

بررسی خصوصیات محرک رشد گیاه میکروفلور جداسازی شده از پریفایتون در برخی از شالیزارهای استان گیلان

مهدی بهشتی^۱، حسینعلی علیخانی^{۲*}، احمد علی پوربابایی^۳، حسن اعتصامی^۴، مصطفی نوروزی^۵، هادی اسدی رحمانی^۶، سمیه امامی^۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی خاک- دانشگاه تهران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک- دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک- دانشگاه تهران

۴- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک- دانشگاه تهران

۵- استادیار - دانشگاه الزهراء(س)

۶- استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب ایران

۷- محقق پسادکتری گروه علوم و مهندسی خاک- دانشگاه تهران

مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: halikhan@ut.ac.ir

چکیده

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه نقش پریفایتون در شالیزارها از جهت خصوصیات محرک رشد گیاه بویژه توان انحلال فسفات توسط باکتری‌ها و قارچ‌های این لایه زیستی انجام نشده است. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی توان حل کنندگی فسفات و برخی از مولفه‌های تحریک رشد گیاه در باکتری‌ها و قارچ‌های جداسازی شده از پریفایتون‌های نمونه برداری شده از ۲۰ مزرعه شالیزار استان گیلان انجام شد. ۴۴ جدایه باکتری و ۳۲ جدایه قارچی توانمند در انحلال فسفات جداسازی شد که از این میان ۱۰ جدایه باکتری و ۵ جدایه قارچ برتر برای آزمون‌های تکمیلی انتخاب گردید. نتایج نشان داد که باکتری‌های 6B11 و 13B25 با بیشترین توان انحلال، به ترتیب ۳۵۴ و ۳۲۷/۳ میلی‌گرم در لیتر فسفر حل کردند. توان تولید سیدروفور (بر اساس شاخص HD/CD) توسط جدایه 13B25 برابر ۳/۲ و جدایه 6B11 برابر ۳/۴ با افزایش معنی‌دار ($p > 0.001$) نسبت به سایر جدایه‌ها بود. میزان تولید ایندول استیک اسید توسط این دو جدایه به ترتیب برابر ۱۷۵/۳ و ۲۰۵/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در بین جدایه‌های قارچ، دو جدایه 6F11 و 8F12 بهترین ویژگی‌های محرک رشد گیاه را داشتند. میزان انحلال فسفر توسط این دو جدایه به ترتیب برابر ۷۴۲ و ۸۱۸ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که باکتری 13B25 بیشترین شباهت را به *Bacillus cereus* و باکتری 6B11 به *Acinetobacter calcoaceticus* شبیه است. قارچ 6F9 از نوع *Talaromyces minioluteus* و قارچ 8F12 بیشترین شباهت را به *Talaromyces stipitatus* داشت. ریزجانداران پریفایتون با تولید اسیدهای آلی مختلف و عمدتاً گلوکونیک اسید، ۲-کتوگلوکونیک اسید، مالیک و اگزالیک اسید منجر به انحلال فسفات نامحلول شدند. بطور کلی، پریفایتون‌های تشکیل شده در شالیزارها می‌تواند به عنوان منبع مفیدی برای جداسازی قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد گیاه در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، انحلال فسفات، باکتری، پریفایتون، قارچ، سیدروفور، شالیزار.

Investigation of Plant Growth Promoting Traits of Microflora Isolated from Periphyton in Paddy Field of Gilan province

Mehdi Beheshti¹, Hossein Ali Alikhani², Ahmad Ali Pourbabae³, Hassan Etesami⁴, Mostafa Noroozi⁵, Hadi Asadi Rahmani⁶, Somayeh Emami⁷

Received: January 3, 2021 Accepted: April 26, 2021

1- PhD. student, Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tehran.

2- Prof., Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tehran.

3- Assist. Prof., Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tehran.

4- Assoc. Prof., Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tehran.

5- Assist. Prof., Alzahra University

6- Prof., Soil and Water Research Institute of Iran

7- Post-doctorate Researcher, Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tehran.

*Corresponding Author, E-mail: halikhan@ut.ac.ir

Abstract

Background and Objectives

Periphyton is a biological layer that plays an important role in nutrient cycle in aquatic ecosystems, especially paddy fields. This biofilm is widely formed on the surface of soil, plants and rocks in paddy fields. To date, no research has been done on the plant growth promoting (PGP) role of this biofilm in paddy fields, especially on phosphate solubilizing ability of bacteria and fungi isolated from the biofilm. The aim of this study was to investigate the phosphate solubilizing ability and some other PGP traits of bacteria and fungi isolated from the periphyton sampled from 20 paddy fields in Guilan province.

Methodology

Samplings were carried out from periphytic biofilm formed in paddy fields of Gilan province. Isolation and purification of bacteria and fungi from Periphyton samples were performed on nutrient agar medium after preparation of dilution series and spread culture. Counting and screening of phosphate-solubilizing bacteria and fungi was performed using a source of tri-calcium phosphate based on the ratio of halo diameter to colony diameter. For a detailed study of the ability of phosphate solubilization by selected isolates, quantitative measurements were performed in the Sperber liquid medium. The production of indole acetic acid (IAA) by isolates was also measured in the Luria-bertani medium supplemented with L-tryptophan (1mg/mL of broth). Fresh cultures of isolates were inoculated on chrome azurol sulfone (CAS) plate agar, for detection of siderophore production following the modified protocol of Schwyn and Neiland (1987). Organic acids produced by bacterial and fungal isolates were analyzed as a phosphate dissolving mechanism using a High-Performance Liquid Chromatography apparatus. Initially, the two bacterial and two fungal strains were selected based on plant growth promoting properties. These isolates were identified based on the sequence of 16S rRNA gene for bacteria and ITS-rDNA gene sequence for fungi and were registered in GenBank and the access number for each of them was reported. All data were subjected to analysis of variance (ANOVA), after testing the variables for normality and for homogeneity of variance. Means were compared by the Duncan's Multiple Range test at 1% probability level.

Findings

The results showed that the population of phosphate solubilizing bacteria in Siahkal region with (5.5×10^3 CFU/L) and Fashtam region with (0.5×10^3 CFU/L) had the highest and lowest population, respectively. Regarding fungi, Siahkal region had the highest (1.4×10^3) and Fashtam region had the lowest (2×10^1) population of phosphate solubilizing fungi. Among the microbial isolates, 10 bacterial isolates and 5 fungal isolates were selected for additional tests based on their phosphate solubilization potential. The results showed that bacterial isolates 13B25 and 6B11, with the highest phosphate solubilization, which solubilized 354 and 327.3 mg P/l, respectively. The trend of pH changes in Sperber's medium was correlated with the amount of soluble phosphorus, so that with decreasing pH, the amount of soluble phosphorus increased ($R^2 = -0.78$). The highest pH was observed in Sperber medium inoculated with 15B28 isolate (4.2) and the lowest pH was observed by 6B11 isolate (3.8). The decrease in Sperber's medium pH is due to the production of

organic acids, which has been reported by various researchers. The ability to produce siderophore (based on HD / CD index) by isolates 13B25 and 6B11 was equal to 3.2 and 3.4, respectively, with a significant increase ($p < 0.001$) compared to other isolates. The production of indole-3-acetic acid by the isolates 13B25 and 6B11 was 175.3 and 205.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Among the fungal isolates, two isolates, 6F9 and 8F12, were the best in PGP traits. The solubilization content of phosphorus by these two fungal isolates was 742 and 818 mg l^{-1} , respectively. Changes in Sperber's medium pH were proportional to the amount of dissolved phosphorus, and concentration of soluble phosphorus increased by reducing the pH ($R^2 = -0.99$). The lowest and highest pH value were observed in 8F12 isolate (1/2) and 7F20 isolates with (3.9), respectively. The highest amount of total organic acid was measured by isolate 8F12 (1151 mg / l). Isolate 6F9 with halo to colony diameter ratio of 6.2 had the highest ability to produce siderophore among fungal isolates. The highest and lowest levels of IAA production in fungal isolates were measured in isolates 7F20 and 11F15 with 285.7 and 26.3 $\mu\text{g / ml}$, respectively. The results of molecular identification of effective superior bacterial isolates showed that 13B25 and 6B11 were most similar to *Bacillus cereus* and *Acinetobacter calcoaceticus*, respectively. In addition, fungal isolates 6F9 and 8F12 were most similar to *Talaromyces minioluteu* and *Talaromyces stipitatus*, respectively. Microorganisms isolated from periphyton solubilized insoluble phosphate by producing various organic acids such as mainly gluconic acid, 2-ketogluconic acid, malic acid and oxalic acid. In general, periphytons formed in paddy fields can be considered as a useful source for isolating fungi and bacteria with PGP traits.

