مایع	نمک ۰٪ محیط جامد	نمک ۸٪ محیط جامد
PF1 Eph(1)	+	+	B, A, F	F
PF1 Ep(1)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF1 Eph(2)	+	+	B, A, F	F
PF1 Ep(2)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF1 Eph(3)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF1 Ep(3)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF2 Eph(1)	+	+	B, A, F	F
PF2 Ep(1)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF2 Eph(2)	+	+	B, A, F	F
PF2 Ep(2)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF2 Eph(3)	+	+	B, A, F	F
PF2 Ep(3)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF3 Eph(1)	+	+	B, A, F	F
PF3 Ep(1)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF3 Eph(2)	+	+	B, A, F	F
PF3 Ep(2)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF3 Eph(3)	+	+	B, A, F	رشد ضعیف F
PF3 Ep(3)	+	+	B, A, F	-
FF (1)	+	+	B, A, F	-
FF (2)	+	+	B, A, F	-
FF (3)	+	+	B, A, F	-

B (Bacteria) نشان دهنده رشد باکتری، F (Fungi) نشان دهنده رشد قارچ و A (Algae) نشان دهنده رشد جلبک

ارزیابی میزان تحمل به تنش کم آبی

تجزیه واریانس نتایج نشان می‌دهد اثر ساده غلظت‌های مختلف PEG۶۰۰۰، اثر ساده تیمارهای میکروبی و اثر دوگانه جامعه میکروبی× PEG در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شدند (جدول ۸). مقایسه میانگین اثر ساده غلظت‌های مختلف PEG (فشارهای اسمزی متفاوت) نشان داد بالاترین چگالی قرائت شده در فشار اسمزی ۰ (PEG_0) و در رده بعدی فشار اسمزی ۲ و ۵ bar از نظر آماری در یک گروه آماری قرار گرفتند. نتیجه مقایسه میانگین اثر ساده پریفایتون نشان داد بالاترین مقادیر، در تیمارهای PF3 Ep(1)، PF3 Ep(2) و PF3 Ep(3) به ترتیب با ۳/۵۶، ۳/۷ و ۳/۶۵ اندازه‌گیری شد که با بقیه تیمارها دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند.

مقایسه میانگین اثر دوگانه جامعه مکیروبی*PEG (جدول ۹)، نشان داد بالاترین مقدار چگالی نوری قرائت شده مربوط به تیمار با فشار اسمزی صفر و پریفایتون PF2 Ep(3) بود که با تیمارهای PEG_0* PF3 Ep(3)، PEG_0*PF2*Ep(2)، PEG_0*PF3 Ep(2) و PEG_0*PF3 Ep(1) در یک گروه آماری قرار گرفتند. کمترین رشد میکروبی در تیمار پریفایتونی Control در فشار اسمزی ۱۰ بار (PEG_{10}*Control) اندازه‌گیری شد که با فشار اسمزی ۰، ۲، ۵ و ۱۵ bar در همین تیمار پریفایتونی (PEG_{15}×Control، PEG_5×Control ، PEG_2×Control ، PEG_0×Control) در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۹). در پژوهش Khodadadi و همکاران (2019) اعلام

کردند افزایش سطح پلی‌اتیلن گلیکول در سطوح -۵، -۱۰ و -۲۰ bar به ترتیب ۵۸/۸، ۷۲/۲ و ۹۲/۹ درصد کاهش یافت. Ashraf و همکاران (2004) بیان کردند جدایه‌هایی که توان بالایی در تحمل تنش خشکی دارند با تولید پلی‌ساکارید برون‌سلولی و همچنین تجمع برخی از آنزیم‌ها، به رشد خود ادامه می‌دهند.

جدول۸- جدول تجزیه واریانس تحمل تنش خشکی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات خشکی
پریفایتون	**۴**	**۴/۶۳۵****
PEG	**۲۱**	**۱۲/۳۴****
پریفایتونPEG×	**۸۴**	**۰/۳۹****
خطای آزمایشی	**۲۲۰**	**۰/۰۳۹۸**
ضریب تغییرات (٪)		**۱۱/۱۹**

**معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۹- مقایسه میانگین اثر دوگانه PEG × جامعه میکروبی

جامعه میکروبی* PEG	PEG_0	PEG_2	PEG_5	PEG_{10}	PEG_{15}
PF1 Eph(1)	۰/۶۳^{oopp}	۲/۱۵$^{cc-kk}$	۱/۲۹$^{v-hh}$	۰/۸۲$^{ll-pp}$	۰/۷۳$^{nn-pp}$
PF1 Ep(1)	۱/۳۹$^{t-dd}$	۱/۵۳$^{o-bb}$	۱/۶۱$^{m-v}$	۱/۲۸$^{w-ii}$	۱/۰۴$^{gg-nn}$
PF1 Eph(2)	۰/۸۷$^{kk-pp}$	۰/۹۲$^{jj-pp}$	۰/۹۸$^{hh-oo}$	۰/۷۷$^{mm-pp}$	۰/۷۲$^{nn-pp}$
PF1 Ep(2)	۱/۳۶$^{t-ff}$	۱/۵۰$^{p-bb}$	۱/۵۶$^{n-y}$	۱/۳۰$^{u-gg}$	۱/۰۷$^{ff-mm}$
PF1 Eph(3)	۱/۳۷$^{t-ff}$	۰/۸۵$^{kk-pp}$	۰/۹۳$^{jj-pp}$	۰/۸۰$^{ll-pp}$	۰/۶۳^{pp}
PF1 Ep(3)	۲/۱۱$^{i-l}$	۱/۵۴$^{o-aa}$	۱/۴۳$^{s-cc}$	۱/۴۱$^{t-dd}$	۱/۱۱$^{dd-ll}$
PF2 Eph(1)	۲/۳۲^{hi}	۱/۵۵$^{n-z}$	۱/۷۶$^{l-r}$	۱/۲۳$^{z-jj}$	۰/۹۷$^{hh-oo}$
PF2 Ep(1)	۲/۴۱^{hi}	۱/۹۱^{klm}	۱/۸۶$^{k-n}$	۱/۵۷$^{n-y}$	۱/۳۵$^{t-gg}$
PF2 Eph(2)	۲/۲۵^{hij}	۱/۴۷$^{r-cc}$	۱/۶۱$^{m-u}$	۱/۰۳$^{gg-nn}$	۱/۰۴$^{gg-nn}$
PF2 Ep(2)	۳/۹۷^{abc}	۲/۵۲^{h}	۳/۰۳^{g}	۱/۷۹$^{l-q}$	۱/۵۷$^{n-y}$
PF2 Eph(3)	۱/۱۱^{fg}	۲/۱۱$^{m-s}$	۱/۷۷$^{m-r}$	۱/۴۹$^{p-bb}$	۰/۹۶$^{ii-oo}$
PF2 Ep(3)	۴/۱۱^{a}	۳/۲۵^{fg}	۲/۴۹^{h}	۱/۸۱$^{k-p}$	۱/۵۳$^{o-bb}$
PF3 Eph(1)	۱/۲۲$^{aa-jj}$	۱/۹۷^{jkl}	۱/۶۱$^{m-v}$	۱/۶۱$^{m-v}$	۱/۳۰$^{u-gg}$
PF3 Ep(1)	۳/۹۱$^{a-d}$	۳/۶۴^{de}	۳/۵۹^{e}	۳/۴۷^{ef}	۳/۱۹^{fg}
PF3 Eph(2)	۱/۲۱$^{bb-jj}$	۲/۱۱^{ijk}	۱/۵۰$^{o-bb}$	۱/۳۲$^{u-gg}$	۱/۲۶$^{y-ii}$
PF3 Ep(2)	۳/۹۷^{abc}	۳/۶۸$^{b-e}$	۳/۷۸$^{b-e}$	۳/۶۸$^{b-e}$	۳/۴۷^{ef}
PF3 Eph(3)	۱/۳۰$^{u-gg}$	۱/۶۷$^{m-t}$	۱/۲۸$^{x-ii}$	۱/۲۷$^{y-jj}$	۱/۸۲$^{k-o}$
PF3 Ep(3)	۳/۹۹^{ab}	۳/۵۸^{e}	۳/۶۷^{cde}	۳/۶۲ ^{de}	۳/۴۱^{ef}
FF (1)	۱/۵۷$^{n-y}$	۱/۴۸$^{q-bb}$	۱/۴۱$^{t-dd}$	۱/۵۰$^{p-bb}$	۱/۳۴$^{u-gg}$
FF (2)	۱/۵۵$^{n-z}$	۱/۵۳$^{o-bb}$	۱/۵۹$^{n-x}$	۱/۵۶$^{n-y}$	۱/۴۴$^{s-cc}$
FF (3)	۱/۵۸$^{n-y}$	۱/۶۰$^{m-w}$	۱/۵۷$^{n-y}$	۱/۵۵$^{n-aa}$	۱/۴۸$^{q-bb}$
Control	۰/۲۹^{qq}	۰/۲۹^{qq}	۰/۲۹^{qq}	۰/۲۹^{qq}	۰/۲۹^{qq}

حروف کوچک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد (آزمون دانکن).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش ثابت کرد پریفایتون چه از نوع اپی‌پلونی یا اپی‌فایتونی به عنوان یک جامعه زیستی بسیار توانمند در اکثر زمینه‌های محرک رشدی گیاه می‌تواند مؤثر باشد. در آزمایشات انحلال پتاسیم، فسفات معدنی، فسفات آلی، تولید سیانید هیدروژن و تولید سیدروفور، اپی‌فایتون‌ها در شرایط بهتری قرار داشتند و در این بین، به غیر از آزمون

تولید سیدروفور که بالاترین میزان تولید آن مربوط به شالیزار خاله‌سرا بود، در بقیه آزمایشات اپی‌فایتون‌های شالیزارهای گیله‌سرا و واجارگاه عملکرد بهتری داشتند. در حالیکه در آزمون توان تحمل خشکی و تولید هورمون ایندول استیک اسید اپی‌پلون‌ها در مقایسه با اپی‌فایتون‌ها قدرت بالاتری داشتند. از طرفی طبق نتایج به دست آمده از تمام آزمایشات، نمونه‌های گرفته شده از خاک آیش کمترین عملکرد را در ویژگی‌های محرک رشدی نشان دادند. بنابراین با توجه به این پتانسیل میکروبی بالقوه، می‌توان راهی به سوی استفاده مفید از این جامعه زیستی داشت. بنابراین توصیه می‌شود تأثیر اجزای میکروبی مفید حاضر در انواع پریفایتون‌ها به صورت جداگانه مطالعه شود تا بتوان باکتری‌ها و قارچ‌های مفید حاضر در پریفایتون را مورد شناسایی قرار داد. همچنین پیشنهاد می‌شود به دلیل تأیید ویژگی‌های محرک رشدی لایه زیستی پریفایتونی، پژوهش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بیش‌تر مورد مطالعه قرار گیرند و امید است گام بزرگی در جهت تولید کودهای زیستی مناسب با شرایط شالیزار و مدیریت چرخه عناصر غذایی موجود در آن برای رسیدن به کشاورزی پایدار باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مجموعه بنیاد ملی علم ایران (Iran National Science Foundation) که ما را در جهت تأمین هزینه‌های مالی این پژوهش (به شماره طرح ۴۰۰۰۷۳۶) کمک کردند، نهایت تشکر و سپاسگزاری را داریم.

Refrences

1. Adesemoye, A.O. Torbert, H.A. and Kloepper, J.W., 2009. Plant growthpromoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology, 58*, pp.921-929. DOI: 10.1007/s00248-009-9531.
2. Ali, W. Mao, K. Zhang, H. Junaid, M. Xu, N. Rasool, A. Feng, X. and Yang, Z., 2020. Comprehensive review of the basic chemical behaviors, sources, processes, and endpoints of trace element contamination in paddy soil-rice systems in rice-growing countries. *Journal of Hazardous Materials, 397*, 122720. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122720
3. Alikhani H.A. Beheshti, M. Pourbabaei A.A. Etesami H. Asadi Rahmani, H. and Noroozi, M., 2023. The Effect of Natural and Enriched Periphyton by Plant Growth Promoting Microorganisms on Rice Growth Indices in a Greenhouse Experiment. *Water and Soil Science, 33(3),* pp. 143-162. DOI: 10.22034/ws.2022.52020.2475 [In Persian]
4. Alikhani, H.A. Emami, S. Etesami, H., 2021. Periphyton and Its Key Role in Paddy Fildes and Environmental Health. *Iranian Journal of Soil and Water Research, 52(2),* pp. 451-467. DOI. 10.22059/ijswr.2021.315436.668835 [In Persian]
5. Allan, J.D. and Castillo, M.M., 2007. Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters, 2nd Edition, Chapman and Hall, New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5583-6
6. Ashraf, M. Hasnain, S. Berge, O. and Mahmood, T., 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils, 40(3),* pp.157-162. DOI:10.1007/s00374-004-0766-y
7. Bag, S. Mondal, A. and Banik, A., 2022. Exploring tea (Camellia sinensis) microbiome: insights into the functional characteristics and their impact on tea growth promotion. *Microbiological Research, 254*, 126890. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126890
8. Barbaccia, P. Gaglio, R. Dazzi, C. Miceli, C. Bella, P. Lo Papa, G. and Settanni, L., 2022. Plant Growth Promoting Activities of Bacteria Isolated from an Anthropogenic Soil Located in Agrigento Province. *Microorganisms 10(11),* pp.1-13. https://doi.org/10.3390/microorganisms10112167
9. Beheshti, M. Alikhani H.A. Pourbabaei A.A. Etesami H. Asadi Rahmani, H. and Noroozi, M., 2022. Investigating the role of periphyton types in the release and uptake of insoluble phosphorus in an in vitro experiment. *Iranian Journal of Soil and Water Research. 53(6),* pp. 1387-1402. DOI: 10.22059/ijswr.2022.340359.669229 [In Persian]
10. Beheshti, M., 2021.The effect of periphyton on phosphorus content and seedling growth indices of rice (Oryza sativa L.) in a greenhouse study, A Thesis For fulfillment of the Requirements for PhD Degree in Soil Science. University of Tehran. Iran. [In Persian]
11. Borah, D. Nainamalai, S. Gopalakrishnan, S. Rout, J. Alharbi, N.S. Alharbi, S.A. and Nooruddin, T., 2018. Biolubricant potential of exopolysaccharides from the cyanobacterium *Cyanothece epiphytica*. *Applied microbiology and biotechnology, 102*, pp.3635-3647. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8892-x
12. Castellano-Hinojosa, A. and Bedmar, E. J., 2017. Methods for evaluating plant growth-promoting rhizobacteria traits. P 255-274, In: H.B. Singh, B. K. Sarma, and C. Keswani (eds), Advances in PGPR Research. Wallingford UK:

CABI. DOI:10.1079/9781786390325.0255

13. Castiglione, S. Oliva, G. Vigliotta, G. Novello, G. Gamalero, E. Lingua, G. Cicatelli, A. and Guarino, F., 2021. Effects of compost amendment on glycophyte and halophyte crops grown on saline soils: Isolation and characterization of rhizobacteria with plant growth promoting features and high salt resistance. *Applied Sciences,11(5)*, pp.1-15. DOI:10.3390/app11052125
14. Chawngthu, L. Hnamte, R. and Lalfakzuala, R., 2020. Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of Mizoram, India. *Geomicrobiology Journal, 37(4)*, pp. 366-375. https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1709108
15. 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, 51(5*), DOI:.org/10.1080/00103624.2020.1729379
16. Decho, A.W. and Gutierrez, T., 2017. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in microbiology, 8*, 922. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00922
17. 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 fromair 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
18. Donate-Correa, J. Leon-Barrios, M. and Perez-Galdona, R., 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage treeshrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil*, *266*, pp.261-272. https://doi.org/10.1007/s11104-005-0754-5
19. Duca, D.R. and Glick, B.R., 2020. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology, 104*, pp.8607–8619. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5.
20. Etesami H, and Glick B.R., 2020. Halotolerant plant growth–promoting bacteria: prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany, 178*, 104124. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124
21. Etesami, H. Emami, S. and Alikhani, H.A., 2017. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 17(4)*, pp.897-911. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005
22. Fallah Nosratabad, A. Alishiri Junaghani, M. and Bazazzadeh, R., 2024. Solubilizing efficiency of inorganic phosphate and insoluble organic phosphorus by cyanobacteria isolated from fish Culture ponds. *Journal of Soil Biology, 11(2)*, pp. 155-165. doi.org/10.22092/sbj.2024.362289.251
23. Farhat, F. Tariq, A. Waseem, M. Masood A. Raja, S. Ajmal, W. Iftikhar, I. Zulfiqar, U. and Maqsood, M.F., 2023. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Induced Improvements in the Growth, Photosynthesis, Antioxidants, and Nutrient Uptake of Rapeseed (Brassica napus L.). *Gesunde Pflanzen*, 75, pp. 2075–2088. https://doi.org/10.1007/s10343-023-00845-0
24. Farias, G.C. Nunes, K.G. Soares, M.A. de Siqueira, K.A. Lima, W.C. Neves, A.L.R. and de Lacerda, C.F., 2020. Dark

septate endophytic fungi mitigate the effects of salt stress on cowpea plants. *Brazilian Journal of Microbiology, 51*, pp.243-253. DOI: 10.1007/s42770-019-00173-4

25. Faridian. L. Baharlouei, J. Fallah, A.R. Kari-Dolatabad, H., 2023. Isolation and evaluation of plant growth-promoting characteristics of phosphate solubilizing fungi from Iranian soils. *Journal of Soil Biology, 10(2)*, pp. 163-176. DOI. 10.22092/sbj.2021.355140.220 [In Persian]
26. Giri, B. and Mukerji, K.G., 2004. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in Sesbania aegyptiaca and Sesbania grandiflora under field condition: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza, 14*, pp.307-312. DOI: 10.1007/s00572-003-0274-1
27. Guo, J. Muhammad, H. Lv, X. Wei, T. Ren, X. Jia, H. Atif, S. and Hua, L., 2020. Prospects and applications of plant growth promoting rhizobacteria to mitigate soil metal contamination: A review. *Chemosphere, 246*, 125823. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.125823
28. Haghani, Z. Alikhani, H.A. Amirhosseini, K. Emami, S. and Etesami, H., 2024. Assessing the potential of functionally-enhanced periphyton in supplying rice plant phosphorus nutrition in paddy fields. *Rhizosphere, 31*, 100951. DOI : 10.1016/j.rhisph.2024.100951
29. Huang, W. Liu, X. Peng, W. Wu, L. Yano, S. Zhang, J. and Zhao, F., 2018. Periphyton and ecosystem metabolism as indicators of river ecosystem response to environmental flow restoration in a flow-reduced river. *Ecological indicators, 92*, pp.394-401. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.025
30. Inaji, A. Okazawa, A. Taguchi, T. Nakamoto, M. Katsuyama, N. Yoshikawa, R. Ohnishi, T. Waller, F. and Ohta, D., 2020. Rhizotaxis modulation in *arabidopsisis* induced by diffusible compounds produced during the cocultivation of Arabidopsis and the endophytic fungus *Serendipita indica*. *Plant and Cell Physiology, 61*, pp.838–850. https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa008
31. Khodadadi, R. Ghorbani-Nasrabadi, R. Olamaee, M. and movahedi Naeini, S.A.R., 2019. Isolation and screening of native azotobacter from salt affected soils and measurement of their growth promoting properties. *Applied Soil Research, 7(2)*, pp. 109-122. [In Persian]
32. Kouchaki-Penchah, H. Alizadeh, M.R. and Aghamolki, M.T.K., 2023. Measuring eco-efficiency of rice cropping systems in Iran: An integrated economic and environmental approach. *Sustainable Energy Technologies and Assessments, 57*,103281. https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103281
33. Kour, D. Kaur, T. Devi,R. Chaubey, K.K. and Yadav, A.N., 2023. Co-inoculation of nitrogen fixing and potassium solubilizing *Acinetobacter* sp. for growth promotion of onion (Allium cepa). *Biologia*, 78, pp. 2635-2641. https://doi.org/10.1007/s11756-023-01412-8
34. 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. pp. 65-84. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7_4
35. Li, Y. He, N. Hou, J. Xu, L. Liu, C. Zhang, J. Wang, Q. Zhang, X. and Wu, X., 2018. Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, pp. 6: 64. DOI:10.3389/fevo.2018.00064
36. Liu, D. Lian, B. and Dong, H., 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal, 29*, 413-421.

https://doi.org/10.1080/01490451.2011.576602

37. Liu, J. Danneels, B. Vanormelingen, P. and Vyverman, W., 2016. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae Klebsormidium sp., Stigeoclonium spp. and their communities: from laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water research, 92*, pp.61-68. DOI: 10.1016/j.watres.2016.01.049
38. Lu, H. Liu, J. Kerr, P.G. Shao, H. and Wu, Y., 2017a. The effect of periphyton on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa*) in paddy area. *Science of the Total Environment, 578*,74-80. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.191
39. Lu, H. Wan, J. Li, J. Shao, H. and Wu, Y., 2016. Periphytic biofilm: A buffer for phosphorus precipitation and release between sediments and water. *Chemosphere, 144*, pp.2058-2064. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.129
40. Lu, H. Xu, Z. and Shao, H., 2017b. Paddy periphyton: an important regulator in phosphorus migration between the soil and water interface in coastal reclaimed land. 19th EGU General Assembly, EGU2017, proceedings from the conference held 23-28 April, 2017 in Vienna, Austria p.1780. 2017EGUGA. 19.1780L
41. Lu, H. Yang, L. Shabbir, S. and Wu, Y., 2014. The adsorption process during inorganic phosphorus removal by cultured periphyton. *Environmental Science and Pollution Research, 21*, pp.8782-8791. DOI: 10.1007/s11356-014-2813-z
42. Meena, V.S. Maurya BR, Verma, J.P. Aeron, A. Kumar, A. Kim, K. and Bajpai, V.K., 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering, 81*, pp. 340-347. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.065
43. 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. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00380
44. Morsy, M. Cleckler, B. and Armuelles-Millican, H., 2020. Fungal Endophytes Promote Tomato Growth and Enhance Drought and Salt Tolerance. *Plants, 9(7)*, 877. https://doi.org/10.3390/plants9070877
45. Naveed, S. Li, C. Lu, X. Chen, S. Yin, B. Zhang, C. and Ge, Y., 2019. Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal (loid) s: A review. Critical Reviews in *Environmental Science and Technology, 49(19*), pp.1769-1802. DOI: 10.1080/10643389.2019.1583052
46. 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. *Biomolecule, 10(41)*, doi:10.3390/biom10010041. DOI: 10.3390/biom10010041
47. Noha, M.A. Bothania, A.A, Shereen, A.M, Omnia A.M.B. Mohammad, T.S. and Ahmed, E., 2022. Utilization of drought-tolerant bacterial strain isolated from harsh soild as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Saudi Journal of Biological Sciences, 29(3)*, pp. 1760-1769. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.054
48. OECD-FAO Agricultural Outlook., 2022. [Data set].
49. Otadi, A. Etesami, H. Khosravi, H. and Alikhani, H.A., 2025. Evaluation and comparative analysis of plant growth-promoting traits in diverse groups of rhizosphere bacteria. *Soil Biology Journal, 12(2)*, pp. 235-260. DOI: 10.22092/SBJ.2025.36 7286.271

50. Peek, M.E. Bhatnagar, A. McCarty, A. and Zughaier, S.M., 2012. Pyoverdine, the major siderophore in Pseudomonas aeruginosa, evades NGAL recognition. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. https://doi.org/10.1155/2012/843509
51. 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),* pp.753-761. DOI:10.20546/ijcmas.2017.608.096
52. Qarni, A. Billah, M. Hussain, K. Shah, S.H. Ahmed, W. Alam, S. Sheikh, A.A. Jafri, L. Munir, A. and Malik, K.M., 2021. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and their Potential Effect for Sustainable Agriculture. *Sustainability, 13*, 2151. https://doi.org/10.3390/su13042151
53. Remonsellez, F. Castro-Severyn, J. Pardo-Esté, C. Aguilar, P. Fortt, J. Salinas, C. Barahona, S. León, J. Fuentes, B. and Saavedra, C. P., 2018. Characterization and salt response in recurrent halotolerant Exiguobacterium sp. SH31 isolated from sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in Microbiology, 9*, pp.1-17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02228
54. Rezaei, M. Amiri, E. and Kamali, M., 2024. Estimating the area under rice cultivation in Guilan province using remote sensing technology and GEE. *Journal of Soil Research, 38(2),* pp. 113-124. DOI. 10.22092/ijsr.2024.366254.750 [In Persian]
55. Rosas, S.B. Avanzini, G. Carlier, E. Pasluosta, C. Pastor, N. and Rovera, M., 2009. root colonization and growth promotion of wheat and maize by Pseudomonas aurantiaca SR1. *Soil Biology and Biochemistry, 41*, pp.1802-1806. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.10.009
56. Rummel, C.D. Jahnke, A. Gorokhova, E. Kühnel, D. and Schmitt-Jansen, M., 2017. Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology Letters, 4(7),* pp.258-267. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00164
57. Saddique, M.A.B. Ali, Z. Khan, A.S. Rana, I.A. and Shamsi, I.H., 2018. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice, 11*, pp.1-12. DOI: 10.1186/s12284-018-0226-1
58. Sadeghi, S. Rasouli-Sadaghiani, M.H. Dovlti, B. and Vahedi, R., 2017. Influence of K- Solubilizing Fungi on Potassium Release from Silicate Minerals and some Growth Indices of Corn (Zea mays L.). *Applied Soil Research, 6(2),* pp. 96-108. [In Persian]
59. Safarzadeh, T. Olamaee, M. Malekzadeh, E. Movahedi naini, S.A.R. and Pakdin-Parizi, A., 2023. Isolation and identification of salt tolerant-plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of halophyte plants. *Journal of Soil Management and Sustainable Production, 13(3),* pp. 100-115. DOI. 10.22069/ejsms.2023.21627.2115 [In Persian]
60. Saharan, B. and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research, 21*, pp. 1-30. https://sid.ir/paper/631031/en
61. Sarikhani, M.R. Oustan, S. Ebrahimi, M. and Aliasgharzad, N., 2018. Isolation and identification of potassium releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. *European Journal of Soil Science, 69*, pp. 1078–1086. DOI: https://doi.org/10.1111/ejss.12708
62. Shujie, C. Kaiying, D. Jun, T. Rui, S. Hailong, L. Jiuyu, L. Yonghong, W. and Renkou, X., 2020. Characterization of

extracellular phosphatase activities in periphytic biofilm from paddy field. *Pedosphere*, *31*, pp.116-124. DOI:10.1016/S1002-0160(20)60061-3

63. Singh, S. James, A. and Bharose, R., 2017. Biological assessment of water pollution using periphyton productivity: A Review. *Nature Environment & Pollution Technology*, *16(2)*, pp. 559-567.
64. Sun, P. Liu, Y. Sun, R. Wu, Y. and Dolfing, J., 2022. Geographic imprint and ecological functions of the abiotic component of periphytic biofilms. *Metagenomics & Bioinformatics Journal*, e60. DOI: 10.1002/imt2.60
65. Suseendran, K. Stalin, P. Kalaiyarasan, C. Jawahar, S. Murugan, G. Vinod Kumar, S.R. and Arivukkarasu, K., 2020. Studies on the integrated nutrient and weed management practices on growth, yield and economics of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Archives, 20 (1)*.pp.1963-1969. e-ISSN:2581-6063 (online), ISSN:0972-5210
66. 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. https://doi.org/10.3390/biology10020158
67. Twisha, M. and Minocheherhomji, P., 2018. Isolation and Characterization of Several Siderophore Producing Bacteria from Cotton Plant. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 7(1), pp.159-166. DOI:10.15680/IJIRSET.2018.0701026
68. Wang, W. Wu, Z. He, Y. Huang, Y. Li, X. and Ye, B. C., 2018. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in Capsicum annuum L. by Bacillus isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *164*, pp.520-529. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.070
69. Weigelhofer, G. Ramião, J.P. Pitzl, B. Bondar-Kunze, E. and O'Keeffe, J., 2018. Decoupled water sediment interactions restrict the phosphorus buffer mechanism in agricultural streams. *Science of the Total Environment*, *628*, pp.44-52. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.030
70. Yang, X. Zhang, R. Wang, J. He, K. and Chen, J., 2021. Fluxes and mechanisms of phosphorus release from sediments in seasonal hypoxic reservoirs: a simulation based experimental study. *Journal of Soils and Sediment*, *21*, pp. 3246–3258. DOI:10.1007/s11368-021-02946-7
71. Yin, Z. Shi, F. Jiang, H. Roberts, D.P. Chen, S. and Fan, B., 2015. Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and Aspergillus niger P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, *61*, pp.913-923. DOI: 10.1139/cjm-2015-0358
72. Zaman, K.A.U. Wu, X. Hu, Z. Yoshida, W. Hou, S. Saito, J. Avad, K.A. Hevener, K.E. Alumasa, J.N. and Cao, S., 2021. Antibacterial kaneoheoic acids AF from a Hawaiian fungus Fusarium sp. FM701. *Phytochemistry*, *181*, 112545. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112545
73. Zarea, M.J. Miransari, M. and Karimi N., 2014. Plant physiological mechanisms of salt tolerance induced by mycorrhizal Fungi and *Piriformospora indica*, In: M. Miransari (ed.), Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0721-2_8
74. Zhou, L. Rong, X. Xie, G. Wang, X. and Xie, Y., 2014. Effects of different nitrogen fertilizers on rice yield and nitrogen use efficiency. *Soils*, *46*, 971-975.

