

## Research Article

# The Effect of Natural and Enriched Periphyton by Plant Growth Promoting Microorganisms on Rice Growth Indices in a Greenhouse Experiment

HA Alikhani<sup>1\*</sup>, M Beheshti<sup>2</sup>, AA Pourbabaee<sup>3</sup>, H Etesami<sup>4</sup>, H Asadi Rahmani<sup>5</sup>,

M Noroozi<sup>6</sup>

Received: June 26, 2022

Accepted: September 5, 2022

Received in Revised: September 3, 2022

Published online: September 23, 2023

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

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

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

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

5- Prof., of Soil and Water Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

6- Assoc. Prof., Dept. of Biotechnology faculty of biological sciences Alzahra University, Iran.

\*Corresponding Author, Email: halikhan@ut.ac.ir

## Abstract

### Background and Objectives:

Traditionally, most researches on artificial wetlands focuses only on two phases, i.e., water and soil, ignoring or underestimating the importance of the microbial aggregates between them, the third phase in artificial wetlands. Filamentous algae grow substantially by attaching themselves to the soil/sediment surface and form aggregates with bacteria, fungi, and other micro- and meso-organisms (e.g., protozoa and metazoa), known as periphytic biofilms. Actually, periphytic biofilms are ubiquitous in wetlands (including paddy fields) and play a major role in regulating nutrient cycling in these ecosystems. However, their effects on rice plant growth indices have been rarely reported. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of natural periphyton and enriched periphyton with plant growth-promoting microorganisms on germination and rice growth indices.

### Methodology

To achieve the objectives of this study, first three periphyton samples were collected from paddy fields of Guilan province and grown in BG11 medium in the laboratory. Then, the superior bacteria and fungi that stimulated plant growth were isolated from the periphyton mass and the periphyton samples were enriched with these microorganisms. The greenhouse experiment was conducted in 1399 in the research greenhouse of the Department of Soil Science and Engineering, University of Tehran. For this purpose, 2.5 kg pots with a length of 25 cm and a diameter of 15 cm were selected for greenhouse experiments. Twenty rice seeds (*Oryza Sativa*: cultivar Hashemi) were placed directly in pots in three replications for each treatment. About 100 mL of natural periphyton suspension grown in BG11 medium (equivalent to 2 g/kg dry weight) and periphyton enriched with superior bacteria and fungi and a mixture of bacteria + fungi was added to the pots. Experimental treatments included WP treatment: without periphyton, PN1 epipelton 13, PN2 epiphyton 8 and PN3 epipelton 6, PN1 + *Bacillus cereus*, PN2 + *Talaromyces stipitatus* and PN3 + *Acinetobacter calcoaceticus* + *Talaromyces minioluteus*. Also, phosphorus fertilizer treatment at four levels (F0: without phosphorus fertilizer, F1: supply of 50% of phosphorus fertilizer from mono calcium phosphate source, F2: supply of 100% of mono calcium phosphate and F3: supply of 100% of rock phosphate source) was added to the pots.



The treatments were grown in three replications in a greenhouse with a temperature between 25–35 °C for 30 days in 80 percent humidity.

### Findings

The results showed that the presence of natural and enriched periphyton in the soil increased the germination index of rice seeds compared to the control by about 1.4 and 1.9 times, respectively. The rice seedlings decreased by about 10 percent with the presence of natural periphyton, but this negative effect was lowered by enrichment of plant growth promoting microorganisms. Measurement of rice seedling height index showed that the highest measured height was related to the treatment of periphyton enriched with *Bacillus cereus* (PSB) at F2 level of 39 cm. In general, in natural periphyton treatments, about 15 percent of the height of rice shoots was lower than the control treatment and periphyton treatments enriched with superior microorganisms. The maximum measured root length was related to the treatment of recombinant periphyton with *Bacillus cereu* (PSB) with 16.95 cm. The lowest root length was measured in natural periphyton treatment (PN3) with 11.5 cm. The highest shoot to root ratio was related to periphyton treatment enriched with *Bacillus cereus* at F2 and F3 fertilizer levels with 0.7 and 0.68, respectively, with a statistically significant difference at level 95 percentage ( $p < 0.05$ ) compared to other treatments. The maximum weight of rice biomass in periphyton enriched with *Bacillus cereus* (PSB) treatment, which was the enriched with plant growth promoting bacterium, was measured at F2 and F3 fertilizer levels with 8.7 and 8.3 g, respectively. In general, measurement of rice seedling height, root length, biomass weight and phosphorus in shoots showed that treatment of enriched periphyton with *Bacillus cereus* at different levels of phosphorus fertilizer had a positive effect and led to an increase of 3.5, 9.4, 6.1, and 35.8 percent compared to the control treatment, respectively.