Conclusion

Based on the findings of this study, bacterial and fungal strains isolated from periphytic biofilm of paddy fields in Gilan province have a high ability to dissolve phosphate. These isolates also have plant growth-promoting properties such as high production capacity of siderophore and indole acetic acid. Microorganisms solubilized insoluble phosphate in the soil by producing various organic acids such as gluconic acid, 2-ketogluconic acid, and malic and oxalic acid. According to the results of this study, periphyton components, especially bacteria and fungi, it is suggested that these strains will be used in future research (greenhouse and field experiments) and is hoped that it will be a new and important step towards the production of biofertilizers to achieve sustainable agriculture by managing the nutrient cycle in paddy fields.

Keywords: Auxin, Bacteria, Fungi, Paddy field, Periphyton, Phosphate Solubilization, Siderophore.

مقدمه

مصرف نیتروژن حدود ۳۰-۳۵ درصد و این مقدار برای سفر تنها حدود ۲۰-۱۰ درصد می باشد (ژو و همکاران ۲۰۱۴). برخلاف خشکی ها تشکیل زمین های غرقاب مصنوعی مانند شالیزارها با تغییر شرایط اکسید-احیا همراه است، که با فرآیندهای زیست محیطی مانند نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و رسوب فلزات اکسیدی در ارتباط است (سو و همکاران ۲۰۱۷). عموماً، آزادسازی فسفر از خاک به آب سطحی (که منجر به آبخویی و هدررفت فسفر می شود) و رسوب فسفر (به شکل های فسفات آهن، فسفات آلومنیوم و فسفات کلسیم) از عواملی هستند که باعث کاهش کارایی مصرف این عنصر غذایی در شالیزارها می شوند (لو و

زمین های غرقابی امکاناتی مانند کمک به خود-پاکسازی^۱ اکوسیستم و تأمین غذا برای بشر فراهم می کنند (مور و همکاران ۲۰۱۷؛ ژانگ و همکاران ۲۰۱۷). برای مثال، شالیزارها با سطح زیر کشت ۱۵۹ میلیون هکتار غذای بیش از نیمی از جمعیت دنیا را فراهم می کنند (بی نام ۲۰۰۸). تولید پایدار برنج به ویژگی های فیزیکی محیط رشد، تغییرات آب و هوایی، جمعیت میکروبی و جریان بهینه مواد غذایی و آب بستگی دارد (کیائو و همکاران ۲۰۱۲). کارایی مصرف کودهای شیمیایی در شالیزارها کم بوده به طوری که کارایی

¹ Self-purification

شالیزارها پتانسیل خوبی در حلالیت فسفات های نامحلول دارند (اویس و همکاران ۲۰۱۷).

عموماً، بیشتر تحقیقات انجام شده روی جامعه میکروبی محرک رشد گیاه در شالیزارها تنها بر دو فاز آبی و خاکی متمرکز بوده است و اهمیت جامعه میکروبی بین آنها به عنوان سومین فاز در این اراضی نادیده یا دست کم گرفته شده است (لو و همکاران ۲۰۱۷). جلبک‌های رشته‌ای با پیوستن به سطح خاک/ رسوب و اجتماع آن با باکتری، قارچ و دیگر میکرو و مزوارگان سیستم‌های خاک (مثلاً پروتوزا و متازوا) لایه‌ای را تشکیل می‌دهد که به عنوان لایه زیستی پریفایتیک^۲ شناخته می‌شود (لیو و همکاران ۲۰۱۷؛ وو و همکاران ۲۰۱۶). پریفایتون به عنوان یک جامعه زیستی که عمدتاً از اجزاء فتواتوتروف تشکیل شده است، می‌تواند مقدار زیادی از مواد غذایی را جذب کند، آنزیم‌های خارج سلولی مختلفی تولید کند و اسیدیته و شرایط رداکس را از طریق مصرف دی‌اکسید کربن و آزاد سازی اکسیژن در طی فرآیند فتوسنتز تغییر دهد (لیو و همکاران ۲۰۱۶؛ الوود و همکاران ۲۰۱۲). این موضوع اثبات شده که نقش اصلی لایه زیستی^۲ پریفایتون تشکیل شده در برکه‌ها تنظیم کننده چرخه عناصر غذایی و جریان انرژی است و لذا به عنوان یک بافر زیستی برای رسوب و آزادسازی فسفر بوده و در واقع بعنوان یک مخزن / منبع عناصر غذایی بین خاک و لایه غرقاب بالای آن عمل می‌کند (سو و همکاران ۲۰۱۷؛ سینگ و همکاران ۲۰۱۷). با این حال، نقش لایه پریفایتیک در تسهیل انتقال مواد غذایی در زمین‌های غرقاب مصنوعی مانند شالیزارها معمولاً نادیده و یا دست کم گرفته شده و نقش ویژه این لایه زیستی در تنظیم استفاده از نیتروژن و فسفر در این اراضی به ندرت گزارش شده است (وو و همکاران ۲۰۱۶). پریفایتون به دلیل حضور میکرو فلور حل کننده فسفات قادر است فسفر را به شکل

همکاران ۲۰۱۶a؛ وو و همکاران ۲۰۱۶). در نتیجه، هر ساله مقادیر زیادی از انواع کودهای شیمیایی در شالیزارها با هدف افزایش عملکرد برنج استفاده می‌شود (چائون و همکاران ۲۰۱۷؛ وو و همکاران ۲۰۱۶). این امر اغلب باعث بالا بردن مقدار مصرف کود در شالیزارها می‌شود که منجر به مشکلاتی نظیر آلودگی با منبع غیرنقطه‌ای^۱ (فراگیر)، آلودگی آب‌های زیر زمینی، آزادسازی مواد شیمیایی ناخواسته و فلزات سنگین سمی در محیط آبی، اثرات منفی بر زندگی ماهی و دیگر آبزیان، کاهش کیفیت خاک، آسیب به ریشه گیاه و در نهایت کاهش محصول می‌شود (چو و همکاران ۲۰۱۶؛ هوانگ و همکاران ۲۰۱۴). به دلیل مشکلات زیادی که در کنترل تخلیه عناصر غذایی در شالیزارها وجود دارد، بهبود کارایی مصرف عناصر غذایی یک نیاز فوری برای تامین پایدار نیاز غذایی گیاه و کاهش فراگیر آلودگی از این اکوسیستم‌ها است.

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی برای رشد، توسعه و عملکرد گیاه می‌باشد. متأسفانه، فسفر در خاک تحرک کمی دارد و اکثر خاک‌ها با کمبود فسفر برای تولید بهینه محصول مواجه هستند (تاکاشی و انور ۲۰۰۷). اکثر خاک‌ها مقدار فسفر کل بالایی دارند (به طور میانگین ۰/۰۵ درصد)، و تنها ۰/۱ درصد از این مقدار برای گیاه قابل دسترس می‌باشد (ژو و همکاران ۱۹۹۲). تخمین زده می‌شود که ۷۵ درصد کودهای فسفات به کاربرده شده در خاک‌های آهکی به فرم فسفات کلسیم (Ca-P) و در خاک‌های اسیدی به فرم فسفات آهن و آلومینیم (Al-P، Fe-P) رسوب می‌کند (جایشیر و همکاران ۲۰۱۱). یکی از راه‌های اقتصادی و کم هزینه برای غلبه بر این مشکل، استفاده از ریزجانداران با توان انحلال فسفات در خاک می‌باشد (کاپنتر و همکاران ۲۰۰۸). بر طبق مطالعات گذشته مشخص شده است که ریزجانداران ریزوسفری در

³ Biofilm

¹ Non-Point Source (NPS)