67-89/Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

The effect of the application of coal ash in soil on the symbiotic indices of chickpea inoculated with *Mesorhizobium* and mycorrhizal fungi

Ali Akbar Safari Sinegani[1]* and Leila Karami[2]

1-Prof. of Soil Science, Department of Soil Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. E-mail: aa-safari@basu.ac.ir

2- Former MSc. Student of Soil Science, Department of Soil Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. leila.karami69@gmail.com

Article Info

Received: 2025-02-16
Accepted: 2025-07-09

Keywords: Bitominous coal, Funneliformis mosseae, Iranian pea, *Mesorhizobium* ciceri, Rhizophagus irregularis

Corresponding author's email: aa-safari@basu.ac.ir

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368447.278

Extended Abstract

Background and objectives: Iranian chickpea (*Cicer arietinum L.*) ranks third globally in edible legumes, but leads in the Mediterranean and South Asia. It enhances soil nitrogen through symbiosis with *Rhizobium* bacteria, contributing to sustainable agriculture. Coal, a major energy source, produces ash that can pollute if misused but can improve soil properties when applied properly. Coal ash enhances plant growth and nutrient uptake but higher concentrations may reduce beneficial microbes. Mycorrhizal fungi and *Rhizobium* bacteria form valuable symbiotic relationships with legumes. The study aimed to investigate the effects of bituminous coal ash on the tripartite symbiosis between chickpea plants, mycorrhizal fungi, and rhizobial bacteria.

Materials and methods: The study was conducted in a low-phosphorus soil with a loam texture, collected from Azandarian, Hamadan Province, Iran. Bituminous coal ash was obtained from the Shek-Maidan mine, Kermanshah Province. Physical and chemical properties of the soil and coal ash were analyzed using standard methods. A factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted on sterilized soil. The factors included coal ash at four levels (0%, 2.5%, 5%, and 10%), mycorrhizal fungi inoculation (*Funneliformis mosseae* and *Rhizophagus irregularis*, or no inoculation), and *Mesorhizobium ciceri* inoculation (with or without). Chickpea seeds were surface-sterilized and inoculated with *Mesorhizobium* before sowing. Mycorrhizal inoculum and chickpea seeds were obtained from certified sources. Soil and coal ash mixtures were sterilized in an autoclave, and 3 kg of the mixture was placed in each pot. Mycorrhizal inoculum (100 g) was applied below the seeds. Six chickpea seeds were planted per pot and thinned to two after germination. The plants were grown under greenhouse conditions without any additional fertilizers, and pots were watered regularly. At flowering, plants were harvested, and roots were separated from the soil. Nodules were counted, and root colonization by mycorrhizal fungi was assessed using staining techniques. Glomalin-related soil proteins were extracted and quantified, and fungal spores in the soil were counted using centrifugation in a sugar solution. Data were analyzed using Excel and SAS software.

Results: The results indicated that the application of coal ash at the 2.5% level significantly improved the symbiotic interactions between chickpea plants and

both mycorrhizal fungi and rhizobial bacteria compared to the control (no coal ash). Specifically, this treatment increased the number of nodules formed by *Mesorhizobium* and enhanced the establishment of mycorrhizal symbiosis. In contrast, applying higher concentrations of coal ash (5% and 10%) resulted in a notable decline in these beneficial symbiotic relationships, as evidenced by a decrease in both mycorrhizal colonization and rhizobial nodule formation.
The highest mean number of rhizobial nodules per pot (41.66) was found in treatments where both *Mesorhizobium* inoculation and 2.5% coal ash application were combined, along with inoculation of *Funneliformis mosseae*. This combination produced the most favorable environment for both the mycorrhizal fungi and rhizobia. On the other hand, the lowest number of rhizobial nodules (3.66) was recorded in the 10% coal ash treatment where no mycorrhizal inoculation was applied, suggesting that excessive coal ash inhibits the formation of beneficial microbial interactions.

Conclusion: This study demonstrate that the application of bituminous coal ash in small amounts significantly enhances biological parameters, such as the abundance and weight of Mesorhizobium nodules on the roots of white chickpea plants, the percentage of mycorrhizal colonization of the roots, the number of Glomale spores in the soil, and soil glomalin or glycopeptides. Applying coal ash in low amounts (2.5%) could be beneficial for chickpea growth by improving symbiotic relationships with both mycorrhizal fungi and rhizobia, thus enhancing plant growth and function. However, increasing the coal ash concentration to higher levels (5% and 10%) can deteriorate the soil's ability to support these beneficial symbiotic interactions, leading to reduced plant growth. Although the response of the two fungi species was not significantly different, *Funneliformis mosseae* demonstrated greater tolerance and better performance in response to the harmful effects of ash. Inoculation with Mesorhizobium increased symbiotic associations with fungi, particularly *Rhizophagus irregularis*, in the plant, while the inoculation and application of mycorrhizal fungi promoted nodule formation and symbiosis between Mesorhizobium and the chickpea plant. Therefore, the application of 2.5% bituminous coal ash in the soil is beneficial for chickpea growth and its symbiotic relationship with microorganisms, whereas higher doses may have adverse effects on plant growth and overall soil health. This highlights the potential risks associated with high concentrations of coal ash in agricultural systems.

Cite this article:Safari Sinegani, A.A., Karami, L., 2025. The effect of the application of coal ash in soil on the symbiotic indices of chickpea inoculated with Mesorhizobium and mycorrhizal fungi. Journal of Soil Biology, 13 (1),pp. 67-89

DOI: 10.22092/SBJ.2025.368447.278
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ بر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود سپید مایه‌زنی شده با *Mesorhizobium ciceri* و قارچ‌های میکوریز

علی اکبر صفری سنجانی*و لیلا کرمی

۱-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.aa-safari@basu.ac.ir

۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. leila.karami69@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۱۸

چکیده

برای بررسی پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ گونه بیتومینه[1] بر همزیستی سه گانه گیاه نخود-قارچ-باکتری، آزمایشی گلدانی بر یک خاک سترون شده به گونه فاکتوریل با طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شده کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در ۴ اندازه (۰، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ درسد) ، مایه‌زنی قارچ میکوریزا در سه تیمار (بدون مایه‌زنی، مایه‌زنی با قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی با *قارچ Rhizophagus irregularis*) و مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* در دو تیمار (بدون مایه‌زنی و مایه‌زنی با *مزوریزوبیوم*) بود. تیمار خاک با ۲/۵ درسد خاکستر زغال‌سنگ مایه افزایش چشم‌گیر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود با قارچ‌های میکوریزی و *Mesorhizobium ciceri* در برابر گواه آزمایش شد، ولی این شناسه‌ها در تیمارهای کاربرد ۵ و ۱۰ درسد خاکستر در برابر گواه کاهش پیدا کردند. میانگین شمار گره‌های ریزوبیومی در تیمار ۲/۵ درسد خاکستر زغال‌سنگ در گلدان مایه‌زنی شده با *Funneliformis mosseae* بالاترین (۴۱/۶۶) و در تیمار ۱۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ و بدون مایه‌زنی میکوریزا کمترین (۳/۶۶) بود. کاربرد کودهای زیستی میکوریزی و *مزوریزوبیوم* هر یک مایه بهبود همزیستی گیاه با دیگری شد، ولی این پیامدهای سودمند آنها بر هم، در تیمار ۱۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ چشم‌گیر نبود. اگر چه شناسه‌های بررسی شده در میان قارچ‌ها ناهمانندی چندانی نداشت ولی بردباری *Funneliformis mosseae* در برابر خاکستر زغال‌سنگ کمی بیشتر *Rhizophagus irregularis* بود. این پژوهش نشان داد که کاربرد خاکستر زغال‌سنگ گونه بیتومینه در اندازه کم (۲/۵ درسد) از راه بهبود همزیستی گیاه نخود با قارچ‌های میکوریزی و *Mesorhizobium ciceri* می‌تواند در افزایش رشد و کارکرد آن سودمند باشد ولی کاربرد آن در اندازه‌های فراوان (۵ و ۱۰ درسد) در خاک می‌تواند ویژگی‌های خاک را برای همزیستی گیاه نخود ناشایست کند.

واژه‌های کلیدی: زغال‌سنگ بیتومینه، نخود ایرانی، *Funneliformis mosseae*، *Mesorhizobium ciceri*، *Rhizophagus irregularis*.

[1] bituminous coal ash

استناد: صفری سنجانی، ع.ا.، کرمی، ل.، ۱۴۰۴. پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ بر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود سپید مایه‌زنی شده با Mesorhizobium ciceri و قارچ‌های میکوریز. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱)۱۳،ص ۸۹-۶۷.

مقدمه

پس از نخود فرنگی و لوبیا، نخود ایرانی یا سپید (*Cicer arietinum L*) در میان نیامداران خوراکی، جایگاه سوم را در جهان دارد؛ ولی در مدیترانه و جنوب آسیا جایگاه نخست را دارد (Kochaki and Banayan-Aval, 1993). این گیاه با تثبیت نیتروژن با باکتری‌های ریزوبیومی کارایی ویژه‌ای افزایش نیتروژن خاک دارد. نخود سپید با ویژگی‌هایی همچون توانایی تثبیت نیتروژن، ریشه دهی خوب و ژرف و نیز توان بهره‌گیری خوب از ریزش‌های آسمانی جایگاه و کارایی ویژه‌ای در کشاورزی پایدار دارد (Ganjeali et al., 2008).

زغال‌سنگ از دیرباز همانند یک ماده انرژی‌زا بکار رفته و نخش بسزایی در پیشرفت شیوه ترابری و خودروسازی داشته است. هیدروکربن‌هایی که در ژرفای زمین پدید آمده‌اند از راه گذرگاه‌هایی همچون گسل‌ها و درزها به رویه زمین می‌رسند. در پی کاهش فشار در رویه زمین و نزدیکی با هوا، بخش‌های گازی از آن جدا می‌شود و مانده آن به گونه بیتومین یا قیر طبیعی[۲] در درزها، شکاف‌ها و کاواک‌ها می‌ماند و اندوخته‌های بیتومینی را در رویه زمین می‌سازند (Heydarizadeh et al., 2013). یکی از زباله‌های زغال‌سنگ، خاکستر آن می‌باشد که بهره‌گیری نادرست از آن می‌تواند مایه آلودگی خاک و آب شود (Mittra et al., 2005; Saberi et al., 2023). به هر گونه Saber و همکاران (2023) و Rezae و همکاران (2023) با بررسی زباله ها و خاک های آلوده شده به زباله های زغال‌سنگ آلودگی به فلزهای سنگین ناچیز و کم گزارش کرده و از این دیدگاه آن را بی‌زیان ارزیابی کردند. گزارش‌هایی دردست است که کاربرد خاکستر زغال‌سنگ را در کشاورزی سودمند دانسته و آن را مایه بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک می‌دانند که می تواند رشد گیاه را افزایش دهد (Pandey and Singh, 2010; Rezae et al., 2023). همچنین Singh و همکاران (1997) گزارش دادند که خاکستر زغال‌سنگ با داشتن اندازه بالایی از عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، رشد آن و جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهد. بر پایه پژوهش Pichtel (1990) فراوانی اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها با افزودن ۵ درسد خاکستر زغال‌سنگ به خاک کاهش می‌یابد. افزودن ۲۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ به ترتیب ۵۷، ۸۶ و ۸۰ درسد از فراوانی باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها را کاهش داده است. Rezae و همکاران (2023) با ارزیابی پیامد کاربرد خاکستر بادی زغال-سنگ بر برخی از ویژگی های خاک و شناسه‌های رشدی گیاه گزارش کردند که کاربرد خاکستر بادی زغال‌سنگ ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مانند pH ، رسانایی الکتریکی، پوکی، گنجایش نگهداری آب و مواد مغذی را افزایش می‌دهد. همچنین در کاربرد اندازه‌های پایین خاکستری بادی شناسه های گیاهی چون درازی ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه، شمار میوه، کاروتنوئید، کلروفیل، اندوخته نسبی آب برگ، اندوخته پروتئین، پرولین، فنل‌ها، نیتروژن، فسفر و پتاسیم به گونه چشم‌گیری افزایش یافت. ولی در کاربرد اندازه‌های بالاتر (۲۵٪) خاکستر بادی، با پیدایش تنش‌های اکسیداتیو همه شناسه‌های یاد شده کاهش یافتند. بر پایه برآوردهای انجام شده، نزدیک ۷۰ درسد از توده زنده خاک‌ها را میسیلیوم قارچ‌های میکوریزی می‌سازد (Mukerji and Chmola, 2003). قارچ‌های میکوریزی بسیار گوناگون هستند که می‌توانند به ریخت های گوناگونی با ریشه گیاهان همزیستی داشته باشند. امروزه قارچ‌های میکوریزایی آربوسکولار را در یک شاخه نوین از قارچ‌ها به نام شاخه گلومرومایکوتا[۳] گروه بندی می‌کنند (Safari Sinegani, 2013). همزیستی گیاهان با این قارچ‌ها بسیار سودمند بوده که مایه افزایش توان آنها برای زندگی در

۲-Natural bitumen

۳- Glumeromycota

زیستگاه‌های سخت و دشوار می‌شود. کود زیستی این گروه از ریزجانداران هم در کشاورزی و هم در بهسازی و زنده‌سازی خاک‌های کانسارها و آلوده کاربرد دارد (Qiu et al., 2019). همزیستی قارچ‌های میکوریزی با گیاه از راه‌های گوناگونی برای گیاه سودمند است. این همزیستی بویژه مایه افزایش جذب فسفر و توان گیاه برای زندگی و رشد در زیستگاهای سخت و آلوده می‌شود. Begum و همکاران (2023) پیامد همزیستی قارچ‌های میکوریزی را بر افزایش توان گیاه در برابر تنش خشکی بررسی کرده و نشان داد که همزیستی سویای بومی و تراریخته با *Rhizophagus irregularis* به گونه چشم گیری پیامدهای ناخواسته خشکسالی بر رشد گیاه را کاهش می‌دهد. مایه‌زنی AMF زیست توده گیاه، گسترش ریشه، ساخت کلروفیل، فتوسنتز و فلورسانس کلروفیل را در گیاهان بومی و تراریخته در تنش خشکی و بدون آن افزایش داد. اگر چه خشکی مایه ساخت اکسیدکننده‌های کارا مانند پراکسید هیدروژن می‌شود که شناسه پایداری پرده سیتوپلاسمی (MSI) را کاهش می‌دهد، گیاهان دارای همزیستی با این قارچ اکسیدکننده‌های کارای کمتر و کارایی انتی‌اکسیدانی بیشتری داشتند. همچنین کارکرد اسمولیت، نیتروژن و نیترات ردوکتاز را در بهبود بخشیده که افزایش اندوخته نسبی نسبی آب برگ را درپی داشت.از سوی دیگر همزیستی گیاهان نیامدار با ریزوبیوم‌ها بویژه در چراگاه‌ها و دیمزارها بسیار سودمند است (Safari Sinegani, 2013). گزارش شده است که کاربرد کود فسفره و همزمان مایه‌زنی دانه نخود با یک سویه ریزوبیومی کارا در خاک‌های نابارور مایه افزایش فراوانی و وزن گره، و همچنین بهبود شناسه‌های رشد گیاه در برابر گیاهان در خاک‌های مایه-زنی نشده شد. شناسه‌های گیاهی مانند رویه ویژه برگ، تندی رشد نسبی (RGR)، وزن خشک، بلندی بوته و فراوانی شاخه‌ها؛ غلاف‌ها و دانه‌ها در هر بوته، برداشت دانه و وزن ۱۰۰ دانه به گونه چشم‌گیری در گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری‌های ریزوبیومی بویژه همزمان با کاربرد کود فسفر در برابر گواه آزمایش افزایش داشت (Gebremariam and Tesfay, 2021). از سوی دیگر کاربرد همزمان فارچ‌های میکوریزی و باکتری های افزاینده رشد گیاه می تواند مایه هم‌افزایی پیامد سودمند این قارچ‌ها بر رشد گیاه شود (Pourmirzaei et al., 2021; Nadian Ghomsheh, 2024). گزارش شده است که کاربرد همزمان قارچ‌های *Funneliformis mosseae* (FM)، *Rhizophagus intraradices* (RI) و *Rhizophagus irregalaris* (RIr) همراه با مخمر (*Issatchenkia orientalis*)و یا با باکتری افزاینده رشد گیاه (*Pseudomonas fluorescens VUPf5*) در کشت گیاه ذرت رقم *SC750* توان رشد آن بیشتر شد. در این تیمارها شناسه‌هایی چون پهنا و درازی ساقه، رویه برگ، وزن تر و خشک‌ریشه و وزن‌تر خشک شاخساره به گونه چشم-گیری افزایش یافت (Ahmadzadeh et al., 2022).بنابر پژوهش‌های یادشده کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در خاک می‌تواند مایه دگرگونی ویژگی‌های خاک شده و بر همزیستی گیاه نخود با ریزجانداران پیامد داشته باشد (Mittra et al., 2005; Channabasava et al., 2015). از آنجایی که دگرگونی ویژگی‌های خاک و همزیستی گیاه با باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌تواند مایه کاهش یا افزایش شناسه‌های رشدی گیاه نخود شود، پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در خاک نیاز به بررسی ویژه‌ای دارد. این پژوهش با هدف بررسی و شناخت پیامدهای کاربرد خاکستر زغال‌سنگ بر شناسه‌های همزیستی گیاه نخود سپید با قارچ‌های میکوریزی و باکتری *Mesorhizobium ciceri* در کودهای زیستی خریداری شده، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در خاکی با فسفر کم و بافت میانه (لوم شنی) انجام شد. برای آن یک خاک آیش که پیشتر در آن گندم کشت شده بود، در شهرستان ازندریان استان همدان

(۳۴″ ۳۰′ ۳۲/۲۷° عرض شمالی و ۴۸″ ۴۱′ ۵۵/۲۹° طول شرقی) گزینش و از لایه ۳۰-۰ سانتی متری آن به روش مرکب نمونه برداری گردید. همچنین خاکستر زغال‌سنگ بیتومین (گیلسونایت) از کانسار شک میدان- کلیدوند (شمال غرب شهرستان گیلان غرب) در طول جغرافیایی ۴۰″ ۳۵′ ۴۵° تا ۲۰″ ۵۰′ ۴۵° و عرض جغرافیایی ۲۰″ ۲′ ۳۴° تا ۳″ ۳۰′ ۳۴° در استان کرمانشاه گردآورده شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و خاکستر زغال‌سنگ به روش‌های زیر بررسی شد. دانه‌بندی و بافت خاک بر پایه قانون استوکس و به روش هیدرومتری بررسی شد (Gee and Bauder, 1986). دانه‌بندی و بافت خاکستر زغال‌سنگ نیز با بهره‌گیری از روش الک کردن بررسی و بر پایه سیستم وزارت کشاورزی آمریکا گزارش شد (Skaggs et al., 2001). توان رسانندگی الکتریکی در عصاره ۱:۵ خاک و خاکستر به آب، به کمک دستگاه رسانایی سنج (مدل ۷۱۲) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد (Roades, 1990). اسیدیته خاک و خاکستر در عصاره ۱:۵ خاک و خاکستر به آب، به کمک دستگاه پی اچ متر(مدل ۷۲۸) اندازه‌گیری شد (Thomas, 1996). اندازه‌گیری کربن آلی خاک به روش اکسایش تر انجام گرفت (Walkley and Black, 1934) ولی کربن آلی خاکستر زغال‌سنگ به روش سوزاندن در کوره اندازه‌گیری شد (SFS-EN, 2000). فسفر اولسن به کمک عصاره گیری بیکربنات سدیم ۰/۵ مولار در پی اچ ۸/۵ به روش اولسن و با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Morphy and Riley, 1962). کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی اندازه‌گیری شد (Loeppert and Suarez, 1996). گنجایش تبادل کاتیونی به کمک استات سدیم و و استات آمونیوم اندازه‌گیری شد (Bower et al., 1952).

کاربرد تیمارها و کشت گیاه

این پژوهش آزمایشی سه فاکتوره بود که به گونه کاملا تصادفی در سه تکرار بر روی خاک سترون شده در اتوکلاو به روش زیر در گلخانه دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. فاکتور نخست، خاکستر زغال‌سنگ در چهار اندازه (بدون خاکستر زغال‌سنگ (گواه خاکستر)، ۲/۵ درسد، ۵ درسد و ۱۰ درسد)، فاکتور دوم مایه‌زنی با قارچ میکوریزی بود که در سه تیمار بدون مایه‌زنی میکوریزا (گواه قارچ)، مایه‌زنی با *Glomus moseae* و مایه‌زنی با *Rhizophagus irregularis* بود. فاکتور سوم آزمایش مایه‌زنی با *مزوریزوبیوم* بود که در دو تیمار بدون مایه‌زنی با *مزوریزوبیوم* (گواه *Mesorhizobium ciceri*) و با مایه‌زنی *مزوریزوبیوم* انجام شد. قارچ‌های میکوریز از کلینیک گیاه پزشکی ارگانیک در شهرستان اسدآباد در استان همدان و همچنین باکتری بکار رفته (*مزوریزوبیوم سیسری*) از شرکت زیست مهر آسیا در استان سمنان خریداری شد. برزهای نخود بکاررفته در این پژوهش رقم بیونیج و بومی استان کرمانشاه است که از جهاد کشاورزی شهرستان گیلانغرب خریداری شد.در آغاز نمونه خاک به دست آمده با ۴ اندازه صفر، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درسد از خاکستر زغال‌سنگ آمیخته شد. سپس هر یک از آمیخته‌های خاک و خاکستر برای نیم ساعت در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد سترون گردید. برای کشتن همه اسپورهای قارچ و سترون‌سازی خاک این کار برای سه بار در سه روز انجام شد. رویه دانه‌های نخود نیز به کمک محلول ۱ درسد هیپوکلرید سدیم (وایتکس خانگی) گندزدایی شدند (Safari Sinegani et al. 2010). سپس برای آلوده‌سازی با باکتری *مزوریزوبیوم*، برزهای نخود با کودزیستی ریزوچیک-پی سوپر پلاس[۴] مایه‌زنی شدند. کود ریزوچیک-پی سوپر پلاس

[۴] Rhizochickpea Super Plus Biofertilizer

به گونه پودر جامد بود. آماده‌سازی و کاربرد آن بر پایه روش یاداشت شده روی برچسب این فرآورده انجام شد. هنگام کاشت دانه‌های نخود، به اندازه ۰/۰۶۴ گرم از چسبی که درون جعبه کود بود با ۸ میلی لیتر آب شهری آمیخته شد، پس از آن ۲۰۰ گرم دانه‌های نخود گندزدایی شده با آن آمیخته شد. سپس ۵/۷۱ گرم از کود زیستی *Mesorhizobium ciceri* به گونه دورانی بر روی دانه‌های نخود آمیخته شده با چسب، پاشیده شد و به این گونه برزهای نخود به باکتری *Mesorhizobium ciceri* آلوده شدند.یادآور شود که رویه-ی گلدان‌های بکار رفته در آغاز با هیپوکلرید سدیم (وایتکس) شسته و گندزدایی شد. پس از وزن کردن گلدان‌ها، در کف هر یک از آنها به اندازه‌ای برابر سنگریزه برای انجام زهکشی ریخته شد. سپس ۳ کیلوگرم آمیخته خاک و خاکستر زغال‌سنگ با اندازه‌های یاد شده در بالادر گلدان‌ها ریخته شد. برای آلوده‌سازی گلدان‌ها به قارچ میکوریز، زادمایه به اندازه ۱۰۰ گرم در زیر جایگاه کشت برز در هر گلدان ریخته شد، و در هر گلدان ۶ دانه نخود مایه‌زنی شده به باکتری کاشته شد. سپس بر روی دانه‌ها ۳-۲ سانتی متر از آمیخته خاک و خاکستر ریخته شد. سپس گلدان‌ها در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا بر پایه الگوی طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار آرایش یافتند. روی هم رفته شمار گلدان‌ها در این آزمایش‌ها ۷۲ گلدان بود. گلدان‌ها بدون کاربرد هر گونه کود آلی یا شیمیایی روزانه بررسی و آبیاری شدند. پس از گذشت نزدیک دو هفته تنک شدن گیاه انجام شد و تنها دو گیاه در هر گلدان نگهداری شد و پس از گذشت نزدیک دو ماه هنگامی که گیاه به گام گلدهی رسید، برداشت گیاهان انجام شد. برای نمونه برداری از خاک و ریشه، پس از بریدن ساقه از جایگاه طوقه، خاک درون گلدان برگردانده شد و ریشه‌های گیاه نخود در هر گلدان جداسازی و برداشت شدند. بخشی از خاک‌ها هوا خشک و بخشی دیگر به گونه تازه و نمدار در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. شمار گره‌های ریزوبیومی ریشه در هر گلدان شمرده و وزن خشک آنها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس پس از ۴۸ ساعت در آون اندازه‌گیری شد (Khaghani and Teymuri, 2012; Safari Sinegani et al. 2010).

بررسی درسد میکوریزی شدن ریشه گیاه

برای برآورد درسد و نرخ کلونیزاسیون ریشه، از ریشه‌های نخود نمونه برداری شد و نمونه‌های تازه ریشه به آزمایشگاه رسانده شدند. بدین گونه که ریشه‌ها به خوبی از خاک بیرون آورده شدند و از آنها ریشه هایی به قطر نزدیک ۲ میلی متر جداسازی شد. برای رنگ آمیزی ریشه‌ها از روش فیلیپس و هیمن (۱۹۷۰) به گونه زیر بهره‌گیری شد (Phillips and Hayman, 1970). در آغاز ریشه‌های گیاه میزبان قارچ میکوریز را درون لوله آزمایش ریخته و چندین بار با آب شستشو داده شدند. برای رنگ بری و روشن شدن ریشه ها، آنها برای ۴۵ دقیقه در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درسد در بن ماری در حال جوش گذاشته شدند. زمان و دمای روشن‌سازی به تیپ ریشه بستگی دارد، برای نمونه ریشه‌های نازک در دمای کمتر یا زمان کوتاه تری رنگ بری می‌شدند. ریشه‌ها چند بار با آب مقطر شسته شدند تا هیدروکسید پتاسیم به خوبی از ریشه‌ها جدا شود. برای خنثی‌سازی با اسید، ریشه‌ها برای ۵-۳ دقیقه در محلول اسید کلریدریک ۱ درسد گذاشته شدند. برای رنگ آمیزی، ریشه‌ها در محلول ۰/۰۵ درسد آنیلین بلو گذاشته شد. شستشو و رنگ بری ریشه‌ها در محلول گلیسرول انجام شد. پس از این گام ریشه‌ها رنگ خود را از دست داده و تنها اندام قارچی به رنگ آبی دیده شد.برای ارزیابی درسد کلونیزاسیون ریشه‌ها از روش برخورد ریشه با خطوط مشبک[۵] بهره‌گیری شد (Giovannetti and Mosse, 1980). ریشه‌های رنگ

[۵] - Grid-line intersect method

آمیزی شده به گونه تصادفی در درون ظرف پتری پخش شدند. سپس زیر لوپ آزمایشگاهی و با کمک کاغذ شطرنجی اندازه همزیستی ریشه ارزیابی شد. شمار نقاطی از ریشه که با خطوط عمودی و افقی برخورد کرده بودند، شمرده شدند. سپس نقاطی از ریشه که آبی پررنگ تر داشتند (هیف، وزیکول و آربوسکول داشتند) نیز شمرده شدند. در پایان از بخش کردن این عدد (شمار نقاطی از ریشه که آبی پررنگ تر داشتند) بر کل برخوردهای ریشه با خطوط مشبک و سپس ضرب کردن در ۱۰۰، درسد میکوریزی شدن ریشه گیاه برآورد شد، این کار برای همه ریشه‌ها در سه تکرار انجام شد.

شمارش اسپور گلومال‌ها در خاک

اسپور قارچ‌های همزیست گلومرال‌ها در خاک با بهره‌گیری از روش سانتریفوژ در محلول شکری جداسازی و شمارش شدند (Daniels and Skipper, 1982).

اندازه‌گیری گلومالین آسان عصاره‌گیری شونده (EEG)[۶] و همه گلومالین (TG)[۷] خاک

برای اندازه‌گیری EEG و همه گلومالین TG خاک از روش Wright و Upadhyaya (1996) بهره‌گیری شد. برای عصاره‌گیری EEG یک گرم خاک (گذرانده شده از غربال ۲ میلی متری) را درون لوله سانتریفیوژ (اتوکلاو شدنی) گذاشته و ۸ میلی لیتر محلول سیترات سدیم ۲۰ میلی مولار به آن افزوده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس برای ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. سپس با دور ۵۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و آبگونه رویین[۸] در لوله تمیز ریخته شد. برای عصاره‌گیری TG، ۸ میلی لیتر از محلول سیترات سدیم ۵۰ میلی مولار بر روی همان نمونه خاک (از گام پیش) افزوده شد و ۳۰ ثانیه ورتکس شد، گام‌های دیگر کار همانند عصاره‌گیری EEG بود. آبگونه رویین گردآوری شد و سپس اندازه گلومالین عصاره پالایش شده با بهره‌گیری از روش Bradford (1976) و استانداردهای آلبومین سرم گاوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جمع گلومالین عصاره‌گیری در دو گام همه گلومالین خاک خواهد بود.

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش آزمایشی سه فاکتوره بود که در آن فاکتور یکم (C) کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در چهار اندازه ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درسد، فاکتور دوم (M) مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی در سه تیمار *Funneliformis mosseae* و *Rhizophagus irregularis* و بدون آنها (گواه) و فاکتور سوم (R) مایه‌زنی با باکتری *Mesorhizobium ciceri* و بدون آن (گواه) بود. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این پژوهش از طرح آماری کاملا تصادفی بهره‌گیری شد. بر پایه یافته‌های تجزیه واریانس برای آزمون میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در پایه آماری ۵ درسد بهره‌گیری شد. پردازش داده‌های هر ویژگی بررسی شده با نرم افزار Excel و آزمون‌های آماری به کمک نرم افزار SAS انجام شد.

یافته‌ها و بحث

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌برداری شده و خاکستر بکاررفته در این پژوهش در جدول ۱ آمده است. اندازه شن خاک بکار رفته در آزمایش ۷۶ درسد، سیلت ۱۸ درسد و رس آن ۶ درسد بود. بنابراین خاک نمونه‌برداری شده دارای بافت لوم شنی بوده است.

---

۶ - Easily extractable glomalin (EEG)

۷ - Total glomalin (TG)

۸ Supernatant

اسیدیته کارا (pH)، اندازه گنجایش تبادل کاتیونی (CEC) و پتاسیم فراهم در خاک نمونه‌برداری شده بالاتر از خاکستر زغال‌سنگ می‌باشد، ولی اندازه رسانندگی الکتریکی، کربنات کلسیم همسنگ، کربن آلی و فسفر فراهم در خاکستر زغال‌سنگ بالاتر از خاک نمونه‌برداری شده بود.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه برداری شده

نمونه	بافت	pH	EC (dS m^{-1})	CEC (Cmolc kg^{-1})	آهک معادل %	کربن آلی %	فسفر فراهم (mg kg^{-1})	پتاسیم فراهم (mg kg^{-1})
خاک	لوم شنی	۸/۲۳	۰/۱۳	۶/۲۳	۳/۹	۰/۳۹	۴/۷۴	۳۱۵
خاکستر	-	۷/۱۸	۰/۶۳	۲/۱۸	۸	۱/۷۷	۶/۴۰	۱۶۰

گره ریزوبیومی

پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی میکوریزا و مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* و برهم کنش‌های دوگانه و سه گانه این تیمارها بر وزن و شمار گره ریزوبیومی ریشه گیاه در هر گلدان در پایه آماری ۰/۱٪ چشم‌گیر شد (جدول ۲). همانگونه که در جدول ۳ دیده می‌شود در هیچ یک از گلدان‌های بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* ریشه‌های نخود گره‌زایی نداشت. این یافته نشان از آلوده نشدن خاک و گیاه به این باکتری‌ها در گلدان‌های سترون شده دارد. بالاترین میانگین شمار گره‌های ریزوبیومی در هر گلدان مایه‌زنی شده با *Mesorhizobium ciceri* (۴۱/۶۶) در تیمار خاکستر زغال‌سنگ ۲/۵ درسد و تیمار مایه‌زنی *Funneliformis mosseae* بود و کمترین شمار گره‌های ریزوبیومی در هر گلدان (۳/۶۶) در تیمار ۱۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ و بدون مایه‌زنی میکوریزا بود. به گونه‌ای که در تیمار خاکستر زغال‌سنگ در اندازه‌های ۵ و ۱۰ درسد در برخی ریشه‌ها گره‌ای یافت نشد. میانگین شمار گره‌های ریزوبیومی بر ریشه نخود در میان سویه‌های میکوریزا (*Funneliformis mosseae* و *Rhizophagus irregularis*) ناهمانندی چشم‌گیری نداشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ (C) ، مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی (M) و *Mesorhizobium ciceri* (R) بر برخی شناسه‌های همزیستی نخود سپید با ریزجانداران

منبع دگرش	درجه آزادی	شمار گره ریزوبیومی	وزن گره ریزوبیومی	درسد کلونیزاسیون	شمار اسپور	TG	EEG
(C)	۳	۷۳۴/۶**	۰/۱۲۹**	۷۷۱/۴**	۵۱۳۱۹**	۹۵۲۶۳**	۷۴۱۳۰**
(M)	۲	۶۶/۳**	۰/۰۰۴**	۸۱۵۹**	۲۸۳۴۰۷**	۳۴۰۹۱۰**	۱۵۶۹۹۸**
(R)	۱	۷۲۶۰/۱**	۱/۳۷**	۱۳۹/۴**	۱۵۱۶۷**	۲۴۶۴۸**	۱۹۶۴۱**
C*M	۶	۶۵/۹**	۰/۰۰۸**	۲۰۰/۳**	۱۳۸۶۰**	۳۱۲۵۸**	۲۵۲۰۳**
C*R	۳	۷۳۴/۶**	۰/۱۲**	۲/۴ ns	۱۴۳۵/۸ ns	۲۶۹۵*	۳۵۹۷**
M*R	۲	۶۶/۳**	۰/۰۰۴**	۴۷/۹*	۴۵۱۲/۳**	۷۹۷۳**	۷۶۳۲**
C*M*R	۶	۶۵/۹**	۰/۰۰۸**	۱۰/۲ns	۲۰۵۳/۵*	۲۵۳۴**	۲۷۰۲**
خطا	۴۸	۱۱/۰۵	۰/۰۰۰۷	۱۰/۷	۸۱۵/۴۵	۸۷۶/۹۳	۷۴۹/۹۳
ضریب دگرش‌ها		۳۳/۱۱	۱۹/۳۶	۱۵/۳۸	۲۲/۸۹	۱۲/۹۶	۱۸/۴۳

ns نشان دهنده چشم‌گیر نبودن، * و ** به ترتیب نشان دهنده چشم‌گیر بودن در پایه آماری۵ و ۱ درسد می‌باشد. TG همه گلومالین خاک و EEG گلومالین آسان عصاره‌گیری شونده خاک

بیشترین وزن گره (۰/۵ گرم در هر گلدان) و کمترین آن (۰/۰۲ گرم در هر گلدان) به ترتیب در تیمار خاکستر ۲/۵ درسد با مایه‌زنی میکوریزی و تیمار خاکستر ۱۰ درسد بدون مایه‌زنی میکوریز بود. وزن گره‌های ریزوبیومی

در تیمار ۱۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ میان ریشه‌های مایه‌زنی شده با میکوریزا و ریشه‌های مایه‌زنی نشده ناهمانندی چشم‌گیری وجود نداشت (جدول ۳).این بخش از پژوهش نشان داد که مایه‌زنی و کاربرد خاکستر زغال‌سنگ پیامد چشم‌گیری بر گره‌زایی مزوریزبیوم‌های بکار رفته در کشت نخود سپید دارد. اگر چه میان گونه‌های گلوموس بکاررفته ناهمانندی چشم‌گیری دیده نمی شود ولی کاربرد هر دو در خاک مایه بهبود گره‌زایی در گیاه خود شدند. از سوی دیگر کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در اندازه کم (۲/۵ درسد) در خاک مایه بهبود همزیستی گیاه با *Mesorhizobium ciceri* و گره‌زایی آن در برابر گواه بدون خاکستر شد ولی کاربرد بیش از آن (۵ و ۱۰ درسد) مایه کاهش همزیستی آنها و گره‌زایی شد.در پژوهشی پیامد مایه‌زنی دوگانه میکوریزا و ریزوبیوم بر کارکرد گیاه لوبیا در یک زمین کشاورزی بررسی و گزارش شد که شمار گره‌ها بر ریشه اصلی در کاربرد میکوریزا و سویه *Rhizophagus irregularis* و بدون مایه‌زنی ریزوبیوم بیشترین است (Safapur et al., 2012). در برابر آن شمار گره‌ها بر ریشه اصلی گیاه در تیمار میکوریزا و سویه *Rhizophagus irregularis* و مایه‌زنی ریزوبیوم کمترین بود. در این پژوهش کاربرد قارچ‌های میکوریزی و مایه‌زنی گیاه با ریزبیوم در برابر ریزجانداران بومی خاک ناکارآمد بوده اند. در برابر آن همراستا با یافته‌های این پژوهش Geneva و همکاران (2006) نشان داند که کاربرد میکوریزا و ریزوبیوم در کشت نخود مایه افزایش وزن خشک گیاه، نرخ فتوسنتز، ساخت گره‌های همزیست در ریشه و افزایش فعالیت تثبیت نیتروژن می‌شود. هر چند که کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در اندازه کم (۲/۵ درسد) مایه بهبود گره‌زایی با *Mesorhizobium ciceri* های بکاررفته شد ولی گزارش شده است که پی اچ بالا و اندازه‌های عناصر سنگین فراهم بالا در خاکستر زغال‌سنگ می‌تواند پیامد زیانباری برای ریزجانداران خاک که تثبیت نیتروژن می‌کنند، داشته باشد و مایه شکست فرایند گره‌زایی با ریزوبیوم‌ها شود (Cheung et al., 2000). این شاید کاهش گره‌زایی *Mesorhizobium ciceri* در کاربرد خاکستر زغال در اندازه بیشتر (۵ و ۱۰ درسد) را نشان دهد. گزارش شده است که فراوانی دانه‌های هم اندازه سیلت در خاکستر به سیمانی شدن خاک‌ها کمک می‌کند، که با تهویه بد خاک مایه کاهش اکسیژن برای ریزوبیوم‌ها شده و مایه کاهش فرایند گره‌زایی می‌شود (Pandey and Singh, 2010).

جدول ۳- آزمون میانگین شمار و وزن گره‌های ریزوبیومی بر ریشه گیاه نخود در تیمارهای خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی و *Mesorhizobium ciceri*

تیمار	شمار گره ریزوبیومی	انحراف معیار	وزن گره ریزوبیومی(گرم)	انحراف معیار
$C_1 M_1 R_1$	۱۹/۶۶ de	۳/۰۵	۰/۳۱ de	۰/۰۳
$C_1 M_1 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_1 M_2 R_1$	۳۳/۳۳ abc	۵/۰۳	۰/۴۰ bc	۰/۰۱
$C_1 M_2 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_1 M_3 R_1$	۲۹/۰۰ bcd	۳/۴۶	۰/۳۹ bcd	۰/۰۲
$C_1 M_3 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_2 M_1 R_1$	۲۳/۰۰ cde	۴/۵۸	۰/۳۵ cde	۰/۰۲
$C_2 M_1 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_2 M_2 R_1$	۴۱/۶۶ a	۳/۲۱	۰/۵۰ a	۰/۰۲
$C_2 M_2 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_2 M_3 R_1$	۳۶/۳۳ ab	۵/۵۰	۰/۴۷ ab	۰/۰۳
$C_2 M_3 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_3 M_1 R_1$	۱۹/۰۰ de	۴/۰۰	۰/۳۰ e	۰/۰۲
$C_3 M_1 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_3 M_2 R_1$	۸/۰۰ fg	۴/۳۵	۰/۱۱ f	۰/۰۱
$C_3 M_2 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_3 M_3 R_1$	۱۴/۶۶ ef	۲/۰۸	۰/۲۷ e	۰/۰۲
$C_3 M_3 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_4 M_1 R_1$	۳/۶۶ g	۶/۳۵	۰/۰۲ g	۰/۰۴
$C_4 M_1 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_4 M_2 R_1$	۷/۶۶ fg	۷/۵۰	۰/۰۸ fg	۰/۰۷
$C_4 M_2 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰
$C_4 M_3 R_1$	۵/۰۰ fg	۴/۵۸	۰/۰۶ fg	۰/۰۵
$C_4 M_3 R_2$	۰ g	۰	۰ g	۰

C_1، C_2، C_3 و C_4 به ترتیب تیمار کاربرد خاکستر در اندازه های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد؛ M_1 تیمار بدون مایه‌زنی قارچ ، M_2 و M_3 به ترتیب تیمار مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی قارچ *Rhizophagus irregularis*؛ R_1 و R_2 به ترتیب تیمار مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* و تیمار بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* (درهر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشم‌گیری ندارند).

به هر گونه کاربرد خاکستر زغال‌سنگ (در اندازه کم) برای افزایش نیتروژن خاک در کشت گیاهان در زمین‌های نابارور سودمند است (Vajpayee et al., 2000). Rezae و همکاران (2023) گزارش کردند که کاربرد خاکستر بادی زغال‌سنگ در اندازه کم ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و شناسه‌های رشدی گیاه را بهبود می‌دهد. ولی کاربرد اندازه-های بالاتر (۲۵٪) آن، مایه پیدایش تنش‌های اکسیداتیو و کاهش رشد گیاه می‌گردد.

درسد میکوریزی شدن ریشه

تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی درسد میکوریزی شدن ریشه نشان داد که پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در خاک، مایه‌زنی گیاه به قارچ‌های میکوریزی و باکتری *Mesorhizobium ciceri* بر درسد کلونیزاسیون ریشه با قارچ میکوریزیی در پایه آماری ۰/۰۱ چشم‌گیر بود. پیامد برهم کنش کاربرد خاکستر و مایه‌زنی میکوریزا بر درسد میکوریزی شدن ریشه در پایه آماری ۰/۰۱ چشم‌گیر بود و همچنین پیامد برهم کنش مایه‌زنی میکوریزا و *Mesorhizobium ciceri* بر این همزیستی در پایه آماری ۰/۰۵ چشم‌گیر بود. ولی پیامد برهم کنش سه گانه این تیمارها بر ا درسد میکوریزی شدن ریشه گیاه چشم‌گیر نبود (جدول ۲).جدول ۴ نشان می‌دهد که در هیچ یک از گلدان‌های بدون مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی ریشه‌های نخود در خاک سترون شده همزیستی میکوریزایی نداشت. این یافته نشان از آلوده نشدن خاک و گیاه به این قارچ‌ها دارد. بیشترین اندازه کلونیزه شدن ریشه مایه‌زنی شده با این قارچ‌ها (۴۴/۴۱ درسد) در تیمار خاکستر زغال‌سنگ در اندازه ۲/۵ درسد و مایه‌زنی با قارچ *Rhizophagus irregularis دیده شد* و کمترین آن (۱۸/۸۱ درسد) در تیمار خاکستر ۱۰ درسد و مایه‌زنی با *Funneliformis mosseae* بدست آمد. اگرچه درسد میکوریزی شدن ریشه با *Rhizophagus irregularis* کمی بیشتر بود ولی از دیدگاه آماری درسد میکوریزی شدن ریشه با گونه‌های *Funneliformis mosseae* و *Rhizophagus irregularis* در هر یک از تیمارهای خاکستر زغال‌سنگ ناهمانندی چشم‌گیری نداشت (جدول ۴). همراستا با این پژوهش Channabasava و همکاران (2015) گزارش دادند که بیشترین درسد کلونیزاسیون ریشه در تیمار ۲ درسد خاکستر زغال‌سنگ دیده شد و در این پژوهش همچنین با افزایش درسد خاکستر زغال‌سنگ درسد میکوریزی شدن ریشه کاهش یافت. با افزایش خاکستر زغال‌سنگ بکاررفته از درسد کلونیزاسیون ریشه با قارچ آربوسکولار میکوریزا در نهال‌های زیتون کاسته شد، به گونه‌ای که بالاترین درسد کلونیزاسیون (۹۰ درسد) در تیمار بدون خاکستر زغال و مایه‌زنی شده با قارچ آربوسکولار میکوریزا یافت شد و در کاربرد خاکستر ۵ ، ۱۰ و ۱۵ درسد، اندازه کلنیزاسیون به ترتیب ۸۴/۶۷ ، ۸۱/۳۳ و ۶۰/۰۰ درسد بود. گزارش شده است که خاکستر زغال‌سنگ دارای فسفر محلول بالایی است که خود می‌تواند مایه کاهش درسد میکوریزی شدن ریشه شود (Budi and Christina, 2013).

جدول ۴- آزمون میانگین درسد میکوریزی شدن ریشه نخود در تیمارهای قارچ‌های میکوریزی و خاکستر زغال‌سنگ

تیمار	درسد کلونیزاسیون ریشه	انحراف معیار
C_1M_1	۰ e	۰
C_1M_2	۳۰/۷۰ b	۱/۹۰
C_1M_3	۳۱/۲۶ b	۵/۷۲
C_2M_1	۰ e	۰
C_2M_2	۴۴/۳۰ a	۳/۳۲
C_2M_3	۴۴/۴۱ a	۳/۹۷
C_3M_1	۰ e	۰
C_3M_2	۳۳/۲۲ b	۴/۸۶
C_3M_3	۳۰/۸۵ b	۳/۱۴
C_4M_1	۰ e	۰
C_4M_2	۱۸/۸۱ c	۴/۲۷
C_4M_3	۲۱/۹۰ c	۶/۹۷

C_1، C_2، C_3 و C_4 به ترتیب تیمار کاربرد خاکستر در اندازه های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درسد؛ M_1 تیمار مایه‌زنی نشده قارچ ، M_2 و M_3 به ترتیب تیمار مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی قارچ *Rhizophagus irregularis* (درهر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشم‌گیری ندارند).

درسد میکوریزی شدن ریشه با هر یک از قارچ‌ها در تیمارهای مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بیشتر از آن در تیمارهای بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بود (جدول ۵)؛ به گونه‌ای این پیامد سودمند *Mesorhizobium ciceri* بر میکوریزایی شدن ریشه با قارچ *Rhizophagus irregularis* از دیدگاه آماری در پایه ۵٪ چشم‌گیر بود. شکل ۱ نمایی از ریش‌های رنگ آمیزی شده در تیمارهای *Funneliformis mosseae* و اینترارادیسز در گلدان‌های مایه‌زنی شده با *Mesorhizobium ciceri* را نشان می‌دهد. هر دو قارچ دارای هیف‌های راست در درون ریشه با وزیکول‌های فراوان بوده و از دیدگاه ریخت شناسی به گونه آروم[۹] هستند.

بررسی‌های پیشین نشان داده است که میکوریزی شدن ریشه و همزیستی با قارچ آربوسکولار میکوریزا، بستگی به اندازه فسفر محلول در خاک دارد، به گونه‌ای که با افزایش اندازه فسفر محلول در خاک، از اندازه کلنیزاسیون ریشه کاسته می‌شود (Sabannavar and Lakshman, 2009; Bedini et al., 2013; Safari-Sinegani and Elyasi-Yeganeh, 2017; Polcyn et al., 2019; Nadian Ghomsheh, 2024). هر چه نیاز گیاه به فسفر بیشتر باشد درسد میکوریزی شدن آن بیشتر می‌شود و شاید پیامد سودمند مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بر میکوریزایی شدن ریشه، وابسته به افزایش نیاز گیاه به فسفر باشد. زیرا این باکتری از راه‌های گوناگونی و بویژه تثبیت نیتروژن مایه افزایش رشد گیاه شده و نیاز فسفری گیاه را افزایش می‌دهد.Smith و Read (2008)نشان دادند که هنگامی که فسفر محلول در خاک پایین تر است، تراوایی پرده یاخته‌های مویین ریشه گیاه بیشتر بوده و این مایه تراوش بهتر اسیدهای آمینه و قندها در ریزوسفر و در پی آن کلونیزه شدن بیشتر ریشه گیاه می‌شود. گیاهان دارای همزیستی ریزوبیومی، قند و اسید آمینه بیشتری در خاک تراوش کرده که می تواند مایه رشد و گرایش بیشتر قارچ‌های میکوریزی برای همزیستی با گیاه شود. این یافته خود نیاز به بررسی ویژه‌ای دارد. از سوی دیگر Pourmirzaei و همکاران (2021) با بررسی پیامد کاربرد چهار گونه‌ی بومی *Streptomyces griseus*، *S. albogriseus*، *S.* sp1 و *S.* sp2 بر همزیستی قارچ *Rhizophagus irregularis* با گیاه شبدر برسیم (*Trifolium alexandrinum*) و رشد آن گزارش کردند که

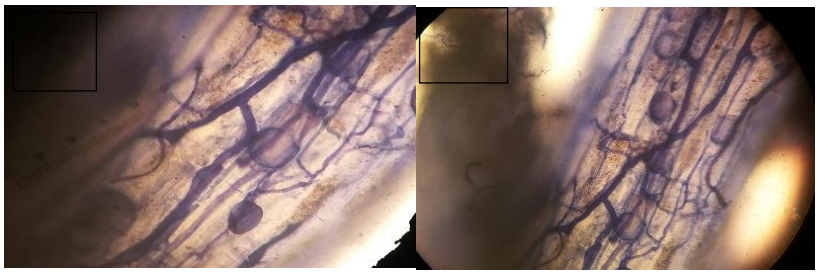
[۹] Arum type

کاربرد هر یک از این اکتینوباکتری‌ها مایه افزایش چشم‌گیر درسد همزیستی ریشه با قارچ میکوریزی و شناسه‌های رشد گیاه شده است. همچنین توانایی قارچ میکوریزی در افزایش جذب فسفر در گیاه و افزایش رشد ریشه و اندام هوایی آن در تیمارهای اکتینوباکتری‌ها به گونه چشم گیری افزایش یافته است.

جدول ۵- آزمون میانگین درسد میکوریزی شدن ریشه نخود در تیمارهای قارچ‌های میکوریزی و مایه‌زنی با *Mesorhizobium ciceri*

تیمار	درسد کلونیزاسیون ریشه	انحراف معیار
$M_1 R_1$	۰ c	۰
$M_1 R_2$	۰ c	۰
$M_2 R_1$	۳۳/۱۰ ab	۹/۸۶
$M_2 R_2$	۳۰/۴۱ b	۱۰/۱۶
$M_3 R_1$	۳۴/۹۳ a	۹/۴۸
$M_3 R_2$	۲۹/۲۸ b	۹/۰۶

M_1 تیمار مایه‌زنی نشده قارچ ، M_2 و M_3 به ترتیب تیمار مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی قارچ *Rhizophagus irregularis*، R_1 و R_2 به ترتیب تیمار مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* و تیمار بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* (درهر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشم‌گیری ندارند).



شکل ۱- ریشه رنگ آمیزی شده میکوریزی نخود سپید در تیمار ۲/۵ درسد خاکستر الف- مایه‌زنی شده با *Funneliformis mosseae*، و ب- مایه‌زنی شده با *Rhizophagus irregularis*

فراوانی اسپور گلومال‌ها در خاک

تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از شمارش اسپور گلومال‌ها در خاک نشان داد که پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی میکوریزا و *Mesorhizobium ciceri* بر فراوانی اسپور قارچ میکوریزا در خاک در پایه آماری ۰/۱ چشم‌گیر بود. همچنین پیامد برهم کنش دو گانه کاربرد خاکستر و میکوریزا بر این ویژگی در پایه آماری ۰/۱ چشم‌گیر شد. ولی پیامد برهم کنش دو گانه مایه‌زنی میکوریزا و *Mesorhizobium ciceri* و پیامد برهم کنش سه گانه تیمارها بر فراوانی اسپور گلومال‌ها در خاک در پایه آماری ۰/۵ چشم‌گیر شد. تنها پیامد برهم کنش دو گانه کاربرد خاکستر و مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بر فراوانی اسپور این قارچ‌ها در خاک از دیدگاه آماری نبود (جدول ۲). یافته‌های آزمون میانگین فراوانی اسپور گلومال در خاک در تیمار خاکستر زغال‌سنگ به کار برده شده در اندازه ۲/۵ درسد (در هریک از تیمارهای مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* و قارچ) بیشتر از آن در دیگر تیمارهای خاکستر زغال‌سنگ و گواه آزمایش (بدون خاکستر) بود. این تیماری از خاکستر است که در آن گیاه نخود بهترین رشد را داشت (در اینجا گزارش نشده است). فراوانی اسپور گلومال‌ها در تیمارهای بدون کاربرد خاکستر (گواه آزمایش) و تیمار کاربرد خاکستر در اندازه ۵ درسد، ناهمانندی چشم‌گیری نداشت. کمترین شمار اسپور در خاک تیمار شده با ۱۰ درسد خاکستر زغال‌سنگ بدست آمد که این نشان از پیامد ناخواسته خاکستر

در اندازه‌های بالا در خاک دارد. روهمرفته بیشترین شمار اسپور (۳۲۱/۳۳ شمار در ۱۰ گرم خاک) در تیمار خاکستر در اندازه ۲/۵ درسد مایه‌زنی شده با قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بدست آمد و کمترین شمار اسپور (۹۲/۶۷ شمار در ۱۰ گرم خاک) در تیمار خاکستر به اندازه ۱۰ درسد و مایه‌زنی شده با *Rhizophagus irregularis* و بدون *Mesorhizobium ciceri* بدست آمد. مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* مایه بیشتر شدن فراوانی اسپور این قارچ‌ها در خاک ریزوسفری شد. پس از برداشت گیاه نخود در خاک سترون بکار رفته در پژوهش در تیمارهای بدون مایه‌زنی قارچ میکوریز اسپوری یافت نشد (جدول ۶).

Channabasava و همکاران (2015) گزارش دادند که کاربرد ۲ درسد خاکستر زغال‌سنگ مایه افزایش شمار اسپورها در خاک می‌شود در برابر آن با افزایش درسد خاکستر زغال‌سنگ، شمار اسپورها کاهش می‌یابد به گونه‌ای که کمترین شمار اسپور در تیمار خاکستر ۶ درسد (بیشترین درسد خاکستر) گزارش شد. کاهش درسد کلونیزاسیون ریشه با قارچ میکوریز و کاهش شمار اسپور آنها در خاک در پاسخ به افزایش اندازه خاکستر زغال‌سنگ را می‌توان وابسته به ناشایست شدن ویژگی‌های خاک با خاکستر زغال‌سنگ دانست. خاکستر می‌تواند اندازه‌های عناصر غذایی، شوری، پ-اچ، فلزهای سنگین، فراوانی ریزجانداران خاک و کارکرد آنها را دگرگون کند و به شیوه‌های گوناگون در اندازه‌های بالا در خاک به گیاه آسیب بزند که به کاهش رشد و گسترش همزیستی میکوریزایی می‌انجامد. چناباسوا و همکاران (۲۰۱۵) همچنین گزارش کردند که میانگین شمار اسپور در خاک‌های مایه‌زنی شده با آربوسکولار میکوریزا بیش از دو برابر خاک‌های ناسترون مایه‌زنی نشده بود. Selvam و Mahadevan (2002) یک همبستگی مثبت میان کلونیزه شدن قارچ آربوسکولار میکوریزا و شمار اسپور را در کشت پیاز خوراکی در خاک بهسازی شده با ۲ درسد خاکستر زغال‌سنگ گزارش دادند. Garampalli و همکاران (2005) در یک آزمایش گلخانه‌ای با بهره‌گیری از نمونه خاک سترون و دارای فسفر کم، پیامد سه سطح خاکستر زغال‌سنگ (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم خاکستر در یک کیلوگرم خاک) را بر آلودگی قارچ آربوسکولار میکوریزا از گونه گلوموس اگرگیتوم[10] در گیاه نخود کفتری را بررسی کردند. آنها دیدند که همه غلظت‌های به کار برده شده خاکستر زغال‌سنگ نشانه چشم‌گیری بر درسد کلونیزاسیون قارچ آربوسکولار میکوریزا داشت ولی غلظت بالاتر از ۳۰ گرم بر کیلوگرم خاک (۳٪) به گونه چشم‌گیری مایه سرکوب ساختمان قارچ شد. یافته‌های بدست آمده در این پژوهش با گزارش‌های بالا همخوانی دارد. کاربرد خاکستر زغال تا ۲/۵ درسد بر فراوانی اسپورها در خاک پیامد سودمند داشت ولی کاربرد اندازه‌های بیشتر خاکستر در خاک (بویژه ۱۰ درسد) پیامد زیانبار داشته است. مایه‌زنی با ریزوبیوم نیز همانند آنچه که در بررسی درسد میکوریزی شدن ریشه دیده شد، پیامد سودمندی بر فراوانی اسپورها در خاک داشت. این یافته با گزارش دیگران همخوانی دارد. Selvam و Mahadevan (2002) یک همبستگی مثبت و چشم‌گیری میان کلونیزه شدن ریشه با قارچ آربوسکولار میکوریزا و شمار اسپور آنها در کشت پیاز خوراکی در خاک بهسازی شده با ۲ درسد خاکستر زغال‌سنگ را گزارش کردند. گزارش شده است که کاربرد باکتری‌های همزیست ریزوبیوم و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) در خاک به تنهایی و خاک تیمار شده با خاکستر بادی در کشت عدس (*Lens culinaris* Medik) پیامدهای سودمندی در پی داشته است. در برابر دیگر پژوهش‌ها تیمار خاک با ۲۵٪ خاکستر بادی به گونه چشم‌گیری رشد گیاه را افزایش داد. مایه‌زنی میکروبی، رشد گیاه و پارامترهای

[10] *G.aggregatum*

فیزیولوژیکی گیاه را بیشتر افزایش داد. فراوانی گره و وزن تر آنها، درسد کلونیزاسیون ریشه با قارچ‌های میکوریزایی در گیاهان مایه‌زنی شده با این ریزجانداران به گونه چشم‌گیری بالاتر بود. ولی جذب فلزات سنگین به گونه چشم‌گیری در تیمار قارچ‌های میکوریزی کمتر بود (Shaher et al., 2024).

همه گلومالین خاک (TG) و گلومالین آسان عصاره‌گیری شونده (EEG)

اندازه خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی میکوریزا و *Mesorhizobium ciceri* بر همه گلومالین خاک (TG) در پایه آماری ۰/۰۱ پیامد چشم‌گیری داشت و پیامد برهم کنش‌های دوگانه و سه گانه این سه تیمار بر اندازه TG در پایه آماری ۰/۰۱ چشم‌گیر بود. از سوی دیگر تجزیه واریانس داده‌های گلومالین آسان اندازه‌گیری شونده (EEG) نشان داد که همانند آنچه در بررسی TG خاک بدست آمد، پیامد کاربرد خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی میکوریزا و *Mesorhizobium ciceri* و نیز پیامد کنش‌های دوگانه و سه گانه این سه تیمار بر اندازه EEG در پایه آماری ۰/۰۱ چشم‌گیر بود (جدول ۲). یافته‌های آزمون میانگین اندازه این گلیکوپروتئین در خاک (جدول ۶) نشان داد که بالاترین اندازه TG خاک (۵۲۹/۵۹ میکرو گرم بر گرم خاک) در تیمار خاکستر ۲/۵ درسد، مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بدست آمد و کمترین اندازه آن (۱۶۷/۳۷ میکروگرم بر گرم خاک) در تیمار خاکستر ۱۰ درسد، مایه‌زنی *Rhizophagus irregularis* و بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بدست آمد. همانند درسد کلونیزاسیون ریشه و شمار اسپور قارچ در خاک، TG (در هریک از تیمارهای مایه‌زنی قارچ و *Mesorhizobium ciceri*) در تیمار خاکستر ۲/۵ درسد به اندازه چشم‌گیری بیشترین است. این گلیکوپروتئین‌ها در تیمارهای بدون کاربرد خاکستر (گواه) و تیمار خاکستر ۵ درسد با هم ناهمانندی چشم‌گیری ندارند. به هر گونه کاربرد خاکستر زغال‌سنگ در خاک به اندازه ۱۰ درسد پیامد زیانبار داشته و به اندازه چشم‌گیری از همزیستی قارچ‌ها با ریشه جلوگیری و ساخت گلومالین در خاک را کاهش داده است.