² Periphytic biofilm

و قارچ‌های حل‌کننده فسفات کمتر بررسی شده است. بنابراین هدف این مطالعه جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها و قارچ‌های لایه زیستی پریفایتون و مطالعه خصوصیت حل‌کننده گی فسفات در وهله اول و دیگر ویژگی‌های محرک رشد گیاه آنها و انتخاب جدایه‌های برتر می‌باشد، تا با توجه به امکان کشت و تکثیر، پریفایتون در شرایط آزمایشگاهی از پتانسیل این لایه زیستی پس از مطالعات بیشتر گلخانه و مزرعه‌ای، نهایتاً به عنوان یک کود زیستی فسفره غنی از میکرو فلور محرک رشد در شرایط مزرعه و بهبود شرایط تغذیه‌ای و عملکرد محصول برنج استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از توده پریفایتون و جداسازی باکتری و قارچ‌های حل‌کننده فسفات

برای نمونه‌برداری، ۲۰ مزرعه شالیزار در استان گیلان انتخاب و نمونه‌های پریفایتون از سطح خاک اطراف گیاه برنج به وسیله کاردک ضد عفونی شده برداشته و درون لوله‌های آزمایش استریل قرار داده شد (یانگ و همکاران ۲۰۱۶). شکل ۱ نقاط نمونه‌برداری از مزارع شالیزار در استان گیلان را نشان می‌دهد. نمونه‌ها در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل و مراحل تکثیر پریفایتون در محیط کشت BBM/BG11 انجام گرفت (وو و همکاران ۲۰۱۶). جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها و قارچ‌ها از نمونه‌های پریفایتون، پس از تهیه سری‌های رقت و کشت سطحی به ترتیب بر روی محیط کشت عمومی NA³ و PDA⁴ انجام شد.

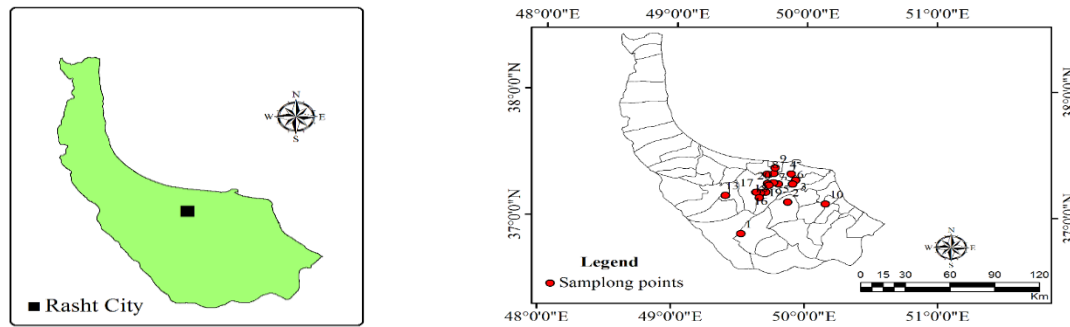
معدنی و قابل جذب گیاه تبدیل نماید (لو و همکاران ۲۰۱۶b؛ الوود و همکاران ۲۰۱۲؛ اینگلت و همکاران ۲۰۰۴). ریزجانداران حل‌کننده فسفر با مکانیسم‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای آلی مانند گلوکونیک، الفاکتوگلوکونیک^۱، اگزالیک، سیتریک، استیک، سیتریک و سوکسونیک اسید و همچنین تولید H⁺ باعث افزایش حلالیت کانی‌ها در خاک و فراهمی فسفر برای گیاه می‌شوند (منا و همکاران ۲۰۱۶؛ رودریگز و فراگا ۱۹۹۹). از جمله میکروفلور حل‌کننده فسفات در خاک می‌توان به باکتری‌های *Bacillus Pseudomonas* و *Klebsiella* و قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* اشاره کرد (منا و همکاران ۲۰۱۵؛ شانور و همکاران ۲۰۱۴؛ ویرال و همکاران ۲۰۱۱؛ فرهات و همکاران ۲۰۰۹). میکروفلور محرک رشد گیاه با مکانیسم‌های دیگری مانند تولید فیتوهورمون‌ها مانند ایندول استیک اسید (IAA) (مناز و لازرویت ۲۰۰۶؛ پتن و گلیک ۲۰۰۲) و ترشح سیدروفور (چایارن و همکاران ۲۰۰۹؛ لیم و همکاران ۱۹۹۹) به رشد گیاه کمک می‌کنند. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که جدایه‌های حل‌کننده فسفات، دارای سایر صفات محرک رشدی نیز می‌باشند، بر اساس یافته‌های علمی، باکتری‌های محرک رشد گیاه احتمالاً با بیش از یک مکانیسم عمل می‌کنند (شارما و همکاران ۲۰۱۳)؛ و عقیده بر این است که ریزسازواره‌های حل‌کننده فسفات، به طور هم‌زمان دارای پتانسیل کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و همچنین افزایش رشد گیاه از طریق تولید سیدروفور و IAA هستند (شارما و همکاران ۲۰۱۳). تا کنون در لایه زیستی پریفایتون نقش میکرو فلور محرک رشد گیاه (PGPR²) به ویژه باکتری‌ها

³ Nutrient Agar

⁴ Potato Dextrose Agar

¹ α -ketogluconic acid

² Plant Growth Promoting Bacteria



شکل ۱- نقاط نمونه برداری از شالیزارهای استان گیلان.

داده شد و ۱۰ جدایه برتر که توانایی بالاتر داشتند (بر اساس شاخص نسبت قطر هاله به قطر کلنی، $HD/CD^2 <$ (۲) برای آزمون کمی توانایی انحلال فسفر انتخاب شد (دالوستو و همکاران ۲۰۰۸). برای شمارش کل قارچ‌ها نیز رقت‌های 10^{-1} (رقت‌های ده‌می) تا 10^{-4} تهیه و از هر رقت مقدار یک دهم میلی‌لیتر در سه تکرار روی محیط کشت PDA حاوی 0.014 گرم رزبنگال و 0.06 گرم استرپتومایسین پخش شده و پتری دیش‌ها در دمای $28-30$ درجه سلسیوس نگهداری شدند. شمارش تعداد قارچ در ظرف مدت یک هفته از زمان کشت انجام شد (یاموتا و همکاران ۲۰۱۹). برای شمارش قارچ‌های حل‌کننده فسفات از رقت‌های تهیه شده مقدار یک دهم میلی‌لیتر در سه تکرار روی محیط اسپربر جامد حاوی رزبنگال (0.014 گرم در لیتر) و استرپتومایسین (0.06 گرم در لیتر) پخش شده و ظروف پتری در دمای $30-28$ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. برای شناسایی و شمارش قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خصوصیت تشکیل هاله شفاف پیرامون کلنی (ایجاد هاله بی رنگ و شفاف) استفاده شد و شمارش ظرف طی ۱۴ روز بعد از کشت انجام گردید. در این مرحله تعداد ۳۲ جدایه دارای توانایی تشکیل هاله بی رنگ و شفاف تشخیص داده شد و در نهایت تعداد ۵ جدایه که توانایی بالاتری داشتند ($HD/CD < 3$) برای آزمون کمی توانایی انحلال فسفر انتخاب شد (ادیکاری و پندی ۲۰۱۹).