بالاترین اندازه EEG در خاک (۳۹۸/۴۸ میکرو گرم بر گرم خاک) همانند آنچه که در بررسی TG دیده شد، در تیمار خاکستر ۲/۵ درسد، مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی ریزوبیوم اندازه‌گیری شد و کمترین اندازه آن (۹۴/۱۸ میکروگرم بر گرم خاک) در تیمار خاکستر ۱۰ درسد، مایه‌زنی *Rhizophagus irregularis* و بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* بدست آمد. این نشان از پیامد سودمند خاکستر در اندازه‌های کم و پیامد زیانبار آن در اندازه‌های بالا بر همزیستی این قارچ‌ها با گیاه و ساخت گلومالین دارد که در این میان قارچ *Funneliformis mosseae* پایداری بیشتر و کارکرد بهتری داشته است و همزیستی *Mesorhizobium ciceri* با گیاه به آن کمک کرده اند. در بررسی چگونگی زیست بهسازی خاک یک کانسار زغال‌سنگ با کاربرد قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا (AMF) در کشت گیاه *آمورفا فروتیکوز*[۱۱] از تیره لگوم‌ها دیده شد که ویژگی‌های شیمیایی و زیستی خاک با گذشت زمان بهبود یافت. همه گلومالین خاک و EEG در خاک‌های تیمار شده با قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا به اندازه چشم‌گیری بیشتر از خاک‌های گواه (تیمار نشده) است (Qiu et al., 2019).

[۱۱] *Amorpha fruticose L.*

جدول ۶- آزمون میانگین شمار اسپور گلومال‌ها (SN)، همه گلومالین (TG) خاک و گلومالین آسان عصاره‌گیری شونده (EEG) در تیمارهای خاکستر زغال‌سنگ، مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی و *Mesorhizobium ciceri* در کشت گلدانی نخود سپید.

تیمار	SN (N 10 g^{-1})	انحراف معیار	TG (µg g^{-1})	انحراف معیار	EEG (µg g^{-1})	انحراف معیار
$C_1 M_1 R_1$	۰ f	۰	۹۱/۱۶ lm	۳/۴۰	۶۲/۸۳ i	۹/۱۰
$C_1 M_1 R_2$	۰ f	.	۹۴/۴۵ lm	۱۵/۹۵	۶۳/۸۰ hi	۹/۶۷
$C_1 M_2 R_1$	۲۸۰/۴۷ ab	۲۰/۰۰	۳۷۶/۹۱ bcd	۴۲/۷۰	۲۶۲/۴۲ cd	۲۲/۰۶
$C_1 M_2 R_2$	۱۴۷/۶۷ de	۲۸/۱۴	۲۷۰/۰۱ fghi	۲۳/۸۸	۱۲۱/۶۸ fghi	۱۸/۴۲
$C_1 M_3 R_1$	۱۶۸/۰۰ de	۳۳/۵۱	۲۹۵/۷۵ defg	۱۵/۵۷	۱۷۳/۶۲ efg	۲۲/۷۳
$C_1 M_3 R_2$	۱۵۳/۳۳ de	۳۴/۹۶	۲۸۱/۴۴ efgh	۱۰/۸۰	۱۴۹/۷۳ fgh	۱۸/۶۰
$C_2 M_1 R_1$	۰ f	۰	۸۲/۵۱ m	۱۱/۲۵	۴۹/۱۸ i	۹/۲۶
$C_2 M_1 R_2$	۰ f	۰	۸۲/۶۰ m	۱۴/۲۲	۵۱/۵۸ i	۹/۷۸
$C_2 M_2 R_1$	۳۲۱/۳۳ a	۲۹/۱۴	۵۲۹/۵۹ a	۷۴/۶۵	۳۹۸/۴۸ a	۴۹/۱۴
$C_2 M_2 R_2$	۳۰۳/۰۰ a	۳۴/۶۹	۴۶۰/۹۸ ab	۳۱/۲۱	۳۶۶/۹۵ ab	۶۴/۹۶
$C_2 M_3 R_1$	۲۹۸/۳۳ a	۱۵/۸۲	۴۰۳/۴۴ bc	۵۳/۱۵	۲۸۳/۷۹ bc	۳۸/۹۸
$C_2 M_3 R_2$	۲۵۹/۳۳ abc	۵۵/۵۰	۳۷۴/۴۴ bcde	۵۷/۴۸	۲۸۳/۹۴bc	۳۹/۸۷
$C_3 M_1 R_1$	۰ f	۰	۹۲/۳۷ lm	۱۸/۸۲	۵۰/۴۳ i	۱۴/۶۷
$C_3 M_1 R_2$	۰ f	۰	۱۰۷/۳۷ klm	۲۴/۸۰	۶۳/۰۶ i	۲۲/۶۴
$C_3 M_2 R_1$	۱۷۸/۰۰ cde	۵۶/۹۲	۳۱۲/۲۸ cdefg	۲۲/۷۹	۱۸۳/۳۴ def	۵۱/۱۰
$C_3 M_2 R_2$	۱۳۴/۶۷ de	۴۳/۰۰	۲۲۵/۵۶ ghij	۲۴/۶۲	۱۰۴/۶۸ fghi	۸/۱۳
$C_3 M_3 R_1$	۲۰۰/۳۳ bcd	۳۴/۲۶	۳۲۶/۷۲ cdef	۳۳/۹۷	۲۴۲/۰۰ cde	۳۸/۴۲
$C_3 M_3 R_2$	۱۲۹/۶۷ de	۴۷/۳۷	۱۹۴/۹۱ hijk	۱۸/۹۳	۱۲۷/۱۴ fghi	۱۲/۳۴
$C_4 M_1 R_1$	۰ f	۰	۹۹/۴۶ lm	۱۲/۷۲	۵۲/۷۹ i	۱۰/۸۶
$C_4 M_1 R_2$	۰ f	۰	۹۱/۴۹ lm	۳۰/۸۳	۵۶/۱۲ i	۲۰/۰۰
$C_4 M_2 R_1$	۱۲۵/۳۳ de	۲۹/۰۹	۱۸۲/۹۲ ijkl	۱۱/۴۷	۱۱۴/۸۷ fghi	۱۳/۲۳
$C_4 M_2 R_2$	۱۰۲/۰۰ e	۱۷/۶۹	۱۶۸/۵۸ jklm	۶/۹۴۱	۱۰۱/۸۶ fghi	۸/۵۷
$C_4 M_3 R_1$	۹۸/۶۷ e	۲۰/۷۴	۱۷۰/۱۵ jklm	۸/۵۳	۱۰۷/۴۲ fghi	۱۰/۸۶
$C_4 M_3 R_2$	۹۲/۶۷ e	۲۳/۴۵	۱۶۷/۳۷ jklm	۶/۷۴	۹۴/۱۸ ghi	۱۶/۹۲

C_1، C_2، C_3 و C_4 به ترتیب تیمار کاربرد خاکستر در اندازه های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد؛ M_1 تیمار بدون مایه‌زنی قارچ ، M_2 و M_3 به ترتیب تیمار مایه‌زنی قارچ *Funneliformis mosseae* و مایه‌زنی قارچ *Rhizophagus irregularis*؛ R_1 و R_2 به ترتیب تیمار مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* و تیمار بدون مایه‌زنی *Mesorhizobium ciceri* (درهر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشم‌گیری ندارند).

در باره نشانه سودمند ریزوبیوم‌ها بر ساخت و رهاسازی گلومالین در خاک نوشتاری یافت نشد ولی همانگونه که پیشتر یادآور شده این باکتری‌ها می‌توانند با بهبود همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریزی و با افزایش رشد گیاه، مایه افزایش ساخت و تراوش این دسته از پروتئین‌ها در خاک شوند. به هر گونه در خاک‌های سترون آزمایش شده در تیمارهای بدون مایه‌زنی میکوریزا نیز به اندازه‌های کمتری گلومالین بدست آمد (جدول ۶) که این اندازه‌ها می‌تواند وابسته به پروتئین‌های خویشاوند با گلومالین خاک[۱۲] (GRSP) یا گلیکوپروتئین‌های ساخته شده و تراوش شده از گیاه نخود مایه‌زنی شده یا نشده با *Mesorhizobium ciceri* باشد. گذشته از آن، این بخش می‌تواند وابسته به رهاسازی مواد آلی پپتیدی درون خاک هنگام سترون‌سازی آن در اتوکلاو نیز باشد. یادآور شود که در همه پژوهش‌ها آنچه که بنام گلومالین خاک اندازه گیری شده و گزارش می‌شود، پروتئین ویژه‌ای نیست. این شیوه اندازه‌گیری (روش Bradford (1976)) آمیخته‌ای از پروتئین‌های درون خاک را اندازه‌گیری می‌کند که می‌تواند در گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری‌های همزیست نیز افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که کاربرد خاکستر زغال‌سنگ از گونه بیتومین در اندازه کم (۲/۵ ٪) مایه افزایش فراسنجه‌های (پارامترهای) زیستی چون فراوانی و وزن گره‌های *Mesorhizobium ciceri* بر ریشه گیاه نخود سپید، درسد میکوریزی شدن ریشه، شمار اسپور گلومال‌ها در خاک و گلومالین یا گلیکوپپتیدهای خاک شده می‌شود. دیده شد که در خاک‌های تیمار شده با ۵ و ۱۰ درسد خاکستر همه این شناسه‌های زیستی کاهش پیدا کرده‌اند. روهمرفته کاربرد بیش از اندازه خاکستر زغال‌سنگ پیامدهای زیانباری دارد و مایه کاهش همزیستی این گیاه با قارچ‌های گلوموس و *Mesorhizobium ciceri* در برابر گواه آزمایش می‌شود. اگر چه پاسخ دو قارچ بکاررفته ناهمانندی چندانی نداشت ولی قارچ *Funneliformis mosseae* در برابر پیامد بد خاکستر بردباری بیشتر و کارکرد بهتری از خود نشان داد. مایه‌زنی و کاربرد *Mesorhizobium ciceri* مایه افزایش همزیستی قارچ‌ها بویژه *Rhizophagus irregularis* با گیاه شد و از سوی دیگر مایه‌زنی و کابرد قارچ‌ها میکوریزی به افزایش گره‌زایی و همزیستی *Mesorhizobium ciceri* با گیاه نخود انجامید. بنابراین کاربرد ۲/۵ درسد خاکستر زغال بیتومینه در خاک برای رشد گیاه نخود و همزیستی آن با ریزجانداران سودمند است ولی کاربرد بیش از آن می‌تواند پیامدهای زیانباری برای رشد گیاه داشته باشد.

---

[۱۲] Glomalin-related soil protein (GRSP)

1. Ahmadzadeh, M., Sedaghati, E., Sabri-Riseh, R., Rahimi, A., MohammadiMirik, A.A. and Hatami, N. 2022. Effect of mycorrhizal fungi accompanied by some microorganisms and chemical compounds on growth and photosynthesis indices of corn. Soil Biology Journal, 10 (1), pp. 33-48.
2. Ansari, M.S., Ahmad, G., Khan, A.A., Mohamed, H.I., 2023. Coal fly ash application as an eco-friendly approach for modulating the growth, yield, and biochemical constituents of Withania somnifera L. plants. *Environment Science and Pollution Research International*. 30(37), pp. 87958-87980. https://doi.org/10.1007/s11356-023-28318-x.
3. Bedini, S., Avio, L. and Sbrana, C., 2013. Mycorrhizal activity and diversity in a long-term organic Mediterranean agroecosystem. Biology and Fertility of Soils, 49(6), pp.781–790. https://doi.org/10.1007/s00374-012-0770-6.
4. Begum, N., Xiao, Y., Wang, L., Li, D., Irshad, A., Zhao, T., 2023. Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* alleviates drought stress in soybean with overexpressing the GmSPL9d gene by promoting photosynthetic apparatus and regulating the antioxidant system. Microbiological Research, 273, 127398. https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127398.
5. Bower, C.A., Reitmeir, R.F. and Fireman, M., 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. Soil Science, 73(4), pp.251–261. https://doi.org/10.1097/00010694-195204000-00001.
6. 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), pp.248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
7. Budi, S.W. and Christina, F., 2013. The effects of coal waste powder amendment and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth of jabon (*Anthocephalus cadamba* Miq) seedling in Ultisol soil medium. Journal of Tropical Soil, 18(1), pp.59–66. https://doi.org/10.5400/jts.2013.18.1.59.
8. Channabasava, A., Lakshman, H.C. and Muthukumar, T., 2015. Fly ash mycorrhizoremediation through *Paspalum scrobiculatum* L., inoculated with *Rhizophagus fasciculatus*. Comptes Rendus Biologies, 338(1), pp.29–39. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2014.11.002.
9. Cheung, K.C., Wong, J.P.K., Zhang, Z.Q., Wong, J.W.C. and Wong, M.H., 2000. Revegetation of lagoon ash using the legume species *Acacia auriculiformis* and *Leucaena leucocephala*. Environmental Pollution, 109(1), pp.75–82.

https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00235-3.

10. Daniels, B.A. and Skipper, H.D., 1982. Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
11. Ganjeali, A., Parsa, M. and Sabaghpour, S., 2008. Farming and agrosystems of pulses in pulses. JDM Press Iran.
12. Garampalli, R.H., Deene, S. and Narayana Reddy, C., 2005. Infectivity and efficacy of *Glomus aggregatum* and growth response of *Cajanus cajan* (L.) Millsp in fly ash amended sterile soil. Environmental Biology of Soils, 26(5), pp.705–708. PMID: 16459561.
13. Gebremariam, M., and Tesfay, T., 2021. Effect of P Application Rate and Rhizobium Inoculation on Nodulation, Growth, and Yield Performance of Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *International Journal of Agronomy*, 2021, 8845489, https://doi.org/10.1155/2021/8845489.
14. Gee, G.W. and Bauder, J.W., 1986. Method of soil analysis part 1: Physical and mineralogical methods. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
15. Geneva, M., Zehirov, G., Djonova, E., Kaloyanova, N., Georgiev, G. and Stancheva, I., 2006. The effect of inoculation of pea plants with mycorrhizal fungi and rhizobium on nitrogen and phosphorus assimilation. Plant Soil and Environment, 52(10), pp.435–440. https://doi.org/10.17221/3463-PSE.
16. Giovannetti, M. and Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84(3), pp.489–500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
17. Heydarizadeh, M., Naghavi, H. and Moghaadam, M.R., 2013. Study of the chemical, physical characteristics and reject coal fertility to use in the agriculture activities (case study: Coal washing plant Zarand-Kerman). Water and Irrigation Engineering, 4(4), pp.58–71.
18. Kochaki, A. and Banayan-Aval, M., 1993. Beans. Mashhad University Jahad Press, Iran.
19. Loeppert, R.H. and Suarez, D.L., 1996. Methods of soil analysis part 3: Chemical methods. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
20. Mittra, B.N., Karmakar, S., Swain, D.K. and Ghosh, B.C., 2005. Fly ash a potential source of soil amendment and a component of integrated plant nutrient supply system. Fuel, 84(4), pp.1447–1451. . https://doi.org/10.1016/j.fuel.2004.10.019.
21. Morphy, J. and Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. Analytica Chimica Acta, 27, pp.31–36. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
22. Mukerji, K.G. and Chmola, B.P., 2003. Compendium of mycorrhiza research. A.P.H. Publisher, New Delhi.

23. Nadian Ghomsheh, H., 2024. Phosphorus uptake and transport mechanism in symbiotic plants with arbuscular mycorrhizal fungi (Knowns and unknowns). Soil Biology Journal, 12 (2), pp. 155-190. https://doi.org/ 10.22092/sbj.2024.366288.267.
24. Pandey, V.C. and Singh, N., 2010. Impact of fly ash incorporation in soil systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136(1-2), pp.16-27. https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.11.013.
25. Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), pp.158-161. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
26. Pichtel, J.R., 1990. Microbial respiration in fly ash/sewage sludge amended soils. *Environmental Pollution*, 63(3), pp.225-237. https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90156-7.
27. Polcyn, W., Paluch-Lubawa, E., Lehmann, T. and Mikuła, R., 2019. Arbuscular mycorrhiza in highly fertilized maize cultures alleviates short-term drought effects but does not improve fodder yield and quality. *Frontiers in Plant Science*, 10, p.1510. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00496.
28. Pourmirzaei, Z., Lakzian, A., Ali Asgharzad, N., Dehnad, A.R.and Hallajnia, A., Effects of Streptomycets on colonization and growth of white clover inoculated with arbuscular mycorrhiza. *Soil Biology Journal*, 9 (2), pp. 155-171. https://doi.org/ 10.22092/SBJ.2021.352206.208.
29. Qiu, L., Bi, Y., Jiang, B., Wang, Z., Zhang, Y. and Zhakypbek, Y., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate the chemical properties and enzyme activities of rhizosphere soil in reclaimed mining subsidence in northwestern China. *Journal of Arid Land*, 11(1), pp.135-147. https://doi.org/10.1007/s40333-018-0019-9.
30. Rezaei Bisotoni, M., Ghorbani, J., Vahabzadeh, G., Hodjati, S.M., 2023. Physical and chemical characteristics of substrate material for plant growth on coal wastes in rangelands of Kiasar, Sari, Mazandaran province. *Journal of Rangeland*, 16(4), pp. 652-665. https://doi.org/20.1001.1.20080891.1401.16.4.1.9.
31. Roades, J.D., 1990. Methods of soil analysis part 3: Chemical methods. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
32. Sabannavar, S.J. and Lakshman, H.C., 2009. Effect of rock phosphate solubilization using mycorrhizal fungi and phosphobacteria on two high yielding varieties of *Sesamum indicum* L. *World Journal of Agricultural Science*, 5(4), pp.470-479.
33. Saberi, A., Vahabzadekebriya, Gh., Hojjati, S.M., and Mosavi, S.R., 2023. The effect of coal mining on the accumulation of Pb and Zn and their spatial distribution in the surface soil of Komarzd. *Water and Soil*

Management and Modeling, 3(3), pp. 56-71. https://doi.org/10.22098/mmws.2022.11395.1128.

34. Safapur, M., Ardakani, M.R., Rejali, F., Khaghani, S. and Teymuri, M., 2012. Effect of co-inoculation of mycorrhiza and rhizobium on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Finding in Agriculture*, 6(1), pp.21-35.
35. Safari Sinegani, A.A., 2013. Soil biology and biochemistry. 4th ed. Bu-Ali Sina University Press Center, Iran.
36. Safari-Sinegani, A.A. and Elyasi-Yeganeh, M., 2017. The occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soil and root of medicinal plants in Bu-Ali Sina garden in Hamadan, Iran. *Biological Journal of Microorganism*, 5(20), pp.43-59. https://doi.org/10.22108/BJM.2017.21145.
37. Safari Sinegani, A.A., Sharifi, Z., Safari Sinegani, M. 2010. Methods in applied microbiology. Iran, Hamadan: Bu-Ali Sina University Press Center, Iran.
38. Selvam, A. and Mahadevan, A., 2002. Distribution of mycorrhizas in an abandoned fly ash pond and mined sites of Neyveli Lignite Corporation Tamil Nadu India. *Basic and Applied Ecology*, 3(3), pp.277-284. https://doi.org/10.1078/1439-1791-00107.
39. SFS-EN, 2000. The European standard SFS-EN 12879 characterization of sludges. Determination of loss on ignition of dry mass. Finnish Standards Association SFS, Finnish Environmental Institute. Helsinki, Finland.
40. Shaher, H., Naushin, F., Hasan, M., and Bagyaraj, D.J., 2024. Synergistic impact of Rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on lentil plant tolerance to heavy metal-rich fly ash amended soil. *Discover Plants*, 9(1), 44372. https://doi.org/10.1007/s44372-024-00010-5
41. Singh, S.N., Kulshreshtha, K. and Ahmad, K.J., 1997. Impacts of fly-ash soil amendment on seed germination, seedling growth and metal composition of *Vicia faba*. *Ecological Engineering*, 9(3), pp.203-208. https://doi.org/10.1016/S0925-8574(97)10004-0.
42. Skaggs, T.H., Arya, L.M., Shouse, P.J. and Mohanty, B.P., 2001. Estimating particle-size distribution from limited soil texture data. *Soil Science Society of America Journal*, 65(4), pp.1038-1044. https://doi.org/10.2136/sssaj2001.6541038x.
43. Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, London, UK.
44. Thomas, G.W., 1996. Methods of soil analysis part 3: Chemical methods. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
45. Vajpayee, P., Rai, U.N., Choudhary, S.K., Tripathi, R.D. and Singh, S.N., 2000. Management of fly-ash landfills with *Cassia surattensis* Burm: A case study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(6), pp.675-682.

https://doi.org/10.1007/s0012800176.

46. 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), pp.29-38.

47. Wright, S.F. and Upadhyaya, A., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161(6), pp.575-586. http://dx.doi.org/10.1097/00010694-199609000-00003.

91-106/Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Edible, Poisonous, Medicinal, and Economically Valuable Agaric Fungi Symbiotic with Oriental Beech (*Fagus orientalis* Lipsky)

Hamed Aghajani [1*], Seyed Mohammad Hojjati[2], Mohammad Ali Tajick-Ghanbari[3], Mohammad Reza Pourmajidian[4] and Ali Borhani[5]

1-Assistant professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I. R. Iran. h.Aghajani@sanru.ac.ir & hamed_aghajani_85@yahoo.com
2- professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I. R. Iran& Visiting Scientist, Department of Silviculture and Forest Ecology of Temperatec Zones, Georg-August- Göttingen University, Göttingen- Germany. s_m_hojjati@yahoo.com
3- Associate professor, Department of Plant protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I. R. Iran. tajick@gmail.com
4- professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I. R. Iran. m_r_pourmajidian@yahoo.com
5- Faculty Member of Agriculture and Natural Resources Research Center of Mazandaran, Passand Forest and Rangeland Research Station, Behshar, I. R. Iran. borhani_ali@gmail.com

Article Info

Received: 2025-06-20
Accepted: 2025-08-17

Keywords: Soil biology, Ectomycorrhiza, Agaric mushroom, Ecology, Medicinal mushroom

Corresponding author's email: h.Aghajani@sanru.ac.ir &hamed_aghajani_85@yahoo.com

DOI: 10.22092/SBJ.2025.369850.281

Extended Abstract

Background and Objectives: The Hyrcanian forests of northern Iran, a UNESCO World Heritage site, represent a unique and ancient temperate ecosystem dominated by the climax species Oriental Beech (*Fagus orientalis*). The health and ecological succession of these forests are critically dependent on soil organisms, particularly ectomycorrhizal (ECM) fungi. These fungi form a vital symbiotic relationship with beech roots, where the fungal hyphae vastly increase the root system's surface area, enhancing nutrient cycling and protecting the host from pathogens and drought. While traditional mycological surveys based on mushroom collection are valuable, they often miss species that fruit infrequently or remain below ground. Therefore, modern molecular methods are essential for accurately inventorying the active symbiotic community. This study was therefore designed to address the knowledge gap regarding the ECM community associated with *F. orientalis*. The objectives were: (1) to molecularly identify the agaric ECM fungi associated with the roots of Oriental Beech trees in the Sangdeh forests; (2) to determine the edible, toxic, and medicinal potential of the identified species based on scientific literature; and (3) to provide a foundational dataset for future ecological and biotechnological research.

Materials and Methods: The study was conducted in the Sangdeh forests of Mazandaran, Iran, across an elevation range of 1200 to 2100 meters, an area characterized by high rainfall and a mix of beech, hornbeam, and maple trees. A total of 45 *F. orientalis* trees were sampled across this altitudinal gradient. Fine root samples were collected from the top 10 cm of soil, where ECM activity is highest. In the laboratory, individual ECM root tips were sorted based on morphology. DNA was extracted using the CTAB method, which is effective for fungal tissues. The Internal Transcribed Spacer (ITS) region, the official DNA barcode for fungi, was amplified via PCR using the primers ITS1F and ITS4/ITS4B. PCR products were purified and subjected to Sanger sequencing. The resulting DNA sequences were edited in BioEdit and identified by comparison to the NCBI GenBank database (≥98% similarity threshold). A phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, with the most appropriate nucleotide substitution model selected based on the Akaike Information

Criterion (AIC). The statistical confidence of the tree's branches was assessed with 1000 bootstrap replicates. *Saccharomyces cerevisiae* was used as the outgroup.

Results: The molecular analysis led to the identification of 15 distinct species of ectomycorrhizal agaric fungi, distributed across 5 genera: *Russula*, *Cortinarius*, *Inosperma*, *Lactarius*, and *Hebeloma*. The dominance of *Russula* and *Cortinarius* in both species richness and frequency is consistent with findings from other temperate beech forests globally, confirming their strong symbiotic affinity with this host. A comprehensive review of scientific literature allowed for the functional categorization of these 15 species. Six were identified as edible: *Russula chloroides*, *R. delica*, *R. brevipes*, *R. faginea*, *Cortinarius collinitus*, and *Lactarius subdulcis*. Among these, *Russula delica* and *Cortinarius collinitus* are particularly noteworthy, as they are also reported to possess valuable medicinal properties, with compounds showing antimicrobial and anti-tumor activities, respectively. An additional species, *Lactarius hepaticus*, was identified as having documented medicinal value due to its antioxidant compounds, bringing the total of medicinal fungi to three. In contrast, three species—*Inosperma adaequata*, *Cortinarius trivialis*, and *Lactarius chrysorrheus*—were identified as poisonous. The co-occurrence of these toxic fungi with valuable edible species highlights the significant risks of mycetism (mushroom poisoning) for local foraging communities and underscores the critical need for accurate identification.

A highly significant finding of this study was that the properties of four species (*Russula integriformis*, *Cortinarius rigens*, *C. alboaggregatus*, and *Hebeloma bulbiferum*) remain uncharacterized. These fungi represent a scientific frontier and warrant prioritization for future chemical screening, as novel bioactive compounds are frequently discovered in lesser-known fungal species. While broader national surveys like that of Ghobad-Nejhad et al. (2022) provide an essential overview of Iranian mycoflora, our study provides the first host-specific, root-level confirmation of several of these species with *Fagus orientalis*, strengthening the ecological understanding of these precise associations. It should be noted, however, that this study provides a snapshot of the ECM community during a single sampling period; fungal community composition can exhibit significant seasonal variations which were not captured. The phylogenetic analysis provided robust support for our taxonomic identifications, confirming that all major genera formed well-supported monophyletic clades, often with bootstrap values exceeding 95% at key nodes, thereby validating the species-level assignments.

Conclusion: This study provides a precise, molecular-based inventory of the ectomycorrhizal agaric community associated with *Fagus orientalis* in the studied region. The results reveal a rich and functionally diverse community, confirming the co-existence of valuable edible and medicinal fungi alongside dangerous poisonous species. This underscores the dual importance of this below-ground biodiversity: its essential ecological role in maintaining forest health and resilience, and its significant potential as a source of novel natural products. The conservation of these fungal communities is crucial. Further research, particularly the chemical analysis of the uncharacterized species and the validation of medicinal properties in local populations, is highly recommended and could pave the way for sustainable applications through knowledge-based enterprises.

Cite this article: Aghajani, H., Hojjati, S.M., Tajick Ghanbari, M.A., Pourmajidian, M.R., Borhani,A., 2025. Edible, Poisonous, Medicinal, and Economically Valuable Agaric Fungi Symbiotic with Oriental Beech (Fagus orientalis Lipsky). Journal of Soil Biology, 13 (1),91-106.

DOI: 10.22092/SBJ.2025.369850.281
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

قارچ‌های آگاریک خوراکی، سمی، دارویی و دارای ارزش اقتصادی همزیست با راش شرقی

حامد آقاجانی[۱*]، سید محمد حجتی[۲]، محمدعلی تاجیک قنبری[۳]، محمدرضا پورمجیدیان[۴] و علی برهانی[۵]

۱-استادیار گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران h.Aghajani@sanru.ac.ir, hamed_aghajani_85@yahoo.com

۲-استاد گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران و محقق مهمان، انستیو جنگلشناسی و اکولوژی جنگل مناطق معتدله، دانشگاه جورج- آگوست گوتینگن، آلمان. s_m_hojjati@yahoo.com

۳-دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. tajick@gmail.com

۴- استاد گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران m_r_pourmajidian@yahoo.com

۵-استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع پاسند، بهشهر، ایران. borhani_ali@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۲۶

چکیده

قارچ‌های اکتومیکوریز از لحاظ اقتصادی یکی از مهم‌ترین گروه قارچ‌های خاک به شمار می‌رود، علاوه بر پراکنش وسیع، بخش قابل توجهی از بیومس خاک را به خود اختصاص داده‌اند. نمونه‌برداری از ریز ریشه‌ها به عمق ۱۰ سانتی‌متر جهت شناسایی قارچ اکتومیکوریز انجام شد و در آزمایشگاه قارچ‌شناسی از طریق استخراج دی‌ان‌ای ناحیه ITS nrDNA با استفاده از زوج آغازگرهای ITS1F و ITS4B یا ITS4 تکثیر و توالی‌یابی شد و با نرم افزار Bio edit اصلاح و در NCBI مورد بررسی قرار گرفتند و قارچ‌های اکتومیکوریز به طریق مولکولی و استخراج DNA شناسایی شدند و خاصیت خوراکی، سمی، دارویی و دارای ارزش اقتصادی از طریق منابع معتبر انجام گرفت. کلادوگرام حاصل از مقایسه‌ی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه‌های به دست آمده (جنس‌های *Russula*، *Cortinarius*، *Lactarius*) با دیگر گونه‌های همین جنس‌ها موجود در Genbank با روش بیشینه تشابه و اعداد موجود در محل انشعاب نشان دهنده‌ی درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ بار تکرار نمونه‌گیری می‌باشد. *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان خارج گروه به کار برده شده است. نتایج مولکولی این پژوهش نشان داد که ۱۵ گونه از قارچ‌های همزیست اکتومیکوریز شناسایی شدند که از ۵ جنس *Russula*، *Cortinarius*، *Inosperma*، *Lactarius* و *Hebeloma* می‌باشند که جنس‌های *Russula* و *Cortinarius* بیشترین فراوانی را داشته‌اند. همچنین از این ۱۵ گونه ۶ گونه *Russula chloroides*، *Russula delica*، *Russula brevipes*، *Russula faginea*، *Cortinarius collinitus* و *Lactarius subdulcis* خاصیت خوراکی داشته‌اند که از میان دو گونه *Russula delica* و *Cortinarius collinitus* علاوه بر ارزش خوراکی، دارای خواص دارویی و اقتصادی نیز می‌باشند. به‌علاوه قارچ *Lactarius hepaticus* دیگر گونه دارویی شناسایی شده بود که خاصیت دارویی آنتی‌اکسیدانی داشته است که در مجموع نتایج کلی نشان داد سه گونه *Russula delica*، *Cortinarius collinitus* و *Lactarius hepaticus* دارای خواص دارویی مستند می‌باشند که دو گونه اول علاوه بر آن، ارزش خوراکی نیز دارند. سه گونه *Inosperma adaequata*، *Cortinarius trivialis* و *Lactarius chrysorrheus* خاصیت سمی داشته‌اند و نکته جالب، خاصیت مابقی قارچ‌ها ناشناخته‌اند. نتایج این پژوهش نشان داد که جنگل‌های راش ایران میزبان تنوع قابل توجهی از قارچ‌های اکتومیکوریز با کارکردهای خوراکی، دارویی و سمی هستند. شناسایی این گونه‌ها علاوه بر غنای دانش بوم‌شناسی جنگل، می‌تواند مبنایی برای مطالعات بیشتر در زمینه پتانسیل دارویی و اقتصادی قارچ‌های بومی فراهم آورد. پیشنهاد می‌شود با توجه به پراکنش انواع قارچ‌های دارویی، استخراج انواع متابولیت‌ها از منابع بومی جنگل ایران با استفاده از شرکت‌های دانش‌بنیان مورد توجه قرار بگیرد.

کلیدواژه: زیست‌شناسی خاک، اکتومیکوریز، قارچ آگاریک، بوم شناسی، قارچ دارویی.

استناد: آقاجانی ، ح.، حجتی، م.، تاجیک قنبری، م.ع.، پورمجیدیان، م.ر.، برهانی، ع.، ۱۴۰۴. قارچ‌های آگاریک خوراکی، سمی، دارویی و دارای ارزش اقتصادی همزیست با راش شرقی. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱) ،۱۰۶-۹۱ .

مقدمه

جنگل‌های پهن‌برگ شمال ایران با قدمتی بیش از یک میلیون سال مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی، یکی از غنی‌ترین و با ارزش‌ترین بوم‌سازگان‌های جنگلی جهان هستند که به صورت نواری با طول حدود ۸۰۰ کیلومتر و عرضی بین ۲۰ تا ۷۰ کیلومتر در نواحی جنوبی دریای کاسپین پراکنش دارند. مساحت این جنگل‌ها حدود ۱/۹ میلیون هکتار بوده و از ارتفاعات جلگه‌ای تا ارتفاعات بالای ۲۸۰۰ متر امتداد دارند (Marvie Mohajer, 2011). یکی از گونه‌های درختی غالب و مهم جنگل‌های هیرکانی راش شرقی (*Fagus orientalis* lipsky) گونه کلیماکس و نهایی جنگل است که از لحاظ توالی اکولوژیکی و پویایی بوم‌سازگان اهمیت دارد. یکی از موجودات زنده خاک که در این روند توالی بوم‌سازگان جنگل به راش کمک می‌کند قارچ‌های اکتومیکوریز هستند. قارچ‌های اکتومیکوریز که از لحاظ اقتصادی از مهم‌ترین گروه‌های قارچ‌های خاک به شمار می‌رود عناصری همچون فسفر، نیتروژن، سولفور و روی را از خاک دریافت کرده و آنها را به گیاه میزبان انتقال می‌دهند که این انتقال، تا حد زیادی تابع سیستم ریشه گیاه میزبان است (Siddiqui and Pichtel, 2008). قارچ‌های میکوریزی، کربن و سایر مواد آلی مورد نیاز خود را نیز از درخت دریافت نموده و در مقابل درخت را در جذب آب، نمک‌های معدنی و متابولیت‌ها (Alikhani and Ghorchiani, 2012) و انتقال فسفر (Nadian Ghomsheh, 2025) حمایت می‌کند. اکثر درختان جنگل از جمله درخت راش وابستگی شدیدی به همزیستی این ریزموجودات خاک‌زی دارند که از طریق روابط اکولوژیک همزیستی دو طرفه سودمند بینشان در بوم‌سازگان جنگل انجام می‌شود (Alikhani and Ghorchiani, 2012). در کنار قارچ‌های اکتومیکوریز، باکتری‌های محرک رشد نیز در بهبود رشد گیاهان نقش دارند (Khoshru et al., 2025). برخی از این ریز موجودات خاک‌زی، علاوه بر همزیستی و نقش اکولوژیک سودمند برای گیاهان، دارای ارزش مستقیم غذایی برای سلامت انسان‌ها هستند (Mishra and Shankar, 2025) که برخی از آنها جنبه خوراکی دارند و در اکوسیستم‌های مختلف از جمله جنگل یا مرتع در زنجیره غذایی روستانشینان جنگل مانند: *Cantharellus cibarius* (زرده کیجا)، *Boletus edulis* (قارچ بولت)، *Amanita caesarea* (قارچ سزار)، *Tuber aestivum* (ترافل) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Aghajani et al., 2020). بنابراین علاوه بر خاصیت خوراکی می‌توانند سمی، دارویی یا دارای ارزش اقتصادی باشند. جمعیت و تنوع قارچ‌ها در شرایط اکولوژیک مناطق مختلف بسیار متغیر است. این موجودات منبع مواد فوق-العاده با ارزشی مانند آنتی بیوتیک‌ها بوده و از دیر باز قارچ-های کلاهک‌دار به عنوان دارو در طب سنتی استفاده شده اند. با توجه به مصارف مختلف قارچ‌ها در صنایع داروسازی، شناسایی آنها اولین گام در بهره برداری دارویی از این موجودات است (Smith et al., 2002). برخی از عصاره‌ها و ترکیباتی که اخیرا از قارچ‌های کلاهک‌دار دارویی به دست آمده‌اند، امید زیادی را به لحاظ داشتن خواص تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد سرطان، قلبی-عروقی، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد انگل و محافظت کننده در برابر هپاتیت و بیماری قند به وجود آورده‌اند (Aghajani et al., 2020). قارچ‌های خوراکی منبع خوبی از پروتئین‌های قابل هضم هستند و می‌توانند منبع بسیاری از مواد مغذی مختلف مانند بتا گلوکان‌ها، لکتین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیبات فنلی، توکوفرول‌ها، اسید اسکوربیک و کاروتنوئیدها باشند. بنابراین، مصرف قارچ‌های ماکروسکوپی خوراکی با بهره‌گیری از اثرات ترکیبی و هم افزایی تمامی ترکیبات زیست فعال موجود، سلامت را ارتقا می‌دهد (Varghese et al., 2019). در ایران Hosseini et al., (2010) در خرم آباد اقدام به شناسایی قارچ‌های دارویی و سمی پرداختند و نتایج آنها منجر به یافتن سه گونه قارچ دارویی و پنج گونه قارچ سمی بوده است. با وجود اهمیت این قارچ‌ها، دانش ما در مورد

تنوع گونه‌ای آن‌ها در سطح ریزوسفر ریشه و معرفی خاصیت‌های آن ناشناخته است.

توصیف تنوع زیستی قارچ‌های اکتومیکوریز در بوم‌سازگان‌های جنگلی یک پیش نیاز برای تجزیه و تحلیل ساختار و نقش عملکردی آنها است. شناسایی دقیق گونه‌های همزیست با راش شرقی با استفاده از روش‌های دقیق و نوین مولکولی، گامی ضروری برای درک کامل تنوع زیستی و بهره‌برداری پایدار از این منابع است. در سال‌های قبل شناسایی گونه‌های قارچ‌های اکتومیکوریز بر اساس ویژگی های اندام های بارده انجام می‌شد (Straatsma et al., 2001; Smith et al., 2002). ارزیابی اندام‌های باردهی بالای سطح خاک متداول‌ترین روش بود، زیرا اسپوروکارپ‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد تاکسونومیکی در سطح گونه شناسایی می‌شدند. با گذشت زمان معلوم شد که این ارزیابی‌ها دقیقا نمایانگر تنوع یا ترکیب گونه‌ای در جوامع قارچ های اکتومیکوریز داخل خاک نیستند (Gardes and Bruns 1996; Zhou et al., 2001). این ممکن است به این خاطر باشد که برخی از قارچ های اکتومیکوریز به خصوص Ascomycota, Corticiaceae و Thelephoraceae اندام‌های باردهی کوچک یا مخفی را تولید می‌کنند که در ارزیابی‌های اندام‌های باردهی از آن‌ها چشم پوشی می‌شود. دیگر قارچ های اکتومیکوریز ممکن است تولید اندام باردهی داخل خاک تولید کنند و یا مرحله جنسی شناخته شده‌ای (مانند *Cenococcum geophilum*) نداشته باشند. به علاوه، تولید اندام بارده بستگی به شرایط محیطی مثل رطوبت و دما دارد و بعضی از قارچ‌ها هر سال اندام باردهی تولید نمی‌کنند. بنابراین به هنگام توصیف جوامع قارچ‌های اکتومیکوریز، واضح است که باید خود قارچ‌های اکتومیکوریز مطالعه شوند تا قارچ‌هایی مشخص شوند که ارتباط فعالی با ریشه‌های گیاهان داشته‌اند (Sakakibara et al., 2002). امروزه تکثیر دی‌ان‌ای DNA برای حل برخی مشکلات سیستماتیکی مرتبط با شناسایی موجودات زنده بکار گرفته شده است. قارچ شناسان، ناحیه یا لوکوس ITS را به عنوان بارکد رسمی انتخاب کردند (Schoch et al., 2012). بنابراین استفاده از توالی‌یابی ناحیه ITS به عنوان یک بارکد ژنتیکی استاندارد، ابزاری قدرتمند برای شناسایی دقیق این قارچ‌هاست.

بنابراین این پژوهش با اهداف زیر انجام شد:

۱) شناسایی مولکولی قارچ‌های آگاریک اکتومیکوریز همزیست با ریشه درختان راش شرقی در جنگل‌های سنگده.

۲) تعیین پتانسیل خوراکی، سمی، دارویی و اقتصادی گونه‌های شناسایی‌شده بر اساس منابع معتبر علمی.

۳) فراهم آوردن داده‌های پایه برای مطالعات آتی در زمینه اکولوژی، حفاظت و کاربردهای بیوتکنولوژیک این قارچ‌ها.

مواد و روش‌ها

منطقهٔ پژوهش

این پژوهش در جنگل‌های سنگده مازندران، سری فلورد در قسمت جنوب‌شرقی شهر پل‌سفید مرکز شهرستان سوادکوه با مختصات طول جغرافیایی ۴′ °۵۳ تا ۷′ °۵۳ و عرض جغرافیایی ۲′ °۳۶ تا ۵′ °۳۶ انجام شده است. مساحت منطقه نزدیک به ۱۰۰۰ هکتار و ارتفاع از سطح دریا در منطقه مورد پژوهش بین 1200 تا ۲۱۰۰ متر، متوسط بارش سالیانه آن بیش از ۸۵۰ میلی‌متر می‌باشد (شکل ۱). عمده درختان منطقه راش که در برخی توده‌ها آمیخته با گونه‌های ممرز، پلت، بارانک، گیلاس وحشی، ون، انجیلی و غیره می‌باشد (Anonymous, 2010).

شکل ۱- منطقه مورد پژوهش در جنگل‌های سنگده مازندران
Figure 1. The studied area in Sangedeh forests, Mazandaran

شیوهٔ اجرای پژوهش

در جنگل‌های مورد پژوهش، تعداد ۴۵ پلات و در هر پلات یک درخت بطور تصادفی انتخاب شد و نمونه‌برداری از ریز ریشه‌ها به عمق ۱۰ سانتی‌متر، با توجه به اینکه بیشترین غالبیت و همزیستی اکتومیکوریزها در این عمق می‌باشد، و با فاصله ۶۰ سانتی‌متر از تنه درخت انجام گرفت (Cui and Mu, 2016). خاک از سطح ریشه‌ها شسته شده و از هر سیستم ریشه‌ای تعداد ۱ تا ۸ نوک‌ریشه (Huang et al., 2014) بر اساس نوع رنگ سطحی، شکل و خصوصیات مورفولوژیکی شامل ساده (بدون شاخه و انشعاب)، باریک ریخت، هرمی دوشاخه، برگچه‌ای نامنظم، مرجانی و گره‌دار و... جدا شدند (Ishida et al., 2007; Agere, 1991; Peterson et al., 2004).

استخراج دی‌ان‌ای (DNA)

برای استخراج دی‌ان‌ای از ریز ریشه‌های درختان جنگل از روش (Zamani, 2014; Aghajani et al., 2019) توسط ساییدن بافت نوک ریشه درون میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری با نیتروژن مایع و روش سی‌تب (CTAB[1]) صورت گرفت.

[1] Cetyltrimethylammonium bromide

آزمایش واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)

تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR (PCR master mix)، شامل ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ غلظتی، ۰/۶ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۴ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مول dNTPs حاوی ۲/۵ میلی مول از هر یک از dNTP، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم Smart Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر از محلول حاوی ۱۰ پیکو مول از آغازگر ITS1F، ۱ میکرولیتر از محلول حاوی ۱۰ پیکومول از آغازگر ITS4B یا ITS4 و ۱/۵ میکرولیتر محلول حاوی DNA قالب صورت گرفت (White et al., 1990; Gardes and Bruns, 1993). کلیه مواد به کار رفته در مخلوط PCR از شرکت سیناژن تهیه شدند.

برنامه حرارتی برای واکنش PCR به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی[2] به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس (یک چرخه)؛ مرحله واسرشتگی[3] به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال[4] به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس، مرحله گسترش[5] به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (۳۵ چرخه) و مرحله گسترش نهایی[6] به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود (Gardes and Bruns, 1993). پس از انجام واکنش، برای مشاهده محصول تکثیر شده PCR الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. محصولات تکثیر شده PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. توالی‌های بدست آمده بررسی شده و با نرم افزار Bio Edit نسخه (v7.1.9) (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) اصلاح شدند. سپس با استفاده از برنامه جستجوی بلاست با توالی‌های ذخیره شده در بانک داده‌های ژنی مقایسه شدند. آن‌هایی که بیشترین شباهت را داشتند مشخص گردیدند. اسامی گونه‌ای به جدایه‌هایی داده شد که شباهت توالی بیشتر یا مساوی ۹۸ درصد داشتند (Horton et al., 2013).

درخت فیلوژنی

کلادوگرام حاصل از مقایسه‌ی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه‌های به دست آمده (جنس‌های *Russula*، *Cortinarius*، *Lactarius*) با دیگر گونه‌های همین جنس‌ها موجود در بانک‌ژن[7] با روش بیشینه تشابه[8] و اعداد موجود در محل انشعاب نشان دهنده‌ی درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ بار تکرار نمونه‌گیری[9] می‌باشد. *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان خارج گروه[10] به کار برده شده است.

نتایج

نتایج شناسایی مولکولی این پژوهش نشان داد که ۱۵ گونه از قارچ‌های آگاریک همزیست اکتومیکوریز شناسایی شدند که از ۵ جنس *Russula*، *Cortinarius*، *Inosperma*، *Lactarius* و *Hebeloma* می‌باشند که جنس‌های *Russula* و *Cortinarius* بیشترین فراوانی را داشته‌اند. همچنین از این ۱۵ گونه ۶ گونه *Russula chloroides*، *Russula delica*، *Russula brevipes*، *Russula faginea*، *Cortinarius collinitus* و *Lactarius subdulcis* خاصیت خوراکی داشته‌اند که از میان دو گونه *Russula delica* و *Cortinarius collinitus* علاوه بر ارزش خوراکی، دارای خواص دارویی و ارزش اقتصادی نیز می‌باشند. به‌علاوه قارچ *Lactarius hepaticus* دیگر گونه دارویی شناسایی شده

[2] Initial denaturation
[3] Denaturation
[4] Annealing
[5] Extension
[6] Final extension

[7] Genbank
[8] Maximum Likelihood
[9] Bootstrap
[10] Outgroup

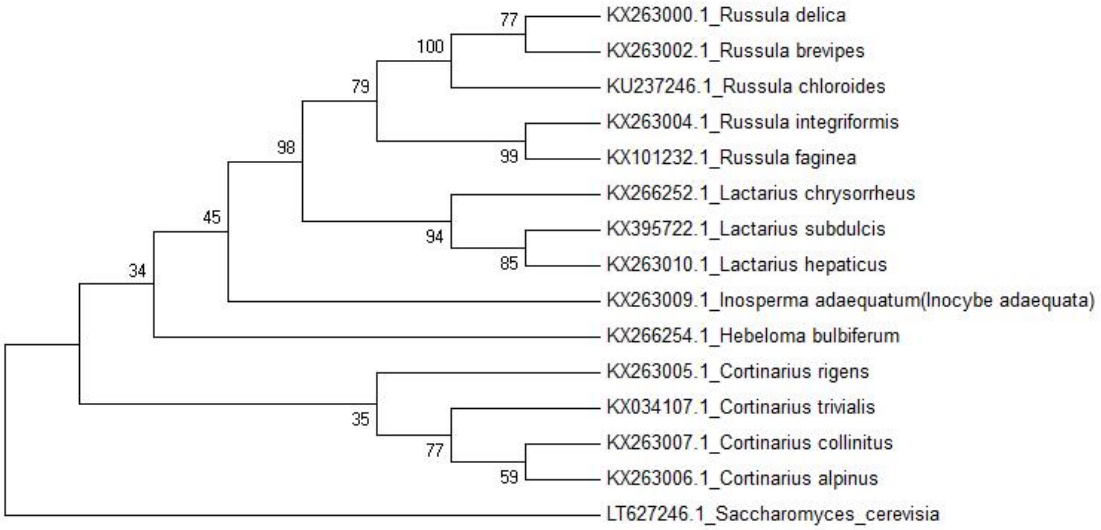
بود که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته است که در مجموع نتایج کلی نشان داد سه گونه *Russula delica*، *Cortinarius collinitus* و *Lactarius hepaticus* دارای خواص دارویی مستند می‌باشند که دو گونه اول علاوه بر آن، ارزش خوراکی نیز دارند. همچنین سه گونه *Inosperma adaequata*، *Cortinarius trivialis* و *Lactarius chrysorrheus* خاصیت سمی داشته‌اند و نکته جالب، خاصیت مابقی قارچ‌ها ناشناخته‌اند. (جدول ۱).

جدول ۱- منابع قارچ‌های خوراکی، سمی و دارویی اکتومیکوریز

Table 1. Sources of edible, poisonous and medicinal ectomycorrhizal fungi

آرایه قارچ اکتومیکوریز **ECM Taxon**	کد دسترسی ژن بانک **GenBank accession No**	خوراکی **Edible**	دارویی با عملکرد **Medicinal with functional**	سمی **Poisonous**
Russula chloroides (Krombh.) Bres (1900)	KU237246.1	خوراکی (Hall et al., 2003; Boa et al., 2004; Wu et al., 2019)	–	–
Cortinarius trivialis J.E. Lange (1940)	KX034107	–	–	سمی (Bau et al., 2014)
Russula delica Fr., (1838)	KX263000	خوراکی (Wu et al., 2019; Dai YuCheng et al., 2010; Boa et al., 2004)	ضد تومور (Dai et al. 2009; Zhao et al. 2010)، ضد میکروبی، آنتی اکسیدان و کنترل کننده ایدز (Yaltirak et al. 2009; Zhao et al. 2010; Giri et al. 2012)	–
Russula brevipes Peck (1890)	KX263002	خوراکی (Boa et al., 2004)	–	–
Russula faginea Romagn (1967)	KX101232	خوراکی (Dai YuCheng et al., 2010; Wu et al., 2019)	–	–
Russula integriformis Sarnari (1994)	KX263004	unknown	unknown	unknown
Cortinarius rigens (Pers.) Fr. (1838)	KX263005	unknown	unknown	unknown
Cortinarius alpinus Boud (1895)	KX263006	unknown	unknown	unknown
Cortinarius collinitus (Sowerby) Fr. (1838)	KX263007	خوراکی (Wu et al., 2019)	ضد تومور (Dai et al. 2009; Huang YaTing et al. 2018)	
Inosperma adaequata (Britzelm.) Sacc (1887)	KX263009	–	–	سمی (Farooq et al., 2013)
Lactarius hepaticus Plowr (1905)	KX263010	–	آنتی‌اکسیدان (Reis et al., 2011)	–
Lactarius chrysorrheus Fr. (1838)	KX266252	–	–	سمی (Bau et al., 2014; Wu et al., 2019)
Lactarius subdulcis (Pers.) Gray (1821)	KX395722	خوراکی (Wu et al., 2019; Gobad-nejhad et al., 2020)	–	–
Cortinarius alboaggregatus Soop (2005)	KX266253	unknown	unknown	unknown
Hebeloma bulbiferum Maire (1937)	KX266254	unknown	unknown	unknown

کلادوگرام حاصل از مقایسه‌ی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدای به دست آمده (جنس‌های *Russula*، *Cortinarius*، *Lactarius*) با دیگر گونه‌های همین جنس‌ها موجود در بانک‌ژن با روش بیشینه تشابه و اعداد موجود در محل انشعاب نشان دهنده‌ی درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ بار تکرار نمونه‌گیری می‌باشد. *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان خارج گروه به کار برده شده است. نتایج نشان داد توالی ناحیه‌ی ITS5 تمامی جدایه پس از تکثیر جهت مقایسه فیلوژنتیکی با توالی دیگر جدایه‌های جنس‌های *Russula*، *Cortinarius*، *Lactarius* به کار رفت. بر اساس درخت فیلوژنتیکی، جدایه‌های جنس *Russula* با درصد تایید خوشه‌بندی بالا در هر سه مدل بیشینه صرفه‌جویی، بیشینه تشابه و اتصال همسایه در کنار هم قرار گرفت که گونه *Russula brevipes* با *Russula delica* در کنار هم بیشترین تشابه و این دو گونه با گونه *Russula chloroides* بیشترین تشابه درخت فیلوژنی را تشکیل داده‌اند در ارتباط با گونه *Cortinarius rigens* با *Cortinarius trivialis* و *Cortinarius collinitus* بیشترین تشابه وجود داشته است (شکل ۲).



شکل ۲- درخت فیلوژنی آرایه‌های اکتومیکوریز بر اساس ناحیه ژنی ITS
Figure 2. Phylogeny tree of ectomycorrhizal Taxon based on ITS gene region

بحث

در دنیا نزدیک به ۵۷۰۰۰ قارچ شناسایی شده است (He et al., 2022) که ۳۵۰ گونه قارچ خوراکی (Willis, 2018) و تقریبا ۱۰۰۰ گونه قارچ سمی (Mao, 2006) شناخته شده‌اند. در ایران نزدیک به ۸۰۰ گونه قارچ ماکروسکوپی وجود دارد که بیشتر آنها مربوط به قارچ‌های پلی‌پور و آگاریک است (Aghajani et al., 2020). در جدیدترین تحقیقات ایران، Ghobad-Nejhad et al., (2022) به مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۵۸ گونه از قارچ‌های آگاریک ایران پرداختند تا تنوع اکولوژیکی و نقش کاربردی آنها را مشخص کنند. نتایج این پژوهش نشان می دهد که آگاریک‌های ایران شامل ۱۸۹ گونه خوراکی، ۱۲۸ گونه سمی، ۲۵۴ گونه ساپروتروف خاک، ۱۷۲ گونه اکتومیکوریز، ۱۴۶ گونه چوب‌زی، ۱۸ گونه تجزیه کننده لاشبرگ، ۹ گونه انگلی و ۱۹ گونه قارچ‌های درخشان بوده است. ۲۰ درصد از گونه‌های آگاریک ایران دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند که از نظر فیلوژنتیکی در چهار راسته و ۲۱ خانواده آگاریک توزیع شده‌اند. حدود ۵ درصد از گونه‌های آنتی‌اکسیدان را می‌توان آنتی‌اکسیدان‌های قوی در نظر گرفت که بسیاری از آنها خوراکی هستند و می‌توان از

آنها برای تولید غذاهای کاربردی استفاده کرد. شناسایی انواع قارچ‌ها و معرفی آنها به مردم و در نتیجه کاهش مشکلات حاصل از مسمومیت ناشی از خوردن قارچ‌های سمی می‌تواند اولین قدم جهت تشخیص مسمومیت یا خوراکی بودن قارچ‌ها می‌باشد. با توجه به نیاز بشر و استفاده از مواد طبیعی در درمان بیماری‌ها، قارچ‌ها در بوم-سازگان طبیعی می‌توانند منبعی مناسب دارویی برای سلامت انسان‌ها کاربرد فراوانی داشته باشند و تحقیق در زمینه قارچ‌های دارویی در ایران پیشرفت چشمگیری داشته است (Alvandi et al., 2021; Tabibzadeh et al., 2024).

نتایج مولکولی این پژوهش نشان داد که ۱۵ گونه از قارچ‌های آگاریک همزیست اکتومیکوریز شناسایی شدند که از ۵ جنس *Russula*، *Cortinarius*، *Inosperma*، *Lactarius* و *Hebeloma* می‌باشند که جنس‌های *Russula* و *Cortinarius* بیشترین فراوانی را داشته‌اند. همچنین از این ۱۵ گونه ۶ گونه خاصیت خوراکی داشته‌اند و ۲ گونه علاوه بر خاصیت خوراکی بودن، خاصیت دارویی نیز دارند و خاصیت مابقی قارچ‌ها ناشناخته‌اند. Ghobad-Nejhad et al., (2022) به معرفی ۴۳ گونه از جنس *Russula* پرداختند که ۲۸ گونه خاصیت خوراکی و ۱۳ گونه خاصیت غیرخوراکی و ۲ گونه سمی داشته است. در پژوهش Ghobad-Nejhad و همکاران (۲۰۲۲) در ارتباط با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این ریزجانداران خاک‌زی ایران و در سطح وسیعی انجام شده است، ولی پژوهش حاضر مربوط به ریزجانداران خاک ریشه درختان راش در راشستان‌های هیرکانی سنگده مازندران است که در محدوده کوچک‌تری انجام شده است که برخی قارچ‌های شناسایی شده آن مشابه و برخی متفاوت است که با توجه به تفاوت در هر جنس مورد بحث قرار گرفته است.

از پنج گونه قارچ Cortinarius سه گونه ناشناخته، یک گونه سمی شناسایی شده‌اند که در پژوهش Ghobad-Nejhad و همکاران (۲۰۲۲) نیز به معرفی ۲۶ گونه از جنس *Cortinarius* پرداختند که اکثرا ناشناخته و غیرخوراکی بوده است که تاکید بر نتایج این پژوهش دارد. همچنین در این پژوهش از پنج قارچ *Cortinarius* یک گونه قارچ *Cortinarius collinitus* شناسایی شد که علاوه بر خاصیت خوراکی (Wu et al., 2019) خاصیت دارویی (Dai et al., 2009; Huang YaTing et al., 2018) داشته که در تحقیق Huang YaTing et al., (2018) استخراج و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی پلی-ساکاریدها از اندام بارده همین قارچ مورد بررسی قرار گرفته است. Niu و همکاران (۲۰۲۳) پلی‌ساکارید جدیدی از قارچ اکتومیکوریز *Cortinarius purpurascens* شناسایی کردند که نشان‌دهنده اثر دارویی ضد فیبروزی در درمان‌های فیبروبلاست‌های قلبی می‌باشد. قارچ‌های دارویی، قرن‌ها به منظور پیشگیری و درمان انواع بیماری‌ها از جمله هپاتیت، اختلالات ایمونولوژیک، ایدز، سرطان و دیابت در جهان مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه انواع متابولیت‌های دارویی از انواع قارچ‌های دارویی استخراج و به مرحله تولید تجاری رسیده است. در واقع این نوع قارچ-ها شامل منبع عظیمی از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه با خواص ضد تومور و تنظیم کنندگی سیستم ایمنی می‌باشند (Heydarian and Hatamian-Zarami, 2016).

در این پژوهش پنج گونه از قارچ *Russula* شناسایی شده‌اند که چهار گونه شامل *Russula chloroides*، *Russula delica*، *Russula brevipes* خاصیت خوراکی داشته و گونه *Russula delica* علاوه بر خاصیت خوراکی، ارزش دارویی داشته و یک گونه ناشناخته است و نیاز به بررسی‌های شیمی دارو دارد. در تحقیقات مختلف تاکید بر خوراکی بودن هر چهار گونه Wu et al. (2019) و دارویی بودن قارچ *Russula delica* (Yaltirak et al. et al., 2009; Zhao et al., 2010; Giri et al., 2012) دارد. در پژوهش دیگری Ouzouni et al., (2009) به مطالعه ارزش غذایی قارچ-های خوراکی یونان و مقدونیه پرداختند و نتایج آنها نشان داد که قارچ‌های مورد بررسی مانند *Cantharellus*

cibarius، *Russula delica* var *chloroides* منبع خوبی از پروتئین‌ها (۲۷,۵۲ درصد)، کربوهیدرات‌ها (۶۱,۴۵ درصد) و مواد معدنی کاربردی هستند. آنها دارای محتوای چربی کم هستند و آنها را به اجزای ایده آل در چندین رژیم غذایی تبدیل می کند. بنابراین همه این گونه‌های قارچ خوراکی جمع‌آوری‌شده را می‌توان در رژیم‌های غذایی متعادل استفاده کرد و همچنین می‌توان بدون هیچ گونه خطری برای سلامتی مصرف کرد. Kumar et al., (2019) به مطالعه قارچ خوراکی اکتومیکوریز *Russula rosea* پرداختند و نتایج تحقیق نشان داد که این قارچ به‌طور سنتی در طب عامیانه و مردم محلی استفاده می‌شود. Wu et al. (2019) به بررسی قارچ‌های ماکروسکوپی خوراکی، سمی و دارویی پرداختند و نتایج پژوهش نشان داد که ۱۰۲۰ گونه قارچ خوراکی، ۶۹۲ گونه قارچ دارویی و ۴۸۰ گونه قارچ سمی شناسایی شده اند و اثرات و کاربردهای آنها نیز معرفی شد. همچنین Kostić et al., (2020) به مطالعه استخراج آنتی‌اکسیدان و بررسی خواص بیولوژیکی سه گونه از جنس اکتومیکوریز *Russula* (*R. integra*، *R. rosea*، *R. nigricans*) از صربستان پرداخت و ویژگی‌های ترکیبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، آنتی بیوفیلم و سایتوتوکسیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گونه‌های قارچ مورد مطالعه به‌عنوان منابع غنی کربوهیدرات‌ها و ارزش کالری پایین شناسایی شدند. مانیتول فراوان‌ترین قند آزاد و اسیدهای کوئینیک و مالیک عمده‌ترین اسیدهای آلی شناسایی شده بود. بیشترین فعالیت به عصاره اتانولی *R. nigricans* نسبت داده شد. این اولین گزارش در مورد پتانسیل ضد باکتریایی و آنتی بیوفیلمی گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد که امیدوارکننده ترین فعالیت آن در مورد گونه‌های باکتری استرپتوکوکوس مشاهده شده است. امیدوارکننده‌ترین اثر سایتوتوکسیک توسط عصاره متانولی *R. integra* بر روی سلول‌های سرطانی ریه (NCI-H460) ایجاد شد. بنابراین، با توجه به خواص زیست فعالی در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شده، قارچ‌های مورد مطالعه به عنوان منبعی از ترکیبات کاربردی با پتانسیل استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی و دارویی جدید به وجود می‌آیند که می‌تواند در درمان بیماری‌های مختلف و شرایط سلامت مورد استفاده قرار گیرد. در علم پزشکی، دانش بیشتر در مورد سموم قارچ‌های سمی می‌تواند به تولید داروهای جدید برای مشکلات جدی سلامت کمک کند (He et al., 2022). همچنین در این پژوهش سه گونه از جنس *Lactarius* شناسایی شده‌اند که شامل قارچ‌های خوراکی *Lactarius subdulcis*، قارچ دارویی *Lactarius hepaticus* و قارچ سمی *Lactarius chrysorrheus* که در منابع مختلف نتایج قارچ‌های خوراکی *Lactarius subdulcis* (Wu et al., 2019; Gobad-nejhad et al., 2020)، قارچ دارویی *Lactarius hepaticus* (Reis et al., 2011) و قارچ سمی *Lactarius chrysorrheus* (Bau et al., 2014; Wu et al., 2019) تاکید داشته اند. از جنس *Inosperma* یک گونه سمی *Inosperma adaequata* یافت شده که در پژوهش (Farooq et al., 2013) به سمی بودن آن اشاره دارد. با توجه به اینکه نقش این قارچ‌ها در همزیستی دوجانبه به اثبات رسیده، جهت حفظ جوامع، جنگل‌های طبیعی تحت حفاظت بشتری قرار بگیرند (Mirzaei et al., 2023).