برای شمارش کل باکتری‌ها ۱۰ گرم از توده پریفایتون به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (0.85 درصد سدیم کلرید) استریل افزوده شد. سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر (150 دور در دقیقه) تکان داده شد. رقت‌های ده‌می تا 10^{-6} تهیه و از هر رقت یک دهم میلی‌لیتر در سه تکرار روی محیط کشت آگار مغذی حاوی سیکلوهگزامید (100 میلی‌گرم در لیتر) پخش شده و ظروف پتری در دمای $28-30$ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. شمارش تعداد کلنی‌ها روزانه در مدت یک هفته از زمان کشت انجام شد (گرونولد و وولپرت ۲۰۰۸). برای شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سوسپانسیون رقت‌ها تا رقت 10^{-5} آماده شد. برای شمارش کل باکتری‌ها، با استفاده یک دهم میلی‌لیتر از هر رقت و در سه تکرار روی محیط کشت اسپربر^۱ حاوی سیکلوهگزامید (گلوکز: 10 گرم، عصاره مخمر: 0.5 گرم، سولفات منیزیم با هفت مولکول آب: 0.25 گرم، ۵ تری‌کلسیم فسفات: $2/5$ گرم، آگار: 15 گرم در لیتر به اضافه 100 میلی‌گرم سیکلوهگزامید در لیتر) درون ظروف پتری پخش شده و سپس در دمای $30-28$ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند. برای شناسایی و شمارش کلنی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ویژگی شفاف شدن محیط پیرامون کلنی (ایجاد هاله بی رنگ و شفاف) بصورت روزانه تا ۱۴ روز برای غربالگری اولیه جدایه‌های توانمند استفاده شد. در پایان این مرحله تعداد ۴۴ جدایه با توانایی تشکیل هاله شفاف تشخیص

² Halo Diameter/ Colony Diameter

¹ Sperber

آزمون کمی توان انحلال فسفات نامحلول معدنی توسط جدایه‌های باکتریایی و قارچی

در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های انتخاب شده، از ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر مایع استفاده شد و ارلن‌ها بعد از تلقیح با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (تعداد ۱۰ جدایه باکتری و ۵ جدایه قارچ)، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی شیکر و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲۰ ساعت تکان داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها سانتریفوژ شدند (۱۰۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدو و انادات مخلوط گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unique UV/VIS 2100, China) در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و مقدار فسفر آزاد شده توسط هر جدایه بر اساس میزان جذب نور مربوط به آن با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از منبع فسفر معدنی (KH_2PO_4) محاسبه گردید. در این مرحله pH محلول نیز با دستگاه pH-متر (EYELA pH-meter, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری گردید (چایارن و لومیونگ ۲۰۰۹).

توان تولید فیتوهورمون ایندول استیک اسید (IAA) و سیدروفور جدایه‌ها

برای اندازه‌گیری توان تولید IAA جدایه‌ها از روش پتن و گلیک (۱۹۹۶) استفاده شد. جدایه‌های باکتری و قارچ در محیط LB^۱ با و بدون اسیدآمینو-ال-تریپتوفان (1 mg ml^{-1}) کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیون‌ها در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون فیلتر (با صافی استریل ۰/۲۲

میکرون) شده را با ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی^۲ (۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ مولار $FeCl_3$ در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک ۳۵ درصد) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس مقدار جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر با اسپتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از مقادیر ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر لیتر IAA در محیط کشت فیلتر شده به عنوان استاندارد استفاده گردید (پتن و گلیک ۱۹۹۶). برای اندازه‌گیری توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها از روش شوین و نیلندز (۱۹۸۷) و محیط CAS-Agar استفاده شد و بر اساس شاخص HD/CD، جدایه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری اسیدهای آلی تولید شده توسط جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات

برای اندازه‌گیری اسیدهای آلی تولید شده توسط جدایه‌های باکتریایی پس از رشد دادن جدایه‌های مورد نظر در محیط اسپربر مایع، سوسپانسیون حاصل در ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۳ (HPLC) (KNAUER, Germany) با ستون C18 ($250 \times 1/5$ میلی‌متر) تزریق گردید. از اسید فسفریک ۰/۱ درصد (حجی/حجمی) به عنوان فاز متحرک استفاده شد و جریان ثابت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه برقرار بود. مدت زمان نگهداری^۴ در طول موج ۲۱۰ نانومتر با استفاده از تشخیص دهنده UV/VIS ثبت شد. مقدار اسیدهای آلی با مقایسه ارتفاع پیک با منحنی استاندارد از نظر کمی تعیین شد (پارک و همکاران ۲۰۱۰).

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر

³ High-Performance Liquid Chromatography

⁴ Retention time

¹ Luria-bertani

² Salkowsky reagent

آنالیز آماری

تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها با نرم افزار SPSS 24 پس از آزمون نرمال بودن با کولموگروف-اسمیرنف، انجام و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0.05$) استفاده شد. از با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel 2019 نمودارها رسم گردید.

نتایج و بحث

باکتری و قارچ‌های حل‌کننده فسفات پریفایتون

جدول ۱ جمعیت کل (باکتری‌ها و قارچ‌ها) و جمعیت حل‌کننده‌های فسفات در لایه زیستی پریفایتون را نشان می‌دهد. بالاترین جمعیت کل باکتری ($CFU g^{-1}$) Periphyton $10^7 \times 1/38$ مربوط به منطقه خشک‌بیجار و کمترین آن ($10^6 \times 1/1$) در منطقه فشتام بود. بیشترین کمترین جمعیت کل قارچ به ترتیب در منطقه سیاهکل و فشتام به ترتیب با $10^4 \times 2/5$ و $10^4 \times 7$ ($CFU g^{-1}$) Periphyton مشاهده شد. بعلاوه جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در منطقه سیاهکل با $10^3 \times 5/5$ بالاترین فراوانی و منطقه فشتام با $10^3 \times 0/5$ کمترین جمعیت را در بین ۲۰ منطقه نمونه‌برداری داشت. در خصوص قارچ‌های حل‌کننده فسفات، مشخص شد که منطقه سیاهکل بالاترین ($10^3 \times 1/4$) و منطقه فشتام ($10^1 \times 2$) دارای کمترین جمعیت قارچ‌های حل‌کننده فسفات بودند.

در ابتدا ۲ جدایه برتر باکتری بر اساس ویژگی‌های محرک رشدی گیاه انتخاب شدند. این سویه‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB کشت شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی شیکر با شدت ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) به طور جداگانه برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید (جیانگ و همکاران ۲۰۰۶). برای قارچ در ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت PDA کشت داده شده و در تاریکی به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این مطالعه، ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریبوزومی (ITS-rDNA) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر جهت تکثیر ناحیه 5.8S-rDNA و ITS با استفاده از آغازگرهای ITS1 (-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') انجام شد. در پایان و پس از شناسایی جدایه‌های باکتری و قارچ جداسازی شده، توالی ژن 16S rRNA دو سویه باکتری و توالی ژن ITS-rDNA قارچ در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ثبت و شماره دسترسی^۱ برای هر یک از آن‌ها به دست آمد.

¹ Accession number

جدول ۱- جمعیت کل باکتری و قارچ های پریفایتون و جمعیت حل کننده فسفات جداسازی شده از پریفایتون.

شماره نمونه	منطقه	جمعیت کل باکتری ×	جمعیت کل قارچ ×	باکتری های حل کننده	قارچ های حل کننده
		۱۰ ^۶	۱۰ ^۲	فسفات × ۱۰ ^۳	فسفات × ۱۰ ^۱
CFU/g Periphyton					
۱	رستم آباد	۲/۲	۱۲	۰/۸	۸
۲	سیاهکل	۱۴/۱	۲۵	۵/۵	۱۴
۳	آستانه اشرفیه	۲/۵	۱۰	۶	۷
۴	لشت نشاء	۳/۶	۱۵	۱/۵	۵
۵	کوچه اصفهان	۳/۶	۱۴	۱/۶	۹
۶	خشکاروندان	۱۱/۲	۱۸	۴/۶	۱۳
۷	خشکیجار (پشکه)	۱۳/۸	۱۸	۵	۱۲
۸	فرشم بالا	۴/۵	۱۱	۱۰	۱۲
۹	باغچه بنه	۴/۲	۱۲	۱/۸	۸/۵
۱۰	مردان	۴/۶	۱۲	۲/۲	۸
۱۱	کوچه اصفهان- محله لاله دشت	۳/۳	۱۴	۱/۴	۹
۱۲	سنگر	۱۳/۵	۲۰	۲/۵	۴
۱۳	شفت	۲/۸	۱۰	۱/۲	۷
۱۴	ایستگاه گیله پردر سر ۱	۸/۸	۱۳	۳/۹	۴
۱۵	ایستگاه گیله پردر سر ۲	۹/۹	۱۴	۴/۱	۵
۱۶	مرکز تحقیقات برنج ۱	۱۲/۱	۱۸	۲/۵	۴
۱۷	مرکز تحقیقات برنج ۲	۱۲	۲۱	۲	۱۴
۱۸	فشتام	۱/۱	۷	۰/۵	۲
۱۹	جعفر آباد ۱	۵/۲	۱۲	۳/۵	۷/۷
۲۰	جعفر آباد ۲	۴/۸	۱۱	۳/۳	۷/۵