نتیجه‌گیری کلی

جنگل‌های هیرکانی شمال ایران یکی از غنی‌ترین بوم‌سازگان‌های جنگلی جهان است که یکی از گونه‌های ارزشمند درختی آن راش شرقی است. همزیستی سودمند دوطرفه بین درختان راش و این ریزموجودات خاک‌زی برقرار است که اندام بارده برخی از این قارچ‌ها ارزش مستقیم غذایی و خوراکی برای انسان دارند. بنابراین بسیاری از قارچ‌های جنگلی می‌توانند پتانسیل استفاده داشته باشند که از آن جمله می‌توان به موارد قارچ‌های آگاریک اکتومیکوریز خوراکی و دارویی در سطح جنگل‌های

هیرکانی نیز اشاره نمود. هدف از معرفی و شناسایی قارچ-های دارویی نیز جهت استفاده از پتانسیل موجود در شرکت-های داروسازی و کاربرد آن در سلامت انسان است. پیشنهاد می‌شود با توجه به پراکنش انواع قارچ‌های دارویی، استخراج انواع متابولیت‌ها از منابع بومی جنگل ایران با استفاده از شرکت‌های دانش‌بنیان مورد توجه قرار بگیرد.

Refrences

1. Agerer, R., 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: Isaac, S. (ed.) *Methods in Microbiology, Vol. 23*. Academic Press, pp. 25-73.
2. Aghajani, H., Farashiani, M.E., Tajick Ghanbary, M.A. and Mosazadeh, S.A., 2020. Diversity of medicinal, edible, and poisonous fungi located on the deadwood of beech and their uses. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 18(1), pp. 79-92. (In Persian). DOI: 10.22092/ijfrpr.2020.127576.1393.
3. Aghajani, H., Hojjati, S.M., Tajick-Ghanbari, M.A., Puormajidian, M.R. and Borhani, A., 2019. Molecular identification of ectomycorrhizal fungal communities associated with oriental beech trees (Fagus orientalis Lipsky) in Hyrcanian forest of Iran. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(1), pp. 25-32. DOI: 10.1007/s40995-017-0435-2.
4. Alikhani, H. and Ghorchiani, M., 2012. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Jahad-e Daneshgahi Press. (In Persian).
5. Alvandi, H., Hatamian-Zarmi, A., Hosseinzadeh, B.E., Mokhtari-Hosseini, Z.B., Langer, E. and Aghajani, H., 2021. Improving the biological properties of Fomes fomentarius MG835861 exopolysaccharide by bioincorporating selenium into its structure. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, p. 100159. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100159.
6. Anonymous, 2010. *Management Plan of District Felord*. Forest, Range and Watershed Management Organization. (In Persian).
7. Bau, T., Bao, H.Y. and Li, Y., 2014. A revised checklist of poisonous mushrooms in China. *Mycosystema*, 33(3), pp. 517-548. (In Chinese).
8. Boa, E.R., 2004. *Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people*. Food and Agriculture Organization (FAO) Press.
9. Cui, L. and Mu, L.Q., 2016. Ectomycorrhizal communities associated with Tilia amurensis trees in natural versus urban forests of Heilongjiang in northeast China. *Journal of Forestry Research*, 27(2), pp. 401-406. DOI: 10.1007/s11676-015-0158-1.
10. Dai, Y.C. and Yang, Z.L., 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27(6), pp. 801-824. (In Chinese).
11. Dai, Y.C., Zhou, L.W., Yang, Z.L., Wen, H.A., Bau, T. and Li, T.H., 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29(1), pp. 1-21. (In Chinese).
12. Farooq, M., Akram, A., Afzal, R. and Nazir, K.S., 2013. Ethno-morphological studies of mushrooms collected from Soon valley. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(5), pp. 5-11.
13. Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), pp. 113-118. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
14. Gardes, M. and Bruns, T.D., 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a Pinus muricata forest: above-and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, 74(10), pp. 1572-1583. DOI: 10.1139/b96-190.
15. Giri, S., Biswas, G., Pradhan, P., Mandal, S.C. and Acharya, K., 2012. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research*, 4(4), pp. 1554-1560.
16. He, M.Q., Wang, M.Q., Chen, Z.H., Deng, W.Q., Li, T.H., Vizzini, A., Jeewon, R., Hyde, K.D. and Zhao, R.L., 2022. Potential benefits and harms: A review of poisonous mushrooms in the world. *Fungal Biology Reviews*, 42, pp. 56-68. DOI: 10.1016/j.fbr.2022.06.002.
17. Heydarian, M. and Hatamian-Zarmi, A., 2016. Molecular identification of Ganoderma lucidum from Iran. *Rostaniha*, 17(2), pp. 188-192. (In

Persian). DOI: 10.22092/botany.2017.109434.

18. Horton, B.M., Glen, M., Davidson, N.J., Ratkowsky, D., Close, D.C., Wardlaw, T.J. and Mohammed, C., 2013. Temperate eucalypt forest decline is linked to altered ectomycorrhizal communities mediated by soil chemistry. *Forest Ecology and Management*, 302, pp. 329-337. DOI: 10.1016/j.foreco.2013.04.006.
19. Hosseini, S.Z., Ismaeili, A., Bazgir, E., Darvishnia, M. and Mahmoodi, G.A., 2010. Identification of medicinal and poisonous mushroom from Khorramabad, Iran. *Yafte*, 11(5), pp. 75-83. (In Persian).
20. Huang, J., Nara, K., Zong, K., Wang, J., Xue, S., Peng, K., Shen, Z. and Lian, C., 2014. Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (Pinus massoniana) and white oak (Quercus fabri) in a manganese mining region in Hunan Province, China. *Fungal Ecology*, 9, pp. 1-10. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.01.001.
21. Huang, Y.T., Zou, F., Sun, Q., Ye, D.W., Wang, K. and Liu, C.L., 2018. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from Cortinarius collinitus fruiting bodies. *Acta Edulis Fungi*, 25(2), pp. 72-78. DOI: 10.16488/j.cnki.1005-9873.2018.02.010.
22. Ishida, T.A., Nara, K. and Hogetsu, T., 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytologist*, 174(2), pp. 430-440. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02016.x.
23. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A. and Faridian, L., 2025. Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: mechanisms, challenges, and future directions. *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 279-313. DOI: 10.22092/sbj.2025.368425.277.
24. Kostić, M., Ivanov, M., Fernandes, Â., Pinela, J., Calhelha, R.C., Glamočlija, J., Barros, L., Ferreira, I.C., Soković, M. and Ćirić, A., 2020. Antioxidant extracts of three Russula genus species express diverse biological activity. *Molecules*, 25(18), p. 4336. DOI: 10.330/molecules25184336.
25. Kumar, V., Kerketta, A. and Rajhansa, K.C., 2019. Diversity of wild edible mushrooms in Korea district of Chhattisgarh. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), pp. 2389-2392.
26. Mao, X.L., 2006. Poisonous mushrooms and their toxins in China. *Mycosystema*, 25(3), pp. 345-363.
27. Mirzaei, J., Jaafarian, N., Jafari, M. and Hoseinzadeh, J., 2023. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Natural and Agricultural Land and their relationship with soil properties in Zagros Forest. *Journal of Soil Biology*, 11(1), pp. 47-62. DOI: 10.22092/sbj.2023.361383.246.
28. Mishra, A. and Shankar, S., 2025. Edible mushrooms for improved human health, food security and environmental sustainability: A critical review. *Science of The Total Environment*, 995, p. 180093. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2025.180093.
29. Nadian Ghomsheh, H., 2025. Phosphorus uptake and transport mechanism in symbiotic plants with arbuscular mycorrhizal fungi (Knowns and unknowns). *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 155-190. DOI: 10.22092/sbj.2024.366288.267.
30. Niu, P., Tan, X., Zhou, X., Xu, X., Zhang, G., Peng, L. and Bai, M., 2023. Novel polysaccharide identified from Cortinarius purpurascens demonstrated anti-fibrosis effects in cardiac fibroblasts. *Food Bioscience*, 56, p. 103157. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103157.
31. Ouzouni, P.K., Petridis, D., Koller, W.D. and Riganakos, K.A., 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115(4), pp. 1575-1580. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.014.
32. Peterson, R.L., Massicotte, H.B. and Melville, L.H., 2004. *Mycorrhizas:*

Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press.

33. Reis, F.S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A. and Ferreira, I.C., 2011. Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16(6), pp. 4328-4338. DOI: 10.3390/molecules16064328.
34. Sakakibara, S.M., Jones, M.D., Gillespie, M., Hagerman, S.M., Forrest, M.E., Simard, S.W. and Durall, D.M., 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research*, 106(8), pp. 868-878. DOI: 10.1017/S0953756202006263.
35. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), pp. 6241-6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.
36. Siddiqui, Z.A. and Pichtel, J., 2008. Mycorrhizae: an overview. In: Siddiqui, Z.A. and Pichtel, J. (eds.) *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer, pp. 1-35. DOI: 10.1007/978-1-4020-8770-7_1.
37. Smith, J., Rowan, N. and Sullivan, R., 2002. *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. Cancer Research UK.
38. Smith, J.E., Molina, R., Huso, M.M., Luoma, D.L., McKay, D., Castellano, M.A., Lebel, T. and Valachovic, Y., 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Canadian Journal of Botany*, 80(2), pp. 186-204. DOI: 10.1139/b02-003.
39. Straatsma, G., François, A. and Simon, E., 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycological Research*, 105(5), pp. 515-523. DOI: 10.1017/S0953756201004154.
40. Tabibzadeh, F., Alvandi, H., Hatamian-Zarmi, A., Kalitukha, L., Aghajani, H. and Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., 2024. Antioxidant activity and cytotoxicity of exopolysaccharide from mushroom Hericium coralloides in submerged fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(21), pp. 26953-26963. DOI: 10.1007/s13399-022-03386-0.
41. Varghese, R., Dalvi, Y.B., Lamrood, P.Y., Shinde, B.P. and Nair, C.K.K., 2019. Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: an overview. *3 Biotech*, 9(10), p. 362. DOI: 10.1007/s13205-019-1886-2.
42. White, T.J., 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, pp. 315-322.
43. Willis, K.J. (ed.), 2018. *State of the World's Fungi 2018*. Royal Botanic Gardens, Kew.
44. Wu, F., Zhou, L.W., Yang, Z.L., Bau, T., Li, T.H. and Dai, Y.C., 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98(1), pp. 1-76. DOI: 10.1007/s13225-019-00432-7.
45. Yaltirak, T., Aslim, B., Ozturk, S. and Alli, H., 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), pp. 2052-2056. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.029.
46. Zamani, S.M., 2014. *Identification of ectomycorrhizal fungi associated with Oak trees in some forests of Iran and investigation of metabolic and transcriptional profiles in Quercus castaneifolia ectmycorrhizal roots*. PhD Thesis. Tarbiat Modares University. (In Persian).
47. Zhao, S., Zhao, Y., Li, S., Zhao, J., Zhang, G., Wang, H. and Ng, T.B., 2010. A novel lectin with highly potent antiproliferative and HIV-1 reverse

transcriptase inhibitory activities from the edible wild mushroom Russula delica. *Glycoconjugate Journal*, 27(2), pp. 259-265. DOI: 10.1007/s10719-009-9274-5.

48. Zhou, Z., Miwa, M., Matsuda, Y. and Hogetsu, T., 2001. Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of Suillus grevillei genets. *Journal of Plant Research*, 114(2), pp. 179-185. DOI: 10.1007/PL00013981 .

107-125/Journal of Soil Biology Vol. 13, No. 1, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains

Reza Mohammadikia[1]*,Alireza Fallah Nosratabad[2],and Bahman Khoshrou[3]

1-Researcher, Department of On-Farm Water Management Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Email: swrirm@yahoo.com
2-Professor, Department of Biology and Biotechnology Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Email: a.r.fallah1350@gmail.com
3-Postdoctoral Researcher, Department of Biology and Biotechnology Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Email: bahmankhoshru@yahoo.com

Article Info

Received: 2025-07-16

Accepted: 2025-09-09

Keywords:
Microbial Remediation, Soil Moisture, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Oil Pollution, Biodegradation

Corresponding author's email:
swrirm@yahoo.com

DOI:
10.22092/SBJ.2025.370068.282

Extended Abstract

Background and Objectives: Soil contamination by petroleum hydrocarbons, particularly Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), due to industrial activities, poses significant environmental and health risks. PAHs are persistent, toxic organic compounds, and their presence in soil alters its physicochemical and biological properties, threatening ecosystem health and food security. Bioremediation, utilizing microorganisms to degrade pollutants, offers an eco-friendly and cost-effective solution. The efficacy of bacterial degradation of PAHs is, however, critically influenced by environmental factors, especially soil moisture, which affects microbial activity, nutrient and oxygen availability, and pollutant accessibility. While optimal moisture is known to enhance degradation, a comprehensive understanding of the interactive effects of specific bacterial strains and varying moisture levels on PAH bioremediation remains incomplete. This study aimed to address this gap by investigating the effects of different soil moisture levels and three selected bacterial strains on PAH bioremediation in a contaminated loamy-clay soil under laboratory conditions. The main hypothesis was that both bacterial strain type and soil moisture level, along with their interaction, would significantly impact PAH degradation efficiency.

Materials and Methods: A factorial pot experiment based on a Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replicates was conducted. Treatments included four bacterial applications (three individual strains: *Pseudomonas alcaligenes* (B1), *Pseudomonas stutzeri* (B2), *Enterobacter cloacae* (B3); and an uninoculated control (B0)) and four soil moisture levels. Surface soil (0–30 cm) from an oil-contaminated site near Tehran refinery was sieved, characterized (loamy-clay), and autoclaved at 121°C for 60 minutes. Bacterial strains were cultured in Nutrient Broth, harvested, washed, and resuspended to an OD600 of 0.7 (approx. 1.5–2.8 × 10□ CFU/mL). Thirty mL of inoculum (or sterile water for control) were added to each pot. The four moisture levels were: I1 (30% depletion of available water, AWC), I2 (50% AWC depletion), I3 (70% AWC depletion), and I4 (90% AWC depletion), maintained daily by weighing. Pots were kept at 25 ± 2°C. After a 20-

day bacterial stabilization period, the moisture levels were imposed for 65 days. Bacterial populations were enumerated (CFU/g dry soil) on Nutrient Agar. Concentrations of 14 target PAHs were determined by HPLC (Agilent 1260, fluorescence detector, C18 column) following USEPA method 8310 after Soxhlet extraction (hexane/acetone 1:1) and silica/alumina column cleanup. Data were analyzed by two-way ANOVA, and means were compared by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$) using SAS and SPSS software.

Results: The initial concentration of total PAHs in the soil was 33.4 mg/kg, classifying it as highly contaminated. Fluoranthene was the dominant compound among the 14 PAHs analyzed. Total bacterial populations did not show significant changes across treatments throughout the experiment. However, the performance of the inoculated strains in reducing PAH concentrations was notable; treatments with *P. alcaligenes* (B1) and *E. cloacae* (B3) achieved total PAH reductions of 45.65% and 50.57%, respectively, although these differences were not statistically significant ($P>0.05$). In contrast, soil moisture had a statistically significant effect ($P<0.05$), with the highest PAH reduction (56.8%) observed in the optimal moisture treatment (I1). Analysis of individual compounds revealed that lighter PAHs, such as phenanthrene and fluorene, were more biodegradable. Conversely, the concentrations of heavier and more complex compounds like benzo(a)pyrene increased in some treatments, likely due to the incomplete degradation of larger molecules.

Conclusion: The present study demonstrated that soil moisture is the main determining factor in enhancing the biodegradation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), with the greatest reduction of contaminants observed at moisture levels close to field capacity. Optimal moisture improves soil aeration, increases contaminant mobility, and provides a suitable environment for microbial activity, thereby facilitating effective degradation of pollutants. Regarding bacterial strains, Enterobacter cloacae and Pseudomonas alcaligenes exhibited a high potential in reducing PAH concentrations, highlighting the importance of functional capacity and adaptability of microorganisms rather than merely their population size. However, the observed increase in the concentration of certain toxic compounds in some treatments raises the possibility of incomplete degradation and the formation of hazardous intermediates. Overall, successful microbial remediation of petroleum-contaminated soils requires simultaneous consideration of optimal moisture, effective microbial strain selection, and precise monitoring of contaminant behavior. Future studies should employ more specific indicators such as catabolic genes and bioavailability assays, and also take into account the impact of soil sterilization on contaminant structure and bioavailability. It should be noted that although soil autoclaving in this study was necessary to accurately assess the performance of inoculated strains, it may have influenced the initial bioavailability of PAHs.

Cite this article:Mohammadikia, R., Fallah Nosaratabad, A., Khoshrou,B.,2025. The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains. Soil Biology, 13 (1),107-125.

DOI: 10.22092/SBJ.2025.370068.282
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) توسط سویه‌های باکتریایی

رضا محمدی‌کیا*[1]، علیرضا فلاح نصرت‌آباد[2] و بهمن خوشرو[3]

محقق بخش تحقیقات مدیریت آب در مزرعه، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. swrirm@yahoo.com

استاد، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. a.r.fallah1350@gmail.com

محقق پسادکترا، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. bahmankhoshru@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۴/۴/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۸

چکیده

آلودگی خاک با هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) به‌دلیل پایداری بالا، سمیت زیاد و تجمع زیستی، یکی از چالش‌های زیست‌محیطی مهم به‌شمار می‌رود. پالایش میکروبی با بهره‌گیری از ریزجانداران تجزیه‌کننده، روشی مؤثر و پایدار برای کاهش این آلاینده‌ها محسوب می‌شود. در این پژوهش، تأثیر سطوح مختلف رطوبت خاک با چهار سطح از تخلیه آب آبیاری به مقدار ٪۳۰، ٪۵۰، ٪۷۰ و ٪۹۰ آب قابل استفاده و سه سویه باکتریایی منتخب (*Pseudomonas alcaligenes*، *Pseudomonas stutzeri* و *Enterobacter cloacae*) بر کارایی تخریب زیستی PAHs در یک خاک لوم‌رسی آلوده به مواد نفتی، در شرایط آزمایشگاهی و در قالب طرح فاکتوریل با پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که رطوبت خاک اثر معناداری بر کاهش غلظت کل PAHs داشت ($P<0.05$) و بیشترین کاهش غلظت (٪۵۶/۸) در رطوبت نزدیک به ظرفیت زراعی مشاهده شد. اگرچه اثر آماری سویه‌های باکتری بر کاهش غلظت کل PAHs در سطح پنج درصد معنی‌دار نشد، اما کاهش‌های مشاهده‌شده (۴۵ تا ۵۱ درصد) از نظر زیستی و کاربردی قابل توجه بوده و نشان‌دهنده پتانسیل این سویه‌ها است. یافته‌ها بر اهمیت بهینه‌سازی هم‌زمان شرایط محیطی و انتخاب سویه‌های میکروبی مناسب در افزایش اثربخشی پالایش میکروبی تأکید دارند.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری‌های تجزیه کننده PAHs، پالایش میکروبی، ریزجانداران تجزیه‌کننده.

استناد: محمدی‌کیا، ر.، فلاح نصرت آباد، ع.، خوشرو، ب.، ۱۴۰۴. تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) توسط سویه‌های باکتریایی. مقاله پژوهشی، نشریه زیست شناسی خاک ، (۱)۱۳، ۱۲۵-۱۰۷.

مقدمه

فعالیت‌های روزافزون صنعتی، توسعه صنایع پتروشیمی، گسترش حمل‌ونقل و استخراج گسترده نفت و گاز، منجر به ورود مقادیر قابل توجهی از آلاینده‌های نفتی به محیط‌زیست، به‌ویژه خاک، شده است. در این میان، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs[۱])، به‌عنوان گروهی از ترکیبات آلی سمی و پایدار، به دلیل خطرات بالقوه‌شان اهمیت ویژه‌ای یافته‌اند. این ترکیبات، که عمدتاً حاصل احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی و فرآیندهای صنعتی هستند، از دو یا چند حلقه بنزنی متصل به هم تشکیل شده‌اند. ویژگی‌هایی نظیر پایداری شیمیایی بالا، فشار بخار پایین و انحلال‌پذیری ناچیز در آب، موجب ماندگاری طولانی‌مدت آن‌ها در خاک و آب می‌شود (Chen et al., 2023; US EPA, 2017). علاوه بر این، مطالعات سم‌شناسی نشان داده‌اند که بسیاری از PAHs دارای اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و اختلال در عملکرد سیستم غدد درون‌ریز هستند و می‌توانند در زنجیره‌های غذایی تجمع یابند. از این‌رو، آلودگی خاک با این ترکیبات نه‌تنها مخاطره‌ای جدی برای محیط زیست، بلکه تهدیدی برای سلامت عمومی و امنیت غذایی نیز محسوب می‌شود (Zeynali et al.,2024).

ورود ترکیبات نفتی به خاک، پیامدهای عمیقی بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن بر جای می‌گذارد. Ali و همکاران (2023) در یک بررسی جامع نشان دادند که آلودگی به هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند منجر به تخریب ساختار خاک، انسداد خلل و فرج، کاهش ظرفیت نگهداری آب و محدودیت در نفوذ آب و تبادل گازی شود. این تغییرات فیزیکی، به‌ویژه با ایجاد پدیده آب‌گریزی، در نهایت به کاهش فعالیت‌های زیستی در ناحیه ریشه‌گاه (ریزوسفر) منجر می‌شود.(Zeynali et al., 2025) از نظر شیمیایی، مطالعات جدید همچنان تأیید می‌کنند که آلودگی نفتی قادر است pH خاک را تغییر داده، فراهمی عناصر غذایی ضروری نظیر نیتروژن و فسفر را کاهش دهد و حتی منجر به افزایش غلظت ترکیبات سمی در خاک گردد (Ali et al., 2023). علاوه بر این، همانطور که Nkwe و همکاران (2024) نیز به‌تفصیل بررسی کرده‌اند، تنوع و جمعیت ریزجانداران سودمند خاک و همچنین فعالیت آنزیم‌های کلیدی خاک به شدت تحت تأثیر این آلاینده‌ها قرار می‌گیرد که این امر می‌تواند فروپاشی چرخه‌های زیست‌شیمیایی ضروری خاک را در پی داشته باشد (Moradi et al., 2024). Sharma و همکاران (2023) نیز اشاره می‌کنند که چنین شرایط نامساعدی، به‌ویژه در مناطق کشاورزی یا اراضی مجاور تأسیسات نفتی، به‌طور مستقیم عملکرد اکولوژیکی و حاصل‌خیزی خاک را تهدید کرده و رشد و سلامت گیاهان را با محدودیت جدی مواجه می‌سازد. این مجموعه اثرات نامطلوب، ضرورت توسعه و به‌کارگیری روش‌های پاکسازی مؤثر و پایدار برای خاک‌های آلوده را دوچندان می‌کند.

در میان روش‌های موجود برای مقابله با آلودگی نفتی خاک، پالایش میکروبی [۲] به‌عنوان راهکاری طبیعت محور، سازگار با محیط زیست، مقرون‌به‌صرفه و مؤثر، مورد توجه گسترده قرار گرفته است؛ Sharma و همکاران (2023) نیز بر اهمیت و چشم‌انداز مثبت این رویکردها تاکید دارند. این فناوری بر توانایی ذاتی ریزجانداران در استفاده از آلاینده‌های آلی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استوار است. باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی برخی گیاهان قادرند از طریق سامانه‌های آنزیمی اختصاصی خود، ساختارهای پیچیده PAHs را شکسته و آن‌ها را به ترکیبات ساده‌تر، با سمیت کمتر یا کاملاً بی‌خطر تبدیل کنند (Akinpelu et al., 2024). در این میان، باکتری‌های بومی که با شرایط ویژه خاک آلوده سازگار شده‌اند، نقش کلیدی در تسریع فرآیند تخریب زیستی آلاینده‌ها ایفا می‌کنند. پژوهش‌های جدیدتر همچنان بر کارایی ریزجانداران تاکید دارند؛ برای

[۱] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

[۲] Bioremediation

مثال، Singh و Fulekar (2024) در بررسی پیشرفت‌های اخیر، به تفصیل نقش جنس‌های مختلف باکتریایی از جمله *Pseudomonas*، *Bacillus* و سایرین را در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و مسیرهای آنزیمی آن‌ها (شامل مونواکسیژنازها و دی‌اکسیژنازها) تشریح کرده‌اند. پالایش میکروبی همچنین می‌تواند در تلفیق با سایر روش‌های اصلاحی مانند تثبیت شیمیایی، شست‌وشوی خاک یا گیاه‌پالایی، عملکرد بهتری از خود نشان دهد، موضوعی که Kumar و همکاران (2023) در بررسی فناوری‌های ترکیبی پالایش میکروبی به آن پرداخته‌اند.

موفقیت فرآیند پالایش میکروبی به عوامل محیطی متعددی وابسته است که از میان آن‌ها، رطوبت خاک یکی از پارامترهای بحرانی و تعیین‌کننده به‌شمار می‌رود. Wangو همکاران (2024) در بررسی خود بر تنظیم رطوبت خاک در پالایش میکروبی، تاکید می‌کنند که ریزجانداران تجزیه‌کننده برای فعالیت‌های زیستی خود، از جمله جذب مؤثر مواد مغذی و اکسیژن و پیشبرد فرآیندهای متابولیکی، به مقدار مشخصی آب نیاز دارند. کاهش بیش‌ازحد رطوبت، منجر به غیرفعال شدن یا حتی مرگ سلول‌های باکتریایی و کاهش شدید فعالیت آنزیمی آن‌ها می‌شود. در مقابل، افزایش بیش‌ازحد رطوبت و اشباع شدن خاک، با محدود کردن تبادل گاز و ایجاد شرایط بی‌هوازی، توان تجزیه هوازی بسیاری از ترکیبات نفتی را به‌شدت کاهش می‌دهد(Wang et al., 2024) . Li و همکاران (2023) نیز در مرور عوامل کلیدی مؤثر بر پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، بیان می‌کنند که رطوبت بهینه برای این فرآیند معمولاً در بازه ۵۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک (ظرفیت مزرعه) قرار دارد. این دامنه رطوبتی، دسترسی مناسب به اکسیژن و مواد غذایی و تحرک میکروبی مطلوب را فراهم آورده و به افزایش بازدهی فرآیند پالایش میکروبی کمک می‌کند. بنابراین، کنترل دقیق و مدیریت رطوبت در عملیات پالایش میکروبی، به‌ویژه در شرایط مزرعه‌ای، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که شرایط خاک (شوری، قلیائیت و بافت) تأثیر چشمگیری بر موفقیت پالایش میکروبی دارد. به‌عنوان نمونه، Hashemi و همکاران (2025) گزارش کردند که در خاک‌های شور–سدیمی آهکی، استفاده از کنسرسیوم هالوفیل موجب تجزیه سریع فنانترن شد. همچنین Zeynali و همکاران (2024) نشان دادند که گونه‌های *Bacillus* می‌توانند به‌طور مؤثر در کاهش آلودگی‌های نفتی نقش‌آفرینی کنند.

با وجود پیشرفت‌های اخیر، مطالعات اندکی به بررسی هم‌زمان اثر رطوبت و سویه‌های باکتری بر تخریب طیف وسیعی از PAHs، به‌ویژه در خاک‌های لوم‌رسی آلوده پرداخته‌اند. علاوه‌براین، در مواردی ممکن است اثر آماری سویه‌های میکروبی معنی‌دار نباشد ولی کاهش‌های قابل توجهی از نظر زیستی مشاهده شود که می‌تواند برای کاربرد عملی مهم باشد (Haritash & Kaushik, 2009; Viñas et al., 2005).

بنابراین، شکاف تحقیقاتی موجود در زمینه درک اثرات متقابل این عوامل کلیدی، به‌ویژه در مورد کارایی سویه‌های باکتریایی کمتر شناخته‌شده در شرایط رطوبتی متفاوت، همچنان احساس می‌شود.

بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف اصلی بررسی تأثیر رژیم‌های مختلف رطوبتی خاک و سه سویه باکتریایی منتخب بر کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در یک خاک لوم‌رسی آلوده و در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی طراحی و اجرا گردید. فرضیه اصلی این بود که هم نوع سویه باکتریایی و هم سطح رطوبت خاک و همچنین اثر متقابل آن‌ها، کارایی تجزیه PAHs را تحت تأثیر قرار خواهند داد. وجه تمایز این پژوهش، بررسی هم‌زمان چندین سطح رطوبتی و مقایسه کارایی سه سویه باکتری (که یکی از آن‌ها، *Enterobacter cloacae*، کمتر در مطالعات مشابه پالایش میکروبی PAHs مورد توجه قرار گرفته) در تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات PAHs و همچنین ارزیابی تغییرات جمعیت باکتریایی در این شرایط است. انتظار می‌رود

یافته‌های این مطالعه، اطلاعات کاربردی و سودمندی برای انتخاب شرایط بهینه و سویه‌های میکروبی مناسب در طراحی و اجرای پروژه‌های احیای خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با هدف بررسی اثر متقابل رژیم‌های مختلف رطوبتی خاک و سویه‌های باکتری بر کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)، در شرایط کنترل‌شده گلدانی (گلخانه‌ای) و بدون حضور گیاه طراحی و اجرا شد. آزمایش در قالب طرح فاکتوریل و در پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با چهار سطح باکتری (شامل سه سویه باکتری تجزیه‌کننده و یک تیمار شاهد بدون تلقیح) و چهار سطح رژیم رطوبتی، در سه تکرار انجام گرفت.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

نمونه‌برداری از خاک سطحی (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) از نواحی اطراف پالایشگاه تهران (ایران)، که دارای سابقه آلودگی با نفت خام بودند، صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، به آزمایشگاه منتقل شده و با دقت، مخلوط و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند تا یکنواخت و همگن گردند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اولیه خاک شامل بافت، pH (با استفاده از pHمتر در نسبت خاک به آب ۲:۱/۵)، هدایت الکتریکی (EC) (با استفاده از ECمتر در عصاره اشباع)، درصد مواد آلی (با استفاده از روش Walkley-Black)، ظرفیت نگهداری آب (FC[۳]) و نقطه پژمردگی دائم (PWP[۴]) (به روش صفحه‌فشاری) تعیین گردید (Page et al., 1982; Sparks et al., 1996; Dane and Topp, 2002). به‌منظور کاهش جمعیت میکروبی بومی و جلوگیری از تداخل با سویه‌های تلقیح‌شده، خاک‌های مورد استفاده به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. سپس، خاک‌ها به حجم مناسب (یک کیلوگرم خاک خشک) در گلدان‌های پلاستیکی با زهکشی مناسب (مجهز به سوراخ‌های زهکش در کف) ریخته شدند.

منبع، شناسایی و غربالگری سویه‌های باکتریایی

سه سویه باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش، جدایه‌های بومی[۵] هستند که طی یک مطالعه جامع از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان بوشهر ایران جداسازی و شناسایی شدند (Ebrahimi, 2010). شناسایی نهایی این سویه‌ها به روش مولکولی (توالی‌یابی ژن 16S rRNA) انجام شده است. لازم به توضیح است که اگرچه توالی ژن این جدایه‌ها برای تأیید هویت در پایگاه داده NCBI جستجو (BLAST) گردید، اما این توالی‌ها در پایگاه مذکور ثبت نشده و در نتیجه فاقد کد دسترسی رسمی می‌باشند؛ از این رو، در این پژوهش با کدهای داخلی PDB15 (*Pseudomonas alcaligenes*)، PDB16 (*Enterobacter cloacae*) و PDB18 (*Pseudomonas stutzeri*) به آن‌ها ارجاع داده می‌شود. انتخاب این سویه‌ها بر اساس یک فرآیند غربالگری دو مرحله‌ای صورت گرفت؛ در مرحله اول (غنی‌سازی)، توانایی رشد آن‌ها در محیط کشت حداقل مایع (CFMM) با گازوئیل (۲٪) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی تأیید شد و در مرحله دوم (غربالگری تکمیلی)، عملکرد آن‌ها بر روی محیط کشت حداقل جامد حاوی ترکیبات آروماتیک اختصاصی شامل فنانترن (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تولوئن (۱٪) ارزیابی گردید. ویژگی‌های کلیدی این سه سویه در جدول ۱ خلاصه شده است.

---

[۳] Field Capacity

[۴] Permanent Wilting Point

[۵] Indigenous

جدول ۱- ویژگی‌های کلیدی سه سویه باکتریایی منتخب مورد استفاده در پژوهش (Ebrahimi, 2010)

کد سویه	شناسایی نهایی	شکل باکتری	رنگ‌آمیزی گرم	تست اسپور	تست کاتالاز	تست اکسیداز	رشد روی فنانترن	رشد روی تولوئن
PDB15	*Pseudomonas alcaligenes*	کوکوباسیل	منفی	منفی	مثبت	مثبت	رشد نکرده	متوسط
PDB16	*Enterobacter cloacae*	باسیل	منفی	منفی	مثبت	منفی	ضعیف	رشد نکرده
PDB18	*Pseudomonas stutzeri*	باسیل	منفی	منفی	مثبت	مثبت	خوب	متوسط

آماده‌سازی تلقیح

سویه‌ها در محیط کشت NB[۶] کشت داده شدند. کشت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ دور در دقیقه (rpm) در شیکر انکوباتور نگهداری شدند تا به فاز لگاریتمی رشد خود برسند. پس از کشت، سوسپانسیون باکتری با سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری شده و سلول‌ها با محلول استریل نمکی (۰/۸۵٪ NaCl) شست‌وشو داده شدند تا محیط کشت اولیه جایگزین گردد. در نهایت، غلظت هر سویه با تنظیم چگالی نوری (OD[۷]) در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) به حدود ۰/۷ رسانده شد، که معادل تقریبی $۱/۵\times۱۰^{۹}$ تا $۲/۸\times۱۰^{۹}$ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/mL) بود. سپس، ۳۰ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتری به گلدان‌های مربوطه تلقیح گردید. در تیمار شاهد (B0)، به‌جای سوسپانسیون باکتری، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

تیمارهای آبیاری

چهار سطح مدیریت آبیاری برای بررسی تأثیر رطوبت بر تخریب زیستی PAHs در نظر گرفته شد:

I1: تخلیه ۳۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۰/۸ بار)

I2: تخلیه ۵۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۱/۵ بار)

I3: تخلیه ۷۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۲/۵ بار)

I4: تخلیه ۹۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۸ بار)

برای اعمال دقیق رژیم‌های رطوبتی، ابتدا وزن خاک خشک در هر گلدان تعیین شد. سپس، بر اساس ظرفیت نگهداری آب در مزرعه (FC) و نقطه پژمردگی دائم (PWP) خاک، میزان آب قابل استفاده (AWC[۸]) محاسبه گردید (FC−PWP=AWC). رطوبت هر گلدان به‌صورت روزانه با توزین دقیق پایش شده و هر روز آب مقطر استریل به میزان تبخیر شده یا مصرف شده اضافه می‌شد تا وزن و در نتیجه رطوبت خاک در سطح هدف هر تیمار ثابت بماند. گلدان‌ها در یک اتاق رشد با دمای کنترل‌شده ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۶۰٪ نگهداری شدند.

دوره تیمار و نمونه‌برداری

پس از تلقیح باکتری‌ها، یک دوره تثبیت ۲۰ روزه برای استقرار و سازگاری باکتری‌ها در خاک در نظر گرفته شد. طی این دوره، رطوبت تمام گلدان‌ها در سطح بهینه (۶۰٪AWC) حفظ شد و هر سه روز یک‌بار، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل برای اطمینان از رطوبت کافی اضافه گردید. پس از این دوره، گلدان‌ها وارد مرحله اصلی اعمال رژیم‌های رطوبتی شده و به‌مدت ۶۵ روز تحت شرایط آزمایشی قرار گرفتند. نمونه‌برداری دوره‌ای از خاک هر گلدان، در روزهای ۳۲، ۴۵ و ۶۷ پس از آغاز اعمال

[۶] Nutrient Broth
[۷] Optical Density
[۸] Available Water Content

رژیم‌های رطوبتی صورت گرفت. در هر مرحله نمونه‌برداری، از هر تیمار، یک گلدان به طور کامل برای آنالیزهای نهایی برداشت و حذف شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و برای تجزیه‌های میکروبی و شیمیایی در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد (تا زمان تجزیه) نگهداری گردیدند.

تجزیه‌های میکروبی و شیمیایی

الف) اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌ها

جمعیت باکتری کل در خاک هر گلدان با استفاده از روش سریال رقت‌ها[۹] و شمارش کلونی (CFU/g خاک) بر روی محیط کشت (NA[۱۰]) اندازه‌گیری شد (Alef and Nannipieri, 1995). برای این منظور، ۱۰ گرم از نمونه خاک برداشته و در ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل (۰/۸۵٪ NaCl) رقیق شد. سپس، رقت‌های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های پایانی (که منجر به شمارش ۳۰ تا ۳۰۰ کلونی در پلیت شود) روی پلیت‌های NA کشت داده شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، تعداد کلونی‌ها شمارش و بر حسب CFU/g خاک خشک گزارش گردید.

ب) استخراج و تجزیه PAHs

غلظت ترکیبات PAHs شامل ۱۵ ترکیب هدف (Naphthalene، Acenaphthene، Fluorene، Phenanthrene، Anthracene، Fluoranthene، Pyrene، Benzo(a)Anthracene، Chrysene، Benzo(b)Fluoranthene، Benzo(k)Fluoranthene، Benzo(a)Pyrene، Dibenzo(a, h)Anthracene و Benzo(ghi) Perylene) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC[۱۱]) و مطابق با پروتکل استاندارد USEPA 8310 تعیین گردید (U.S. EPA, 1996). ابتدا، ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک شده از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس، PAHs با استفاده از روش استخراج سوکسله[۱۲] با ۲۵۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال‌های هگزان/استون (۱:۱ v/v) به مدت ۱۲ ساعت استخراج شدند. پس از استخراج، عصاره‌های حاصل برای حذف مواد مزاحم از طریق ستون‌های پاکسازی سیلیکاژل/آلومینا پاکسازی شدند. ستون‌ها با پنج گرم سیلیکاژل (فعال شده در ۱۸۰ °C به مدت ۱۲ ساعت) در پایین و پنج گرم آلومینا (خنثی، فعال شده در ۱۸۰° C به مدت ۱۲ ساعت) در بالا پر شدند. سپس، عصاره از ستون عبور داده شده و با ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال هگزان/استون (۹:۱ v/v) شست‌وشو داده شد. در نهایت، عصاره‌های پاکسازی‌شده توسط یک تبخیرکن چرخان[۱۳] تا حجم یک میلی‌لیتر تغلیظ شدند. آنالیز نهایی با دستگاه HPLC (Agilent 1260 Infinity II HPLC System) مجهز به شناساگر فلورسانس[۱۴] انجام شد. ستون C18[۱۵] با ابعاد ۲۵۰ میلی‌متر طول و ۴/۶ میلی‌متر قطر داخلی و اندازه ذرات ۵ میکرومتر و فاز متحرک شامل گرادیانت متانول و آب با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود. شناسایی PAHs بر اساس زمان بازداری[۱۶] و کمی‌سازی آن‌ها با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد PAHs با غلظت‌های مشخص انجام شد.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS (نسخه ۹/۴) و SPSS (نسخه ۲۶) تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی اثرات اصلی

---

[۹] Serial dilution technique
[۱۰] Nutrient Agar
[۱۱] High-performance liquid chromatography
[۱۲] Soxhlet extraction
[۱۳] Rotary Evaporator
[۱۴] Fluorescence Detector
[۱۵] 250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size
[۱۶] Retention Time

باکتری‌ها و رژیم‌های رطوبتی و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر میزان تخریب PAHs، از تجزیه و تحلیل واریانس دوعاملی[۱۷] استفاده گردید. به‌منظور نمایش تغییرات درصد غلظت ترکیبات PAHs در تیمارهای مختلف باکتریایی، از نقشه حرارتی (Heatmap) استفاده شد. در این نمودار، ترکیبات مختلف PAHs در محور عمودی و سویه‌های باکتریایی و رژیم‌های رطوبتی در محور افقی قرار گرفتند. رنگ‌ها بیانگر میزان تغییر غلظت بودند؛ به‌طوری که رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت، و رنگ‌های خاکستری بیانگر کاهش غلظت ترکیبات نسبت به نمونه شاهد بودند. شدت رنگ متناسب با مقدار تغییر (کاهش یا افزایش) تنظیم شد. این نوع نمایش داده‌ها امکان مقایسه سریع و بصری تأثیر تیمارهای مختلف بر ترکیبات PAHs را فراهم می‌سازد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معناداری پنج درصد انجام گرفت و نمودارهای مقاله با استفاده از کتابخانه Seaborn در زبان برنامه‌نویسی پایتون رسم گردید.

نتایج و بحث

مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایشی

جدول ۲ مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این مطالعه را نمایش می‌دهد. نمونه خاک با بافت لوم‌رسی و ظرفیت بالای نگهداری آب، از عمق ۳۰–۰ سانتی‌متری اراضی اطراف پالایشگاه تهران برداشت شد. این خاک به دلیل بافت مناسب خود (۳۳٪ شن، ۳۵٪ سیلت و ۳۲٪ رس) و ظرفیت نگهداری آب قابل قبول (ظرفیت زراعی ۲۳٪ وزنی و نقطه پژمردگی دائم ۱۲٪ وزنی)، بستر مناسبی برای مطالعه فرآیندهای پالایش میکروبی و رشد ریزجانداران فراهم می‌آورد. همچنین، میزان کربنات کلسیم معادل ۱۳/۴٪، هدایت الکتریکی عصاره اشباع ۷/۴ دسی‌زیمنس بر متر و آلودگی نفتی با غلظت کل ۳۳/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دیگر ویژگی‌های مهم این خاک است که بر فعالیت میکروبی و حرکت آلاینده‌ها تأثیرگذار بود.

جدول ۲- برخی خصوصیات خاک محل آزمایش

منطقه	بافت	درصد شن	درصد سیلت	درصد رس	PWP (%)	FC (%)	کربنات کلسیم معادل (٪)	هدایت الکتریکی عصاره اشباع (dS/m)	غلظت اولیه PAHs در خاک (mg/Kg)
اطراف پالایشگاه تهران	لوم رسی	۳۳	۳۵	۳۲	۱۲	۲۳	۱۳/۴	۷/۴	۳۳/۴

غلظت اولیه ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) در خاک

غلظت کل این ترکیبات در ابتدای آزمایش و بعد از اتوکلاو برابر با ۳۳/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک (معادل ۳۳۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. بر اساس طبقه‌بندی (Malawska & Wilkomirski, 2001)، این مقدار در کلاس پنجم (بیش از ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) قرار گرفته و نشان‌دهنده آلودگی بسیار شدید خاک است. در بین ۱۵ ترکیب شناسایی‌شده، فلورانتن (Fluoranthene) با غلظت ۲۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۶۲/۱٪ از کل PAHs) بیشترین میزان را به خود اختصاص داده بود، در حالی‌که آنتراسن (Anthracene) با غلظت صفر، کمترین میزان را داشت. همچنین، ترکیبات پنج‌حلقه‌ای شامل Benzo(k)Fluoranthene، Benzo(a)Perylene و Benzo(b)Fluoranthene به ترتیب ۱۵/۹٪، ۱/۷۲٪ و ۳/۴۸٪ و ترکیبات سه‌حلقه‌ای Fluorene و

[۱۷] Two-way ANOVA

Phenanthrene به ترتیب ٪۳/۴ و ٪۳/۱۴ از مجموع کل PAHs را تشکیل داده بودند. این ترکیب آلاینده اولیه، نمایانگر الگوی پیچیده‌ای از PAHs در خاک‌های آلوده نفتی است که شامل ترکیبات سبک، متوسط و سنگین می‌شود (جدول ۳).

جدول ۳- غلظت اولیه ترکیبات ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی(PAHs) خاک بعد از اتوکلاو

ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی (PAHs)	تعداد حلقه‌های آروماتیک	غلظت در خاک (mg/Kg)	نسبت ترکیب به کل ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی (درصد)
Naphthalene	۲	۰/۱۶	۰/۵۰
Acenaphthene	۳	۰/۳۰	۰/۸۰
Fluorene	۳	۱/۱۳	۳/۴۰
Phenanthrene	۳	۱/۰۵	۳/۱۴
Anthracene	۳	۰	۰
Fluoranthene	۴	۲۰/۷۲	۶۲/۱۰
Pyrene	۴	۰/۳۵	۱/۰۶
Benzo(a)Anthracene	۴	۰/۲۱	۰/۶۳
Chrysene	۴	۰/۴۶	۱/۳۹
Benzo(b)Fluoranthene	۵	۱/۱۶	۳/۴۸
Benzo(K)Fluoranthene	۵	۵/۳۱	۱۵/۹۲
Benzo(a)Pyrene	۵	۰/۵۷	۱/۷۲
Dibenzo (a, h) Anthracene	۵	۰/۲۱	۰/۶۴
Benzo(ghi)Perylene	۶	۱/۷۲	۵/۱۵
کل		۳۳/۴	

تأثیر رطوبت و تلقیح باکتری‌ها بر جمعیت میکروبی و تجزیه PAHs

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد که تغییرات رطوبت و تلقیح باکتری‌ها بر جمعیت کل باکتری‌های خاک تأثیر معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). این یافته بیانگر آن است که افزایش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها لزوماً تحت تأثیر این عوامل قرار نمی‌گیرد و بنابراین شمارش جمعیت میکروبی به تنهایی شاخص قابل اعتمادی برای ارزیابی توانایی تجزیه آلاینده‌ها نیست. در عوض، فعالیت متابولیکی و توان تجزیه‌کننده سویه‌ها اهمیت بیشتری دارد. همچنین اثر متقابل رطوبت و سویه‌های باکتریایی نیز فاقد معنی‌داری آماری بود، که نشان می‌دهد تعامل این دو عامل نیز بر جمعیت کل مؤثر نبوده است. در مقابل، اثر رطوبت خاک بر کاهش غلظت کل PAHs معنی‌دار بود ($P<0.05$) که نشان می‌دهد مدیریت رطوبت عامل کلیدی در بهبود تجزیه ترکیبات هیدروکربنی است. این یافته‌ها تأکید می‌کنند که تلقیح باکتری‌ها بدون بهینه‌سازی بستر خاک و رفع محدودیت‌های زیست‌فراهمی به تنهایی قادر به ایجاد کاهش معنی‌دار آلاینده‌ها نیست.

جدول ۴- خلاصه نتایج تجزیه واریانس برای لگاریتم جمعیت باکتری و غلظت کل PAHs

میانگین مربعات (Mean Squares)			
منبع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	جمعیت باکتری	غلظت کل PAHs
بلوک (Block)	۲	۰/۲۸۷*	ns۵۹/۸۲۶
رژیم رطوبتی (I)	۳	ns ۰/ ۱۸	۱۷۳/۲۷*
باکتری (B)	۳	ns ۰/۱۵۷	۴۳/۰۷۷ns
اثر متقابل (I × B)	۹	ns ۰/۰۴۶	ns ۱۹/۷۶
خطا(Error)	۳۰	۰/۰۸۵	۳۸/۴۶
ضریب تغییرات(C.V)		۳/۶۳	۲۴/۳۷

* و ns به‌ترتیب معنی‌دار و غیرمعنی‌داری در سطح پنج درصد

مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مطالعات داخلی و خارجی نشان می‌دهد که یافته‌های مشابهی گزارش شده است. برای مثال، (Hoseini et al.,2020) در خاک‌های آلوده به نفت خام مشاهده کردند که تغییرات رطوبت و تیمار باکتریایی تأثیر قابل توجهی بر جمعیت میکروبی نداشت و جمعیت نسبتا پایدار باقی ماند.

مطالعه (Ghasemi Piranloo et al.,2019) نیز نشان داد که نوع حامل‌های جامد مانند باگاس و پرلیت می‌تواند پایداری جمعیت باکتری‌ها را افزایش دهد و نوسانات جمعیتی بیشتر تحت تأثیر تنش‌های محیطی رخ می‌دهد. یافته‌های Mohsenzadeh (2014) و Farahani & Mirbagheri (2012)نیز بر اهمیت شرایط فیزیکی محیط، از جمله رطوبت، دما و pH، در عملکرد میکروبی تأکید دارند.مطالعات خارجی مانند(Wang et al., 2016) ،(Margesin et al., 2007)، (Li et al.,2023) و (Zhang et al., 2021) نیز نشان داده‌اند که جمعیت کل باکتری‌ها در شرایط مختلف رطوبتی تغییر چندانی نمی‌کند، اما کارایی تجزیه به فعالیت سویه‌ها و شرایط محیطی وابسته است.

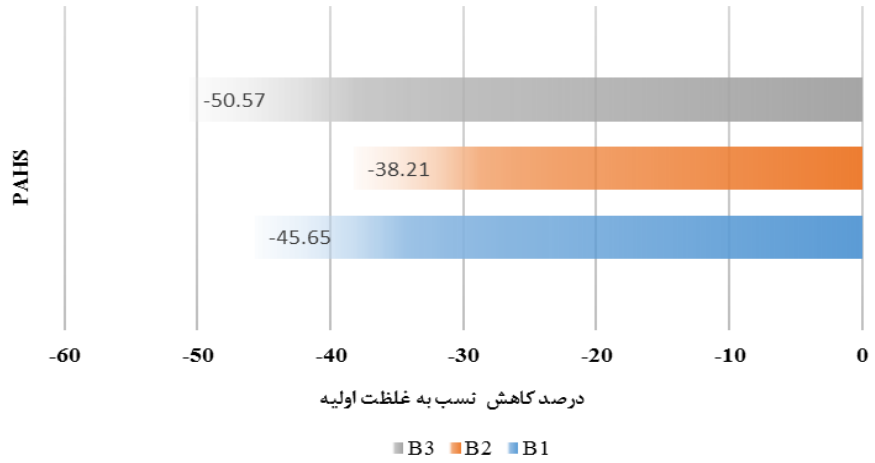
Rahman et al.(2020) نیز تأکید کردند که افزایش صرف جمعیت باکتری لزوماً منجر به بهبود پالایش میکروبی نمی‌شود و سازگاری و عملکرد سویه‌ها اهمیت بیشتری دارد.با این حال، برخی مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های خاص و شرایط محیطی مناسب می‌توانند کاهش معنی‌دار PAHs ایجاد کنند. برای مثال (Karimi et al.,2020)گزارش کردند که ترکیب گیاه‌پالایی با *Pseudomonas aeruginosa* منجر به کاهش معنی‌دار PAHs شد(Safari et al., 2017) نیز نشان دادند که *Bacillus sp.* و*Acinetobacter sp.* قادر به تجزیه قابل توجه PAHs هستند. مطالعات Li, Zhang & Wang (2021) و Kumar & Singh (2020) نیز نقش بیوسورفکتانت‌ها و فعالیت آنزیمی را در افزایش زیست‌فراهمی و کارایی پالایش میکروبی تأیید کرده‌اند.تعداد کل باکتری‌ها به‌تنهایی شاخص دقیقی برای ارزیابی توانایی تجزیه PAHs نیست. بر اساس مطالعات پیشین (Margesin et al., 2007; Wang et al., 2016; Li et al., 2023)، فعالیت‌های عملکردی مانند بیان ژن‌های تجزیه‌ای، تولید بیوسورفکتانت، و فعالیت آنزیمی ارتباط مستقیم‌تری با توان پالایش میکروبی دارند. به دلیل محدودیت‌های پژوهش، در این پژوهش، امکان اندازه‌گیری این شاخص‌های عملکردی وجود نداشت و تنها تغییرات جمعیت کل باکتری‌ها بر اساس شمارش کلونی (CFU) بررسی شد. با این حال، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی نیز در کنار شمارش جمعیت میکروبی مورد استفاده قرار گیرند تا ارزیابی دقیق‌تری از فرآیند پالایش میکروبی حاصل شود.

به طور کلی، نتایج این بخش از پژوهش حاضر و مقایسه با منابع مختلف نشان می‌دهد که پایداری جمعیت باکتری به‌تنهایی تضمین‌کننده موفقیت پالایش میکروبی نیست. بلکه ویژگی‌های عملکردی باکتری‌ها، سازگاری سویه‌ها با محیط و بهینه‌سازی شرایط فیزیکی مانند رطوبت، دما و pH، تعیین‌کننده اصلی کارایی تجزیه PAHs هستند. بنابراین، طراحی فرآیندهای پالایش میکروبی باید تمرکز خود را بیش از افزایش جمعیت کل بر فعالیت متابولیکی و شرایط محیطی بهینه معطوف کند.

تأثیر سویه‌های باکتریایی بر تجزیه PAHs

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تلقیح سویه‌های باکتریایی و اثر متقابل آن با رطوبت، تأثیر آماری معنی‌داری بر کاهش غلظت کل PAHs نداشت ($P<0.05$). با این وجود، بررسی عددی نتایج حاکی از پتانسیل قابل توجه سویه‌های منتخب در کاهش بار آلودگی بود. بررسی درصد تغییرات غلظت کل PAHs (شکل ۱) نشان داد که بیشترین کاهش غلظت کل PAHs در تیمار تلقیح‌شده با *Enterobacter cloacae* (B3) به میزان ۵۰/۶٪- مشاهده شد و پس از آن سویه‌های *Pseudomonas alcaligenes* (B1) و *Pseudomonas*

stutzeri (B2) به ترتیب با کاهش ٪۴۵/۷- و ٪۳۸/۲- قرار گرفتند.



شکل ۱- درصد کاهش PAHs کل در تیمارهای مختلف باکتری

بررسی تغییرات ترکیبات منفرد (شکل ۲) جزئیات بیشتری از این واکنش پیچیده را آشکار ساخت و یک الگوی دوگانه را در تمام تیمارها نشان داد. از یک سو، ترکیبات با وزن مولکولی پایین و متوسط، به ویژه ترکیب غالب فلورانتن، توسط هر سه سویه با کارایی بالایی تجزیه شدند (کاهش ٪۷۸ تا ٪۹۱). به طور مشابه، فنانترن نیز کاهش قابل توجهی (بین ٪۶۲ تا ٪۸۰) را نشان داد. از سوی دیگر، غلظت ترکیبات سنگین، چندحلقه‌ای و مقاوم به تجزیه به شکل چشمگیری افزایش یافت. به طور مشخص، غلظت ترکیب سرطان‌زای بنزو(a)پیرن افزایش شدیدی بین ٪۵۳۸+ تا ٪۶۹۳+ و غلظت دی‌بنزو(a,h)آنتراسن افزایشی بین ٪۳۸۷+ تا ٪۵۹۷+ در تیمارهای باکتریایی داشت.

عدم مشاهده اثر آماری معنی‌دار برای تلقیح باکتری، پدیده‌ای است که در سایر پژوهش‌های پالایش میکروبی نیز گزارش شده است (Al-Mailem et al., 2022; Kostka et al., 2002) و تفسیر آن نیازمند در نظر گرفتن برهم‌کنش‌های پیچیده میان میکروارگانیسم، آلاینده و ماتریکس خاک است. می‌توان چندین عامل کلیدی را به عنوان دلایل اصلی این پدیده مطرح کرد:

زیست‌فراهمی محدود (Limited Bioavailability) در خاک لوم‌رسی

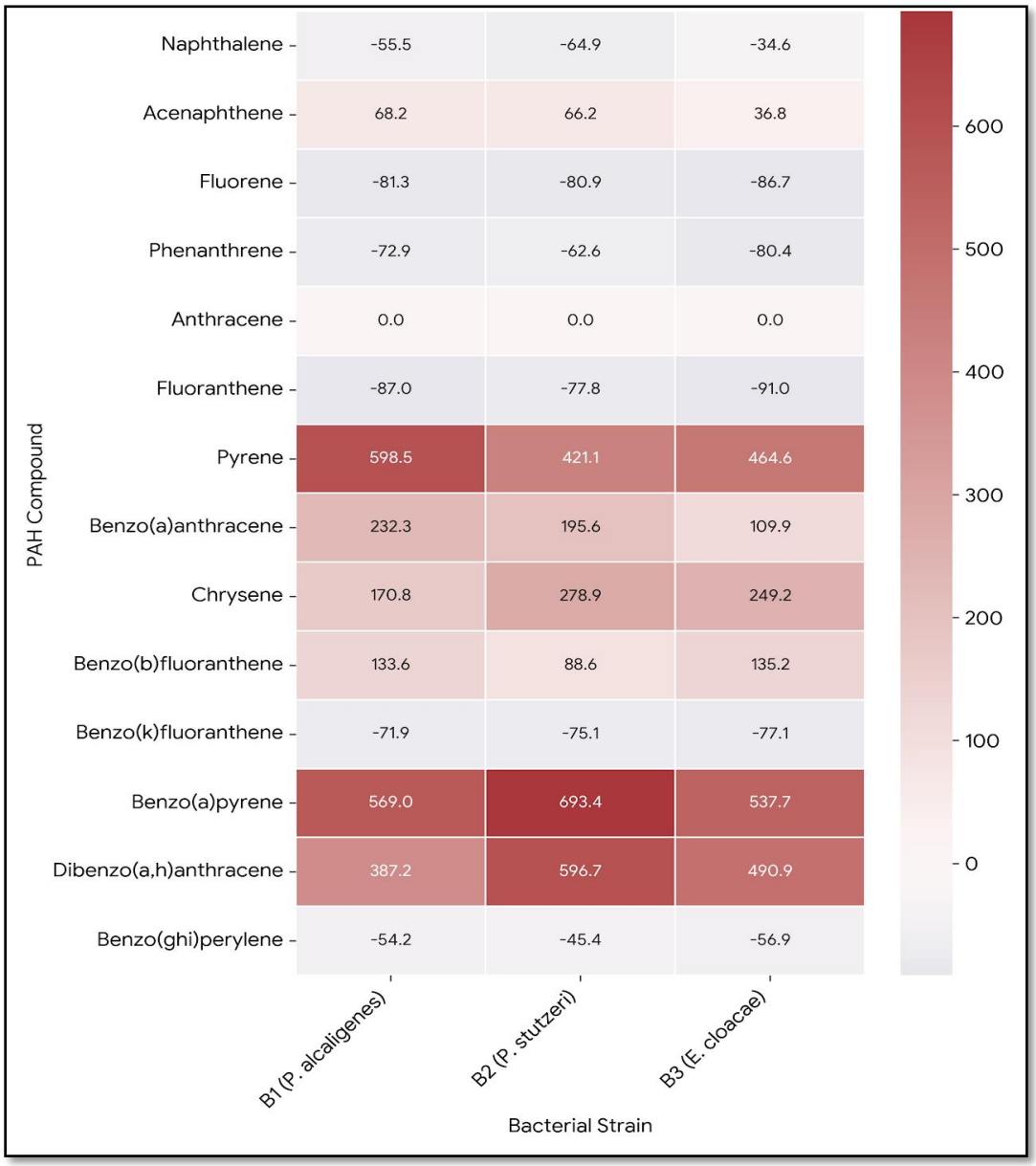
احتمالاً مهم‌ترین عامل محدودکننده در این پژوهش، زیست‌فراهمی پایین ترکیبات PAHs در خاک مورد استفاده بوده است. خاک‌های لوم‌رسی به دلیل داشتن درصد بالای رس و مواد آلی، دارای سطح ویژه و ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی هستند. این ویژگی‌ها باعث جذب سطحی (Sorption) قوی مولکول‌های آب‌گریز PAHs به ذرات خاک می‌شود.