توانایی انحلال فسفات توسط جدایه های باکتری

بیشترین مقدار فسفر محلول (در محیط اسپربر حاوی تری کلسیم فسفات) توسط سویه 6B11 بمقدار ۳۵۴ میلی گرم در لیتر و کمترین آن در جدایه شماره 15B28 با ۲۱۰/۷ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد. روند

تغییرات pH در محیط اسپربر با مقدار فسفر محلول همبستگی داشت به طوری که با کاهش pH محیط، میزان فسفر محلول افزایش نشان داد ($R^2 = 0.78$). بالاترین pH در محیط اسپربر تلقیح شده با جدایه 15B28 به مقدار ۴/۲ و کمترین مقدار pH در سویه 6B11

CB501 جداسازی شده از خاک‌های اسیدی منطقه بوکیتو واقع در کامرون بین ۵۵ تا ۲۰۹ (mg L^{-1}) گزارش شده است. این سویه با تولید گلوکونیک اسید و مالیک اسید باعث انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی در محیط اسپربر مایع شد (هنری و همکاران ۲۰۰۸). پوول و رائو (۱۹۷۱) ارتباط بین انحلال فسفات ۱۲ جدایه باکتری حل کننده فسفات و pH محیط را بررسی کردند و نتایج نشان داد که رابطه منفی بین انحلال میزان تری کلسیم فسفات با pH محیط تلقیح شده با این باکتری‌ها وجود دارد.

با مقدار ۳/۸ مشاهده شد (جدول ۲). کاهش pH محیط به دلیل تولید اسیدهای آلی می‌باشد که توسط محققین مختلفی این موضوع گزارش شده است (کلاوینو و همکاران ۲۰۱۰؛ گولاتی و همکاران ۲۰۱۰). اسیدی شدن محیط به دلیل ترشح H^+ به عنوان مکانسیم جایگزین حل کننده فسفات توسط ریزجانداران گزارش شده است. ترشح H^+ ناشی از جذب NH_4^+ ، تولید اسید کرینیک ناشی از تنفس و تولید آنیون اسیدهای آلی می‌باشد (آرویو و همکاران ۲۰۰۳؛ جوریانک و همکاران ۱۹۸۶). میزان انحلال فسفات در سویه *Pseudomonas fluorescens*

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان pH و فسفات انحلال یافته در محیط تلقیح شده با جدایه‌های باکتری.

pH	تری کلسیم فسفات	
	فسفر محلول (mg L^{-1})	سویه باکتری
۳/۸۰ ± ۰/۰۳ ^e	۳۲۷/۳ ± ۷/۸ ^b	13B25
۴/۲۰ ± ۰/۰۳ ^{cd}	۲۱۰/۷۱۰ ± ۵ ^e	15B28
۳/۹۰ ± ۰/۰۳ ^d	۲۱۸/۳۳ ± ۵ ^e	19B39
۴۰ ± ۰/۰۶ ^{bc}	۲۴۰۶ ± ۳ ^d	20B43
۳/۸۰ ± ۰/۰۸ ^e	۳۵۴۹ ± ۳ ^a	6B11
۴/۱۰ ± ۰/۰۶ ^b	۲۱۹/۳۵ ± ۱ ^e	7B12
۴۰ ± ۰/۰۶ ^{cd}	۲۳۹۵ ± ۳ ^d	8B14
۴/۰۰ ± ۰/۰۶ ^a	۲۱۵۳ ± ۵ ^e	8B15
۳/۹۰ ± ۰/۰۸ ^{de}	۲۵۳/۳۱۰ ± ۷ ^c	8B16
۳/۹۰ ± ۰/۰۱ ^{de}	۳۱۵/۳۶ ± ۷ ^b	8B17

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

اختصاص داد و کمترین مقدار فسفر حل شده مربوط به جدایه 7F20 با ۴۱۶ میلی‌گرم در لیتر بود. تغییرات pH در محیط حاوی اکثر جدایه‌های قارچ متناسب با مقدار فسفر حل شده بود و همبستگی معنی‌داری بین کاهش pH با

توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های قارچ

جدایه قارچ 8F12 بالاترین مقدار فسفر محلول را در محیط اسپربر مایع با ۸۱۸ میلی‌گرم در لیتر به خود

شده در محیط به ۱۸۰۰-۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از تلقیح با این قارچ‌ها رسید. در حالی که آکودو و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که سویه های *Talaromyces calidicanus* و *Aspergillus niger* فسفر محلول را بین ۲۴۰۰ تا ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از منبع تری کلسیم فسفات آزاد کردند. مقدار فسفر محلول در این مطالعه کمتر بود و بالاترین مقدار آن ۸۱۸ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد.

مالیک بیشترین مقدار را در بین اسیدهای تولیدی داشت. جدایه 6B11 و جدایه‌های 8B15، 8B16، 8B17، 19B39 و 15B28 اسید استیک ترشح نکردند. میزان کل اسید تولیدی در جدایه 6B11 برابر ۴۷۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. ریزجانداران حل کننده فسفات با فرآیندهایی مانند تولید اسیدهای آلی که باعث اسیدی شدن محیط می‌شود و همچنین تولید عوامل کلات کننده باعث انحلال فسفر می‌شوند (رودریگز و فراگا ۱۹۹۹). از جمله این اسیدهای آلی می‌توان به گلوکونیک اسید، ۲-کتوگلوکونیک اسید، اگزالیک اسید، سیتریک اسید، استیک اسید و سوکسینیک اسید اشاره کرد (راجپوت و همکاران ۲۰۱۳). گلوکونیک اسید به عنوان اصلی‌ترین اسید آلی تولیدی توسط باکتری‌های حل کننده فسفات مانند *Pseudomonas sp.*، *Erwinia herbicola*، *Pseudomonas cepacia* و *Burkholderia cepacia* گزارش شده است (گلدستین و همکاران ۱۹۹۳). باکتری‌های گرم منفی دارای توانایی بالایی در انحلال فسفر معدنی از طریق مسیر اکسیداسیون مستقیم (معروف به اکسیداسیون غیر فسفری) می‌باشند، که گلوکونیک اسید تولید شده از گلوکز در انحلال فسفات نامحلول نقش دارد. اکسیداسیون مستقیم گلوکز به اسید گلوکونیک محرک تولید پروتون توسط غشای سلولی است که پروتون جدا شده از اسید گلوکونیک برای حل کردن فسفات در محیط آزاد می‌شود (گلدستین ۲۰۰۷؛ لین و همکاران ۲۰۰۶). بار یوسف و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند دو اسید آلی گلوکونیک اسید و ۲-کتوگلوکونیک تولید شده

افزایش غلظت فسفر محلول وجود داشت ($R^2 = 0.99$)، به طوری که کمترین مقدار pH در محیط مایه زنی شده با جدایه 8F12 با مقدار ۲/۱ و بیشترین مقدار در جدایه‌های 7F20 با ۳/۹ مشاهده شد (جدول ۳). ین و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که سویه‌های قارچ *Penicillium Aspergillus niger* و *Penicillium axalicum bilaii* در محیط کشت مایع حاوی تری کلسیم فسفات دارای توانایی بالایی در انحلال فسفر بودند و غلظت فسفر حل جدول ۳- مقایسه میانگین میزان pH و فسفات انحلال یافته در محیط تلقیح شده با جدایه‌های قارچ.

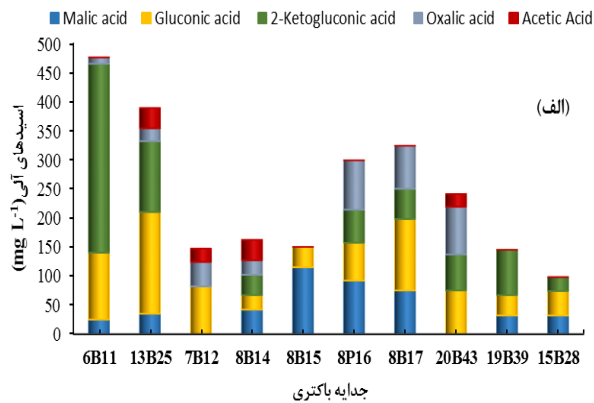
تری‌کلسیم فسفات		
جدایه قارچ	فسفر محلول (mg L ⁻¹)	pH
11F15	۵۲۳ ± ۵ ^d	۲/۵۰ ± ۰/۰۳ ^b
5F7	۶۲۱ ± ۶ ^c	۲/۹۰ ± ۰/۰۲ ^d
6F9	۷۴۲ ± ۶ ^b	۲/۴۰ ± ۰/۰۴ ^c
7F20	۴۱۶ ± ۶ ^e	۳/۹۰ ± ۱/۸ ^a
8F12	۸۱۸ ± ۷ ^a	۲/۱۰ ± ۰/۰۲ ^e

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) با آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

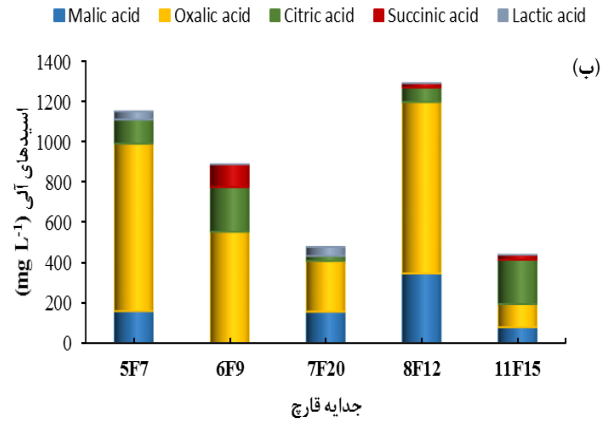
توان تولید اسیدهای آلی توسط جدایه‌های باکتری و قارچ

فسفات بعنوان منبع نامحلول فسفر را نشان می‌دهد. همبستگی بالایی بین میزان تولید اسید و انحلال فسفر مشاهده شد ($R^2 = 0.98$). با توجه به شکل ۳ بیشترین میزان تولید اسید آلی مربوط به جدایه 6B11 بود که توانایی بالایی در انحلال فسفات و پتاسیم از خود نشان داد. بیشترین اسید تولیدی در بین جدایه‌ها از نوع ۲-کتوگلوکونیک اسید بود و پس از آن گلوکونیک اسید بیشترین مقدار را داشت. در جدایه 8B15 اسید

کتوگلوکونیک اسید و سوکسینیک اسید منجر به انحلال فسفر می‌شوند (بانیک و دی ۱۹۸۳).



توسط جدایه‌های *Pseudomonas cepacia* در انحلال فسفر نقش اصلی را دارند. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که سویه‌های *Bacillus* با تولید اگزالییک اسید، ۲-



شکل ۳- اسیدهای آلی تولید شده در محیط اسپربر حاوی تری کلسیم فسفات (TCP) توسط جدایه‌های باکتری (الف) و جدایه‌های قارچ (ب).

میلی‌گرم در لیتر را داشتند. تولید و تجمع سیتریک اسید توسط جدایه *Aspergillus niger* در pH های پایین در مطالعات محققین مختلف گزارش شده است (پلاسارد و همکاران، ۲۰۰۹؛ کارافا و کویچک، ۲۰۰۳). قارچ‌های حل‌کننده فسفات اسیدهای آلی مالیک، گلوکونیک، تارتاریک، اگزالییک، سیتریک و بوتیریک را تولید می‌کنند (لی و همکاران ۲۰۱۶؛ راجپوت و همکاران ۲۰۱۵). تولید اسیدهای آلی مالیک، سوکسینیک، اگزالییک و لاکتیک در سویه‌های قارچی *Penicillium* و *Aspergillus* مشاهده شده است (ادیکاری و پندی ۲۰۱۹).

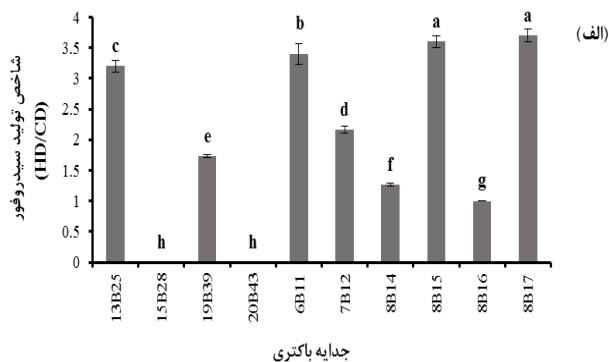
توانایی رشد بر روی محیط CAS-Agar را داشت ولی هاله‌ای تشکیل نداد و لذا تولید کننده سیدروفور نبود. برخی از جدایه‌ها مانند 15B28، 20B43 نیز بر روی این محیط رشد نکردند (شکل ۴- الف). جنس‌های *باسیلیوس* و *سودوموناس* از اصلی‌ترین جنس‌های تولید کننده سیدروفور در خاک هستند (چایارن و همکاران، ۲۰۰۹). گزارش شده است که سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus enthracis* تولید کننده سیدروفور

شکل ۳-ب تولید اسیدهای آلی مختلف توسط ۵ جدایه قارچ در محیط کشت PDA حاوی تری‌کلسیم فسفات را نشان می‌دهد. همبستگی بالایی بین مقدار فسفر محلول و مقدار اسید تولیدی مشاهده شد ($R^2 = 0.83$). بیشترین مقدار کل اسیدهای آلی تولیدی توسط سویه 8F12 با مقدار ۱۱۵۱ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار اسید آلی تولید شده توسط جدایه‌های قارچ از نوع اسید اگزالییک و اسید مالیک می‌باشد. از بین جدایه‌ها تنها جدایه‌های 5F7 و 7F20 توانایی تولید لاکتیک اسید به ترتیب به مقدار ۴۱ و ۴۵

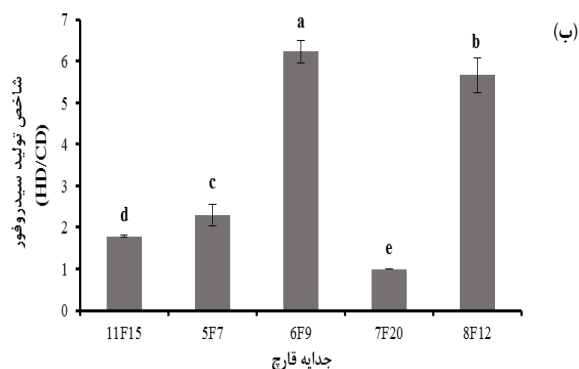
توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتری و قارچ

با بررسی مقدار توان تولید سیدروفور در جدایه‌های باکتری مشخص شد که بالاترین شاخص نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه‌های 8B17 با ۳/۷ و 8B15 با ۲/۶ و کمترین نسبت هاله به کلنی در جدایه شماره 8B14 با ۱/۲۷ اندازه‌گیری شد. جدایه 8B16

توانایی را در میان جدایه‌های قارچی از خود نشان داد. در مطالعه‌ای توان تولید سیدوفور توسط جدایه‌های قارچ بین ۰/۲۸ تا ۳/۰۵ گزارش شده است (چایارن و همکاران ۲۰۰۹).



هستند (پیک و همکاران ۲۰۱۲؛ سهران و نهرا ۲۰۱۱). در شکل ۴- ب نتایج توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های قارچ نشان داده شده است. با توجه به این شکل سویه 6F9 با نسبت قطر هاله به کلنی ۶/۲ بالاترین

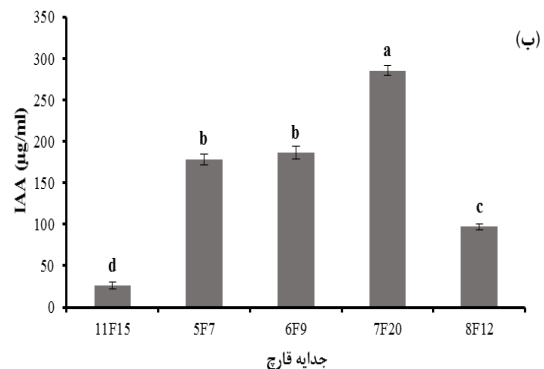
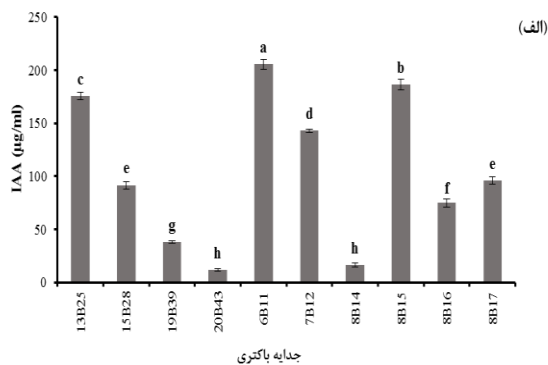


شکل ۴- میزان سیدروفور تولید شده توسط جدایه‌های باکتری و قارچ، (الف) جدایه‌های باکتری؛ (ب) جدایه‌های قارچ. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری از نظر آزمون توکی ($P < 0.05$) می‌باشد.