با گذشت زمان، این ترکیبات در ریزحفره‌های (micropores) خاک به دام افتاده و به شدت به ماتریکس آلی-معدنی متصل می‌شوند، فرآیندی که به آن "کهنگی" یا "پیرشدگی" (Aging) آلاینده می‌گویند (Posada-Baquero et al., 2022). در نتیجه، حتی اگر سویه‌های باکتریایی تلقیح‌شده دارای تمام ژن‌ها و آنزیم‌های لازم برای تجزیه باشند، به دلیل عدم دسترسی فیزیکی به سوبسترا (آلاینده)، نمی‌توانند عملکرد واقعی خود را نشان دهند. بنابراین، سرعت فرآیند پالایش میکروبی بیش از آنکه توسط پتانسیل ژنتیکی باکتری کنترل شود، توسط سرعت

آزادسازی آلاینده از فاز جامد به فاز محلول خاک کنترل می‌گردد.

رقابت با میکروفلور بومی و چالش‌های استقرار

خاک اتوکلاو نشده، یک اکوسیستم میکروبی پیچیده و پایدار است. میکروفلور بومی از قبل با شرایط فیزیکوشیمیایی خاص خاک (مانند pH، شوری و بافت) سازگار شده و تمام کنام‌های اکولوژیک (ecological niches) موجود را اشغال کرده است. سویه‌هایی که از خارج به این سیستم تلقیح می‌شوند، برای بقا و فعالیت با چالش‌های جدی مواجه هستند، از جمله رقابت شدید برای منابع محدود کربن، نیتروژن و سایر عناصر غذایی و همچنین آنتاگونیسم از سوی جمعیت بومی (Siles and Margesin, 2018).



شکل ۲- درصد تغییر غلظت ترکیبات منفرد PAHs در تیمارهای مختلف باکتریایی (رنگ‌های خاکستری نشان‌دهنده کاهش و رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت هستند).

در چنین شرایطی، سویه‌های تلقیح‌شده ممکن است نتوانند به جمعیت کافی برای ایجاد یک اثر آماری قابل اندازه‌گیری دست یابند یا به سرعت کارایی خود را از دست بدهند.

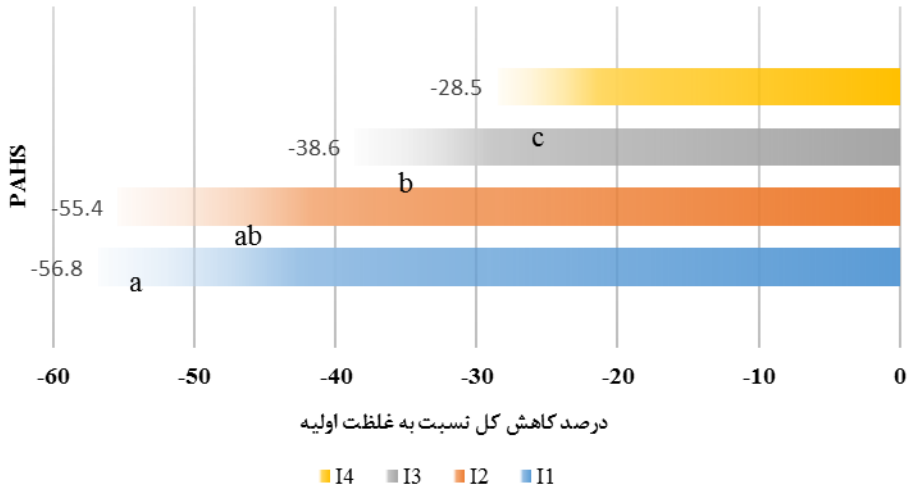
تجزیه ناقص و تجمع ترکیبات واسطه مقاوم

الگوی تجزیه ترجیحی ترکیبات سبک (۲ تا ۴ حلقه) و تجمع ترکیبات سنگین (۵ و ۶ حلقه)، بیانگر پیچیدگی مسیرهای متابولیکی است. تجزیه مؤثر ترکیباتی مانند فنانترن و فلورانتن نشان می‌دهد که سویه‌های مورد استفاده دارای آنزیم‌های کلیدی برای حمله اولیه به حلقه آروماتیک، مانند دی‌اکسیژنازها، هستند. این آنزیم‌ها اولین و مهم‌ترین مرحله در کاتابولیسم PAHs را کاتالیز می‌کنند. اما افزایش غلظت ترکیبات سنگین‌تر مانند بنزو(a)پیرن، پدیده تجزیه ناقص (Incomplete Metabolism) را مطرح می‌کند. این امر می‌تواند ناشی از تبدیل ترکیبات بزرگ‌تر به محصولات واسطه مقاوم باشد که باکتری‌ها توانایی تجزیه کامل آن‌ها را در بازه زمانی آزمایش نداشته‌اند (Haritash and Kaushik, 2009; Silva et al., 2020). به عبارت دیگر، مسیر متابولیکی در یک نقطه دچار گلوگاه (bottleneck) شده و به معدنی‌سازی کامل (Complete Mineralization) منجر نشده است.

بنابراین، اگرچه سویه‌های منتخب دارای پتانسیل آنزیمی برای آغاز فرآیند تجزیه هستند، اثربخشی کلی آن‌ها در این پژوهش تحت‌الشعاع عوامل قدرتمند محیطی و اکولوژیک مانند زیست‌فراهمی و رقابت میکروبی قرار گرفت. این یافته تأکید می‌کند که در پروژه‌های پالایش میکروبی، صرفاً حضور یک باکتری تجزیه‌کننده برای موفقیت کافی نیست و تمرکز اصلی باید بر بهینه‌سازی شرایط محیطی (مانند رطوبت که در این پژوهش اثر معنی داری داشت) و استفاده از راهکارهایی برای افزایش زیست‌فراهمی آلاینده‌ها (مانند افزودن بیوسورفکتانت‌ها) باشد.

تأثیر رژیم‌های رطوبتی بر تجزیه PAHs

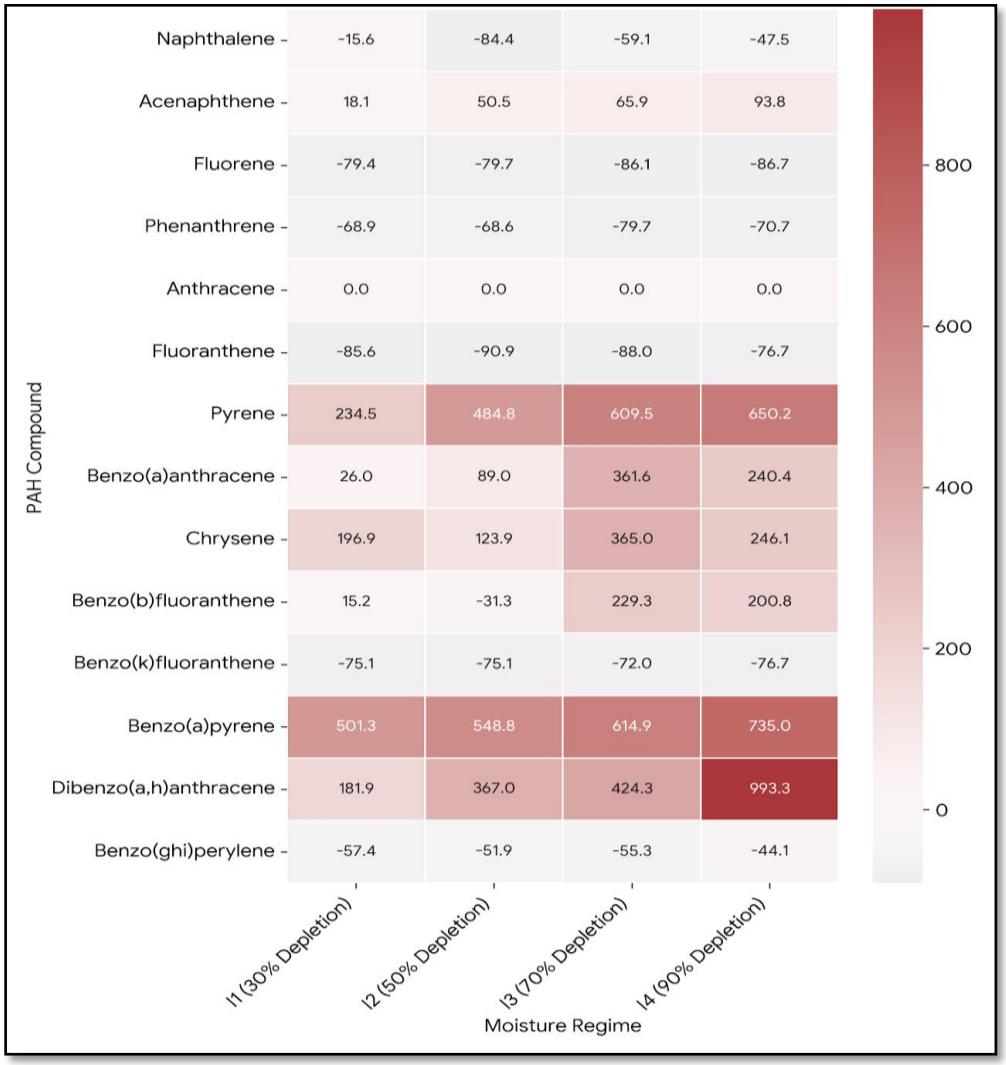
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رژیم رطوبتی خاک، تأثیر آماری معنی‌داری بر کاهش غلظت کل PAHs داشت ($P<0.05$). مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که بیشترین کارایی تخریب در تیمارهای با رطوبت بالاتر مشاهده شد؛ به طوری که بیشترین کاهش غلظت کل PAHs (به میزان ۵۶/۸٪- و ۵۵/۴٪-) به ترتیب در تیمارهای I1 (تخلیه ۳۰٪ آب قابل استفاده) و I2 (تخلیه ۵۰٪) رخ داد. در مقابل، با افزایش تنش خشکی، کارایی تخریب به شدت کاهش یافت و به کمترین مقدار خود (۲۸/۵٪-) در خشک‌ترین تیمار (I4) رسید (شکل ۳).



شکل ۳- درصد کاهش PAHs کل در تیمارهای مختلف رژیم رطوبتی

بررسی تغییرات ترکیبات منفرد (شکل ۴)، جزئیات بیشتری از این روند را آشکار ساخت. در تمام تیمارهای رطوبتی، ترکیبات سبک‌تر مانند فلورانتن و فنانترن کاهش قابل توجهی داشتند. با این حال، الگوی

تجمع ترکیبات سنگین و سمی به شدت تحت تأثیر رطوبت بود. برای مثال، غلظت دی‌بنزو(a,h)آنتراسن در تیمار بهینه رطوبتی (I1) حدود ۱۸۲٪ افزایش یافت، در حالی که این افزایش در خشک‌ترین تیمار (I4) به بیش از ۹۹۳٪ رسید که نشان‌دهنده تأثیر شدید تنش خشکی بر ناقص ماندن فرآیند تجزیه است.



شکل ۴- درصد تغییر غلظت ترکیبات منفرد PAHs در تیمارهای مختلف رطوبتی (رنگ‌های خاکستری نشان‌دهنده کاهش و رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت هستند).

معنی‌دار بودن اثر رطوبت، نقش حیاتی آب را به عنوان متغیر اصلی[۱۸] کنترل‌کننده در فرآیندهای پالایش میکروبی تأیید می‌کند. رطوبت بهینه خاک، که در این پژوهش در تیمارهای I1 و I2 (نزدیک به ظرفیت زراعی) حاصل شد، یک محیط آبی پیوسته[۱۹] ایجاد می‌کند که برای فعالیت حداکثری میکروبی ضروری است. در وهله اول، این فاز آبی به عنوان یک پل ارتباطی، تحرک آلاینده‌های آب‌گریز را از سطح ذرات جامد خاک به سمت سلول‌های میکروبی تسهیل کرده و احتمال برخورد مؤثر بین آنزیم و سوبسترا را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، لایه‌های نازک

[۱۸] Master Variable

[۱۹] Continuous Aqueous Phase

آبی پیرامون ذرات خاک برای انتقال نفوذی[۲۰] اکسیژن به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی و همچنین مواد مغذی ضروری برای سنتز آنزیم‌های تجزیه‌کننده، حیاتی است (Wang et al., 2024). در مقابل، شرایط خشکی شدید (مانند تیمار I4) باعث ایجاد تنش اسمزی بر سلول‌های میکروبی می‌شود. در این حالت، باکتری‌ها مجبور می‌شوند انرژی متابولیکی خود را از تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده به سمت سنتز املاح سازگار[۲۱] برای حفظ بقا هدایت کنند که نتیجه آن کاهش شدید فعالیت کاتابولیکی است (Bastos and Magan, 2009). یافته‌های این پژوهش که کارایی حداکثری را در رطوبت نزدیک به ظرفیت زراعی نشان می‌دهد، با مطالعات متعدد دیگری که رطوبت بهینه برای تجزیه هیدروکربن‌ها را در محدوده ۴۰٪ تا ۶۰٪ ظرفیت نگهداری آب گزارش کرده‌اند، همخوانی کامل دارد (Viñas et al., 2005; Mao et al., 2012). الگوی تجمع بیشتر ترکیبات واسطه سمی در شرایط خشکی نیز نشان می‌دهد که تنش آبی باعث توقف یا کند شدن مسیرهای کامل متابولیکی می‌شود؛ به این معنی که اگرچه حمله آنزیمی اولیه ممکن است رخ دهد، اما مراحل بعدی برای معدنی‌سازی کامل متوقف شده و به انباشت ترکیبات مقاوم و خطرناک می‌انجامد. این یافته بر اهمیت مدیریت دقیق رطوبت در پروژه‌های میدانی پالایش میکروبی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی ثانویه تأکید دارد. در مجموع، نتایج به وضوح نشان می‌دهد که بهینه‌سازی رطوبت خاک یک پیش‌نیاز اساسی برای دستیابی به پالایش میکروبی کارآمد است و اهمیت آن کمتر از انتخاب سویه میکروبی مناسب نیست.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که رطوبت خاک عامل اصلی و تعیین‌کننده در افزایش کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) است، به‌طوری‌که بیشترین کاهش آلاینده‌ها در سطوح رطوبتی نزدیک به ظرفیت زراعی مشاهده شد. رطوبت بهینه با بهبود تهویه خاک، افزایش تحرک آلاینده‌ها و فراهم کردن بستر مناسب برای فعالیت میکروبی، تجزیه مؤثر آلاینده‌ها را تسهیل می‌کند.

در بررسی سویه‌های باکتری، *Enterobacter cloacae* و *Pseudomonas alcaligenes* توانایی بالایی در کاهش غلظت PAHs نشان دادند، که بیانگر اهمیت کیفیت عملکردی و سازگاری میکروارگانیسم‌ها نسبت به صرفاً افزایش جمعیت آن‌ها است. با این حال، افزایش غلظت برخی ترکیبات سمی در برخی تیمارها، احتمال تجزیه ناقص و تشکیل محصولات میانی خطرناک را مطرح می‌کند.

در مجموع، موفقیت پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی مستلزم در نظر گرفتن هم‌زمان رطوبت بهینه، انتخاب سویه‌های میکروبی مؤثر و پایش دقیق رفتار آلاینده‌ها است. مطالعات آینده باید از شاخص‌های اختصاصی‌تر مانند ژن‌های کاتابولیکی و آزمون‌های زیست‌فراهمی استفاده کنند و تأثیر استریل‌سازی خاک بر ساختار و زیست‌فراهمی آلاینده‌ها را نیز در نظر بگیرند. لازم به ذکر است که اتوکلاو کردن خاک در این پژوهش، اگرچه برای ارزیابی دقیق عملکرد سویه‌های تلقیح‌شده ضروری بود، اما ممکن است بر زیست‌فراهمی اولیه ترکیبات PAHs تأثیر گذاشته باشد.

[۲۰] Diffusive Transport

[۲۱] Compatible Solutes

Refrences

1. Akinpelu, A.A., Salami, T.O., Olawale, O.O., Olayiwola, H.A., Atoyebi, D.V., Oyerinde, A.A., Olima, B.O.O., Adebayo, O.S., Oluwalanu, F.A. and Akinhanmi, T.F. 2024. Advanced bioremediation strategies for petroleum hydrocarbon contaminated soils. *Frontiers in Environmental Science* 12: 1354422. doi: 10.3389/fenvs.2024.1354422
2. Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London.
3. Ali, N., Khan, M.I., Shah, M., Ullah, S., Zafar, M., Iqbal, A., Tariq, M., Al-Wabel, M.I., Al-Qahtani, N. and Alharbi, M.S. 2023. A comprehensive review on petroleum hydrocarbon contamination in soil: Impacts and remediation. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 79005–79031. doi: 10.1007/s11356-023-27357-8
4. Al-Mailem, D. M., Al-Deieg, M., Eliyas, M., & Radwan, S. S. (2017). Biostimulation of indigenous microorganisms for bioremediation of oily hypersaline microcosms from the Arabian Gulf Kuwaiti coasts. Journal of Environmental Management, 193, 576–583.
5. Bastos, A. C., & Magan, N (2009). Trametes versicolor: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. International Biodeterioration and Biodegradation, 63, 389–394.
6. Chen, L., Zhang, Y., Wang, S., Li, J., He, L. and Sheng, X.F. 2023. Biodegradation of PAHs in soil environments: microbial strategies and environmental interactions. *Environmental Pollution* 325: 121305. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121305
7. Dane, J.H. and Topp, G.C. (Eds.). 2002. *Methods of Soil Analysis, Part 4: Physical Methods*. Soil Science Society of America Book Series No. 5.[1] SSSA, ASA, Madison, WI.
8. Ebrahimi, M. (2010). *Isolation, purification and identification of oil decomposing bacteria from contaminated soils and the study of their efficiency*. M.Sc. Thesis, Department of Soil Science, Islamic Azad University of Karaj Branch. (In Persian).
9. Farahani, M., & Mirbagheri, S. A. (2012). Application of indigenous microorganisms for reducing petroleum pollution in soil. *Journal of Environmental Sciences, University of Tehran*. (In Persian).
10. Ghasemi Piranloo, M., et al. (2019). Survival of *Enterobacter cloacae* in different solid carriers. *Journal of Water and Soil Science, University of Tabriz*. (In Persian).
11. Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169(1-3): 1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
12. Hashemi, N., Pourbabaee, A. A., Shariati, S., & Yadzanfar, N. (2025). Rapid phenanthrene biodegradation in highly calcareous saline sodic soil using an artificial halophile bacterial consortium. International Journal of Environmental Science and Technology, 22(3), 1817-1828.
13. Hoseini, M., et al. (2020). Study on the effect of moisture and bacterial strains on bioremediation of oil-contaminated soils. *Iranian Journal of Environmental Sciences*. (In Persian).
14. Karimi, M., Soleimani, N., & Azizi, F. (2020). Effect of phytoremediation and *Pseudomonas aeruginosa* treatment on removal of petroleum compounds from soil. *Environmental and Sustainable Development Quarterly*. (In Persian).
15. Kostka, J. E., et al. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Applied and Environmental Microbiology, 68, 6256.
16. Kumar, A., & Singh, R. (2020). Role of Rhodococcus indonesiensis in biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils. *International Journal of Environmental Research*, 14(3), 201-210.

17. Kumar, A., Singh, A., Singh, N., Bishnoi, K. and Bishnoi, N.R. 2023. Hybrid bioremediation technologies for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: A review. *Chemosphere* 311(Pt 2): 136962. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136962
18. Li, J., Zhang, J., Li, S., Wang, Y. and Liu, J. 2023. Key factors affecting the bioremediation of petroleum-hydrocarbon-contaminated soil: A review. *Molecules* 28(3): 1362. doi: 10.3390/molecules28031362
19. Li, J., Zhang, Y., Zhao, J., & Wang, F. (2021). Biodegradation of PAHs in saline-alkali soil using *Sphingomonas* immobilized on biochar. *Environmental Pollution*, 268, 115749.
20. Li, X., Zhang, Y., & Wang, J. (2021). Enhanced biodegradation of PAHs in saline soils using Sphingomonas sp. immobilized on biochar. *Environmental Pollution*, 289, 117920. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117920
21. Li, Y., Wang, J., Chen, Y., & Zhang, X. (2023). Functional responses of microbial communities to hydrocarbon contamination and soil moisture variation. Science of The Total Environment, 870, 161988.
22. Malawska, M. and Wilkomirski, B. 2001. An analysis of soil pollution by petroleum products in the surroundings of a HGV service station. *Water, Air, and Soil Pollution* 127(1-4): 257-267. doi: 10.1023/A:1005278615802
23. Mao, X., Jiang, R., Xiao, W. and Wu, J. 2012. Influence of soil moisture content on bioremediation of PAH-contaminated soil. *Chemosphere* 89(5): 597–603. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.081
24. Margesin, R., et al. (2007). Microbial communities and their response to contamination in alpine soils. FEMS Microbiology Ecology, 59(2), 307-317.
25. Mohsenzadeh, F. (2014). Evaluation of bioremediation efficiency of petroleum pollution by indigenous bacterial strains in cold regions (Case study: Tabriz Refinery). *Iranian Journal of Cell Biology*. (In Persian).
26. Moradi, S., Sarikhani, M. R., Beheshti Ale-Agha, A., Reyhanitabar, A., Alavi-kia, S. S., & Sharifi, R. (2024). Effects of Long-term Oil Pollution on Soil Microbial Respiration and β-glucosidase Activity. Journal of Soil Biology, 11(2), 213-230. https://doi.org/10.22092/sbj.2024.362697.254.
27. Nkwe, D.O., Thekisoe, O.M.M. and Moloantoa, D.F.P. 2024. Impacts of petroleum hydrocarbon contamination on soil microbial diversity and functioning: A review. *Environmental Advances* 15: 100459. doi: 10.1016/j.envadv.2023.100459
28. Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. (Eds.). 1982. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties (2nd[2] ed.)*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America,[3] Madison, WI.
29. Posada-Baquero, R., Semple, K. T., Ternero, M., & Ortega-Calvo, J.-J. (2022). Determining the bioavailability of benzo(a)pyrene through standardized desorption extraction in a certified reference contaminated soil. Science of the Total Environment, 803, Article 150025.
30. Rahman, K.S.M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2020). Bioremediation of contaminated sites: The influence of environmental factors on microbial degradation of pollutants. Environmental Technology & Innovation, 20, 101159.
31. Safari, N., Razavi, S., & Karimi, L. (2017). Evaluation of indigenous bacteria efficiency in biodegradation of petroleum compounds. In *Proceedings of the National Conference on Environment, Energy, and Sustainable Natural Resources*. (In Persian).
32. Sharma, B., Joshi, S., Kumar, S., Saxena, S. and Varma, A. 2023. Petroleum hydrocarbon contamination in soil: Bioremediation approaches and future outlook. *Bioresource Technology Reports* 22: 101423. doi: 10.1016/j.biteb.2023.101423
33. Siles, J. A., & Margesin, R (2018). Insights into microbial communities

mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(10), 4409–4421.

34. Silva, R.M., Aguiar, M.S., Oliveira, L.M.S., Silva, V.L., Ferreira, S.L.C. and Sousa, E.M.L.S. 2020. Biodegradation of PAHs by bacterial consortia in contaminated soil: effect of different nutrients and surfactants. *Biodegradation* 31(1): 69–81. doi: 10.1007/s10532-019-09896-z
35. Singh, P. and Fulekar, M.H. 2024. Recent advances in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology Reports* 25: 101762. doi: 10.1016/j.biteb.2023.101762
36. Sparks, D.L. (Editor-in-Chief), Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T. and Sumner, M.E. (Eds.). 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series No. 5. SSSA, ASA, Madison, WI.
37. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (2017). Bioremediation: using the activities of microorganisms and/or plants to treat contaminated soil and groundwater. Retrieved from EPA bioremediation overview pages.
38. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (1996). *Method 8310: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846). Washington, DC: U.S. EPA.
39. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J. and Solanas, A.M. 2005b. Microbial potential for bioremediation of PAH-contaminated soils: influence of soil matric potential and water content. *Journal of Hazardous Materials* 120(1–3): 127–134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2004.12.033
40. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M. and Grifoll, M. 2005a. Bioremediation of PAHs in soil by microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1347–1355. doi: 10.1128/AEM.71.3.1347-1355.2005
41. Wang, X., et al. (2016). Effects of soil moisture on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by indigenous microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1234-1242.
42. Wang, Z., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Wang, Y. and Ma, F. 2024. Soil moisture regulation in bioremediation: microbial response and pollutant degradation. *Science of the Total Environment* 906: 167614. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167614
43. Zeynali, K., Shariati, S., & Pourbabaee, A. A. (2024). The role of effective oil-eating bacteria in the remediation of oil-contaminated soils (Case study: Bacillus genus). Journal of Soil Biology, 12(1), 105-139. https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366140.266.
44. Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2025). The efficiency of oil-degrading and phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus availability of a oil-contaminated calcareous soil. Journal of Soil Biology, 12(2), 191-212. https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366874.268.
45. Zeynali, K., Shariati, Sh., Pourbabaei, A. A., & Shorafa, M. (2024). Application of biosurfactant-producing and oil-degrading bacterial consortium in enhancing the hydraulic conductivity of TPH-contaminated soil. Iranian Journal of Water and Soil Research, 55(9), 1585–1599. (In Persian).
46. Zhang, H., Liu, Y., Wen, J., & Wang, X. (2021). Effects of indigenous bacteria and soil moisture on bioremediation of petroleum-contaminated soils. Environmental Pollution, 284, 117464.

Contents

Subject **Page**

Effect of biopriming with plant growth-promoting bacteria on seed germination indices of wheat under salinity stress.....1

Ahmad Asgharzadeh, Kobra Saghafi, and Bahman Khoshrou

Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth.....19

Esmaeil Karimi, Sima Aslyazdani, Ezzatallah Esfandyari, and Seyed Bahman Mousavi

Comparison of the plant growth-stimulating ability of epiphyton and epiphyton microbial communities in some rice fields of Guilan province.....39

Mahdiyeh Leylasi Marand , HoseinAli Alikhani , AhmadAli Pourbabaie, and Shayan Shariati

The effect of the application of coal ash in soil on the symbiotic indices of chickpea inoculated with Mesorhizobium and mycorrhizal fungi.....67

Ali Akbar Safari Sinegani, and Leila Karami

Edible, Poisonous, Medicinal, and Economically Valuable Agaric Fungi Symbiotic with Oriental Beech (Fagus orientalis Lipsky)..…….…….….....91

Hamed Aghajani , Seyed Mohammad Hojjati, Mohammad Ali Tajick-Ghanbari, Mohammad Reza Pourmajidian, and Ali Borhani

The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains ……...……..107

Reza Mohammadikia,Alireza Fallah Nosratabad, and Bahman Khoshrou

Soil Science Society of Iran Soil and Water Research Institute

Journal of Soil Biology

Vol. 13, No 1
2025

Manager-in–Charge; K. Bazargan, PhD
Associate Professor, Soil and Water Research Institute
Editor-in–Chief: Alireza Fallah Nosratabad, 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. Ziaeian, PhD	Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars

English Editor:	Amir Lakzian, PhD
Technical Editor:	Eng. Kiana khamehchi

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

Semiannual

Journal of Soil Biology

ISSN: 2345-2536

Vol. 13, No. 1, 2025

Contents

Subject **Page**

Effect of biopriming with plant growth-promoting bacteria on seed germination indices of wheat under salinity stress.....1
Ahmad Asgharzadeh, Kobra Saghafi, and Bahman Khoshrou

Investigating the ability of biofilm formation by bacteria of Barvar 2 phosphate biofertilizer and their effect along with the application of phosphate soil on barley growth.....19
Esmacil Karimi, Sima Aslyazdani, Ezzatallah Esfandyari, and Seyed Bahman Mousavi

Comparison of the plant growth-stimulating ability of epiphyton and epiphyton microbial communities in some rice fields of Guilan province.....39
Mahdiyeh Leylasi Marand , HoseinAli Alikhani , AhmadAli Pourbabaie, and Shayan Shariati

The effect of the application of coal ash in soil on the symbiotic indices of chickpea inoculated with Mesorhizobium and mycorrhizal fungi.....67
Ali Akbar Safari Sinegani, and Leila Karami

Edible, Poisonous, Medicinal, and Economically Valuable Agaric Fungi Symbiotic with Oriental Beech (Fagus orientalis Lipsky).....91
Hamed Aghajani , Seyed Mohammad Hojjati, Mohammad Ali Tajick-Ghanbari, Mohammad Reza Pourmajidian, and Ali Borhani

The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains 107
Reza Mohammadikia,Alireza Fallah Nosratabad, and Bahman Khoshrou

www.sbj.areeo.ir