استیک اسید تولید شده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات بین ۲۲-۲۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (شهاب و همکاران ۲۰۰۹). امامی و همکاران (۲۰۱۸) مقدار هورمون ایندول استیک اسید تولیدی در دو سویه باکتری *Pseudomonas* و *Pseudomonas sp.* *mosselii* به ترتیب برابر ۱۹/۲ و ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. بیشترین و کمترین مقدار تولید هورمون ایندول استیک اسید (IAA) در جدایه‌های قارچ به ترتیب در جدایه‌های 7F20 و 11F15 با ۲۸۵/۷ و ۲۶/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری گردید (شکل ۵- ب). بیشترین مقدار تولید IAA توسط سویه قارچی *Pleurotus ostreatus* برابر ۴۷۳/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (بووس و همکاران ۲۰۱۳).

توانایی تولید IAA توسط جدایه‌های باکتری و قارچ

نتایج توان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌های باکتری در شکل ۵- الف نشان داده شده است. بیشترین و کمترین مقدار تولید هورمون ایندول استیک اسید (IAA) به ترتیب در جدایه 6B11 و جدایه 20B43 با مقادیر ۲۰۵/۷ و ۱۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. سویه *Pseudomonas Putida* دارای توانایی تولید هورمون اکسین می‌باشد و مکانسیم اثر آن از طریق توسعه ریشه بر رشد گیاه است. در مطالعه‌ای که توسط چایارن و لومیونگ (۲۰۱۱) در کشور تایلند انجام شد مشخص شد که سویه *Klebsiella* SN1.1 بالاترین توانایی تولید هورمون اکسین با $۲۹۱/۹۷ \pm ۰/۱۹$ میلی‌گرم بر لیتر داشت. مقدار ایندول



شکل ۵- میزان ایندول استیک اسید تولید شده توسط جدایه‌های باکتری و قارچ، (الف) جدایه‌های باکتری؛ (ب) جدایه‌های قارچ. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری از نظر آزمون توکی ($P < 0.05$) می‌باشد.

۹۹/۶۴ درصد به ترتیب متعلق به *Talaromyces stipitatus* و *Talaromyces minioluteus* بودند. در مطالعه‌ای در کشور کره بر روی پریفایتون‌های تشکیل شده در دریا گونه *Bacillus macrolides* شناسایی شد (لی و همکاران، ۲۰۰۳). لی و همکاران (۲۰۱۶) عنوان کردند که جنس *Acinetobacteria* ۲/۳-۰/۱ درصد از جمعیت باکتری‌های بیوفیلم تشکیل شده در دریا را تشکیل می‌دهند. لاوادی و همکاران (۲۰۱۷) در جزایر فیلیپین عنوان کردند که *Aspergillus* و *Penicillium* از جنس‌های اصلی تشکیل دهنده توده پریفایتون هستند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر باکتری و قارچ

جدول ۴ نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر باکتری و قارچ را نشان می‌دهد. جدایه 13B25، باکتری گرم مثبت و صورت کلنی شیرینی رنگ و خشک و با حاشیه نامنظم ظاهر شد شباهت ۹۹/۸۶ درصدی با *Bacillus cereus* داشت. باکتری گرم منفی و کرم رنگ با حاشیه صاف و کد 6B11 شباهت ۹۹/۵۷ درصد به جنس و گونه *Acinetobacter Calcoaceticus* نشان داد. جدایه قارچی 8F12 با ۹۹/۸۲ درصد و جدایه قارچی 6F9 با

جدول ۴- باکتری‌ها و قارچ‌های برتر شناسایی شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA و ژن ITS

شماره سویه	شماره دسترسی	نزدیک‌ترین سویه	شباهت (%)
13B25	MW404643	<i>Bacillus cereus</i>	۹۹/۸۶
6B11	MW404644	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۹۹/۵۷
6F9	MW405459	<i>Talaromyces minioluteus</i>	۹۹/۶۴
8F12	MW405460	<i>Talaromyces stipitatus</i>	۹۹/۸۲

نتیجه‌گیری کلی

از نظر ویژگی‌های محرک رشد گیاه است. بر اساس یافته‌های این پژوهش جدایه‌های باکتری و قارچ جدا شده از لایه زیستی پریفایتون توانایی بالایی در انحلال فسفر دارند. همچنین این جدایه‌ها از خصوصیات محرک رشد گیاه مانند توان تولید سیدروفور و ایندول استیک اسید بالایی برخوردارند. نتایج نشان داد که دو سویه باکتری 13B25 و 6B11 که به ترتیب *Bacillus cereus* و

پریفیتیک بیوفیلم یک لایه زیستی است که متشکل از ریزجانداران فتوتروف و هتروتروف بوده و می‌تواند به صورت یک میکروبیوم در کنار یکدیگر در زمین‌های غرقابی مانند شالیزارها تشکیل شود. این مطالعه نخستین گزارش در مورد پتانسیل این لایه زیستی تشکیل شده در شالیزارها و اجزای باکتری و قارچ آن

شدند. با توجه به نتایج مربوط به باکتری‌ها و قارچ‌ها از اجزاء پریفایتون، پیشنهاد می‌شود که این سویه‌ها در پژوهش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بیشتر مورد مطالعه قرارگیرند و امید است که گام جدید و مهمی در راستای تولید کودهای زیستی در رسیدن به کشاورزی پایدار از طریق مدیریت چرخه عناصر غذایی در شالیزارها باشد. هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

Acinetobacter calcoaceticus بودند توانایی بالایی در انحلال فسفر و همچنین تولید سیدروفور و ایندول استیک اسید داشتند. در میان جدایه‌های قارچ دو سویه 6F9 و 8F12 که به ترتیب *Penicillium minioluteu* و *Talaromyces stipitatus* بودند از توانایی‌های محرک رشد گیاه بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها برخوردار بودند. ریزجانداران با تولید اسیدهای آلی مختلف مانند گلوکونیک اسید، ۲-کتوگلوکونیک اسید و مالیک و اگزالیک اسید منجر به انحلال فسفات نامحلول در خاک

منابع مورد استفاده

- Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, Navia M and Romero HM, 2014. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology* 80: 26-33.
- Adhikari P and Pandey A, 2019. Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. *Roots. Rhizosphere* 9: 2-9.
- Anonymous, 2008. Methodology for the Measurement of Food Deprivation: Updating the minimum dietary energy requirements. FAO: Rome.
- Arvieu JC, Leprince F and Plassard C, 2003. Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of Forest Science* 60: 815-821.
- Awais M, Tariq M, Ali A, Ali Q, Khan A, Tabassum B, Nasir IA and Husnain T, 2017. Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 11: 312-321.
- Azim M, 2009. Photosynthetic Periphyton and Surfaces. *Encyclopedia of Inland Waters*, Academic Press.
- Banik S and Dey B, 1983. Phosphate-solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. *Zentralblatt fuer Mikrobiologie* 138: 17-23.
- Bar-Yosef B, Rogers R, Wolfram J and Richman E, 1999. *Pseudomonas cepacia*-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Science Society of America Journal* 63: 1703-1708.
- Bose A, Shah D and Keharia H, 2013. Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* under submerged condition of *Jatropha seedcake*. *Mycology* 4: 103-111.
- Carpenter SR, 2008. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11039-11040.
- Chaiharn M and Lumyong S, 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 305-314.
- Chaiharn M and Lumyong S, 2011. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current Microbiology* 62: 173-181.
- Chaiharn M, Chunchaleuchanon S and Lumyong S, 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1919-1928.
- Chauhan BS, Jabran K and Mahajan G, 2017. *Rice Production Worldwide*. Springer.
- Cho M, Jang T, Jang JR and Yoon CG, 2016. Development of agricultural non-point source pollution reduction measures in Korea. *Irrigation and Drainage* 65: 94-101.
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA and Aguilar OM, 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46: 727-738.

- Delvasto P, Valverde A, Ballester A, Munoz J, González F, Blázquez M, Igual J and García-Balboa C, 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy* 92: 124-129.
- Ellwood NT, Di Pippo F and Albertano P, 2012. Phosphatase activities of cultured phototrophic biofilms. *Water Research* 46: 378-386.
- Emami S, Alikhani HA, Pourbabaei AA, Etesami H, Motashare Zadeh B and Sarmadian F, 2018. Improved growth and nutrient acquisition of wheat genotypes in phosphorus deficient soils by plant growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. *Soil Science and Plant Nutrition* 64: 719-727.
- Farhat MB, Farhat A, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, Antoun H, Bejar S and Chouayekh H, 2009. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Archives of Microbiology* 191: 815-824.
- Goldstein AH, 2007. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility, Pp. 91-96, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Springer.
- Goldstein AH, Rogers RD and Mead G, 1993. Mining by microbe. *Bio/Technology* 11: 1250-1254.
- Gronewold AD and Wolpert RL, 2008. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. *Water Research* 42: 3327-3334.
- Gulati A, Sharma N, Vyas P, Sood S, Rahi P, Pathania V and Prasad R, 2010. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology* 192: 975-983.
- Henri F, Laurette NN, Annette D, John Q, Wolfgang M, Francois-Xavier E and Dieudonne N, 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research* 2: 171-178.
- Huang Nb, Su BL, Li RR, Yang WZ and Shen MM, 2014. A field-scale observation method for non-point source pollution of paddy fields. *Agricultural Water Management* 146: 305-313.
- Inglett P, Reddy K and McCormick P, 2004. Periphyton chemistry and nitrogenase activity in a northern Everglades ecosystem. *Biogeochemistry* 67: 213-233.
- Jayashree S, Vadivukkarasi P, Anand K, Kato Y and Seshadri S, 2011. Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate solubilization. *Archives of Microbiology* 193: 543-552.
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR and Fields MW, 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3832-3845.
- Jurinak J, Dudley L, Allen M and Knight W, 1986. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: a thermodynamic study. *Soil Science* 142: 255-261.
- Karaffa L and Kubicek CP, 2003. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 189-196.
- Lavadia M, Dagamac N and de la Cruz T, 2017. Diversity and biofilm inhibition activities of algicolous fungi collected from two remote islands of the *Philippine archipelago*. *Current Research on Environment and Applied Mycology* 7: 309-321.
- Lee YK, Kwon KK, Cho KH, Kim HW, Park JH and Lee HK, 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *The Journal of Microbiology* 41: 183-188.
- Lee YM, Cho KH, Hwang K, Kim EH, Kim M, Hong SG and Lee HK, 2016. Succession of bacterial community structure during the early stage of biofilm development in the Antarctic marine environment. *Korean Journal of Microbiology* 52: 49-58.
- Li Z, Bai T, Dai L, Wang F, Tao J, Meng S, Hu Y, Wang S and Hu S, 2016. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports* 6: 1-8.
- Lim HS, Lee JM and Kim SD, 1999. Role of siderophore in biological control of *Fusarium solani* by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology* 47-58.
- Lin TF, Huang HI, Shen FT and Young CC, 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology* 97: 957-960.
- Liu J, Liu W, Wang F, Kerr P and Wu Y, 2016. Redox zones stratification and the microbial community characteristics in a periphyton bioreactor. *Bioresource Technology* 204: 114-121.

- Liu J, Wu Y, Wu C, Muylaert K, Vyverman W, Yu HQ, Muñoz R and Rittmann B, 2017. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: a review. *Bioresource Technology* 241: 1127-1137.
- Lu H, Feng Y, Wu Y, Yang L and Shao H, 2016a. Phototrophic periphyton techniques combine phosphorous removal and recovery for sustainable salt-soil zone. *Science of the Total Environment* 568: 838-844.
- Lu H, Liu J, Kerr PG, Shao H and Wu Y, 2017. 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.
- Lu H, Wan J, Li J, Shao H and Wu Y, 2016b. Periphytic biofilm: A buffer for phosphorus precipitation and release between sediments and water. *Chemosphere* 144: 2058-2064.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP and Meena RS, 2016. Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture, Springer.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Aeron A, Kumar A, Kim K and Bajpai VK, 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering* 81: 340-347.
- Mehnaz S and Lazarovits G, 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51: 326-335.
- Moor H, Rydin H, Hylander K, Nilsson MB, Lindborg R and Norberg J, 2017. Towards a trait-based ecology of wetland vegetation. *Journal of Ecology* 105: 1623-1635.
- Park KH, Lee OM, Jung HI, Jeong JH, Jeon YD, Hwang DY, Lee CY and Son HJ, 2010. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 947-955.
- Patten CL and Glick BR, 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Patten CL and Glick BR, 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- Paul N and Rao WS, 1971. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and Soil* 35: 127-132.
- Peek ME, Bhatnagar A, McCarty NA and Zughaier SM, 2012. Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades NGAL recognition. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- Plassard C, Louche J, Arif Ali M, Sauvage FX, Legname E and Duchemin M, 2009. Ectomycorrhizal fungi and mobilisation of organic phosphorus from forest soil: Novel data and actual role. *Geochimica et Cosmochimica Acta Supplement* 73: A1033.
- Qiao J, Yang L, Yan T, Xue F and Zhao D, 2012. Nitrogen fertilizer reduction in rice production for two consecutive years in the Taihu Lake area. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 146: 103-112.
- Rajput MS, Iyer B, Pandya M, Jog R, Kumar N and Rajkumar S, 2015. Derepression of mineral phosphate solubilization phenotype by insertional inactivation of *iclR* in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS one* 10.
- Rajput MS, Kumar GN and Rajkumar S, 2013. Repression of oxalic acid-mediated mineral phosphate solubilization in rhizospheric isolates of *Klebsiella pneumoniae* by succinate. *Archives of Microbiology* 195: 81-88.
- Rodríguez H and Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- Saharan B and Nehra V, 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 30.
- Schwyn B and Neillands J, 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Shahab S, Ahmed N and Khan NS, 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research* 4: 1312-1316.
- Shanware AS, Kalkar SA and Trivedi MM, 2014. Potassium solubilizers: occurrence, mechanism and their role as competent biofertilizers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 622-629.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH and Gobi TA, 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2(1): 587.

- Singh S, James A and Bharose R, 2017. Biological assessment of water pollution using periphyton productivity: A Review. *Nature Environment & Pollution Technology* 16.
- Su J, Kang D, Xiang W and Wu C, 2017. Periphyton biofilm development and its role in nutrient cycling in paddy microcosms. *Journal of Soils and Sediments* 17: 810-819.
- Takashi S and Anwar M, 2007. Wheat grain yield, phosphorous uptake and soil phosphorous fraction after 23 years of annual fertilizer application to an Andosol. *Field Crops Research* 101: 160-171.
- Viruel E, Lucca ME and Sñeriz F, 2011. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology* 193: 489-496.
- Wu Y, 2013. The studies of periphyton: From waters to soils. *Hydrology: Current Research* 4: e107.
- Wu Y, Liu J, Lu H, Wu C and Kerr P, 2016. Periphyton: an important regulator in optimizing soil phosphorus bioavailability in paddy fields. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 21377-21384.
- Yamamoto M, Horie M, Fukushima M and Toyotome T, 2019. Culture-based analysis of fungi in leaves after the primary and secondary fermentation processes during Ishizuchi-kurocha production and lactate assimilation of *P. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology* 306: 108263.
- Yang J, Tang C, Wang F and Wu Y, 2016. Co-contamination of Cu and Cd in paddy fields: Using periphyton to entrap heavy metals. *Journal of Hazardous Materials* 304: 150-158.
- Yin Z, Shi F, Jiang H, Roberts DP, 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: 913-923.
- Zhang B, Shi YT, Liu JH and Xu J, 2017. Economic values and dominant providers of key ecosystem services of wetlands in Beijing, China. *Ecological Indicators* 77: 48-58.
- 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.
- Zou X, Binkley D and Doxtader KG, 1992. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil* 147: 243-250.