### Conclusion

Finally, it can be concluded that periphyton enriched with superior plant growth microorganisms can be used as a multi-functional biofertilizer in paddy fields, it increases plant growth and efficiency of fertilizer, and it can also control weeds in paddy fields.

**Keywords:** Epipelon, Epiphyton, Germination index, Periphytic biofilm, Vital index.

## مقاله پژوهشی

# اثر پریفایتون طبیعی و غنی‌شده با ریزجاندارن محرک رشد گیاه بر شاخص‌های رشد گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای

حسینعلی علیخانی<sup>۱\*</sup>، مهدی بهشتی<sup>۲</sup>، احمد علی پوربابایی<sup>۳</sup>، حسن اعتصامی<sup>۴</sup>، هادی اسدی رحمانی<sup>۵</sup>

مصطفی نوروزی<sup>۶</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴

تاریخ دریافت و ویرایش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۲

تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۷/۱

۱- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

۲- دانش آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

۴- دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

۵- استاد، موسسه تحقیقات خاک و آب ایران-سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا(س)

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

## چکیده

پریفایتون یک لایه زیستی است که در اراضی غرقاب به ویژه شالیزارها به طور گسترده پراکنده بوده و نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی در این زیست‌بوم‌ها ایفا می‌نماید. با این حال، تأثیر آن بر شاخص‌های رشد گیاه برنج (*Oryza Sativa*) به ندرت گزارش شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر پریفایتون‌های طبیعی شالیزارهای استان گیلان و همچنین غنی‌شده با ریزجاندارن برتر محرک رشد گیاه که از همان پریفایتون‌ها جداسازی شده‌اند بر ویژگی‌های رشدی گیاه برنج، طراحی و اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار WP بدون پریفایتون، تیمار PN1 اپی‌پلون ۱۳، PN2 اپی‌فایتون ۸ و PN3 اپی‌پلون ۶، تیمار *Bacillus cereus* + PN1، تیمار *Talaromyces stipitatus* + PN2 و تیمار PN3 + *Talaromyces minioluteus* + *Acinetobacter calcoaceticus* بودند. همچنین تیمار کود فسفردر چهار سطح (F0: بدون کود فسفر، F1: تأمین ۵۰ درصد کود فسفر از منبع مونو کلسیم فسفات، F2: تأمین ۱۰۰ درصد از مونو کلسیم فسفات و F3: تأمین ۱۰۰ درصد از منبع خاک فسفات) بود که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل اجرا شد. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور پریفایتون طبیعی در خاک، شاخص جوانه‌زنی بذور برنج را ۱/۴ برابر و پریفایتون غنی شده ۱/۹ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند. شاخص زنده‌مانی گیاهچه‌های برنج با کاربرد پریفایتون طبیعی حدود ۱۰ درصد کاهش نشان داد ولی با غنی کردن آن با ریزجاندار محرک رشد گیاه این اثر منفی کاهش یافت و مانند تیمار شاهد شد. تیمار پریفایتون غنی‌شده با باکتری برتر محرک رشد گیاه *Bacillus cereus* در سطوح مختلف کود فسفر شاخص ارتفاع گیاهچه‌های برنج (۳/۵٪)، طول ریشه (۹/۴٪)، وزن زیست‌توده گیاهچه‌های برنج (۶/۱٪) و فسفر شاخساره (۳۵/۸٪) را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. در نهایت با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت، از پریفایتون غنی شده با

ریزجاندارن برتر محرک رشد گیاه می‌توان به عنوان یک کود زیستی چند منظوره در شالیزارها استفاده نمود که به رشد بهتر گیاه کمک می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** اپی‌پلون، اپی‌فایتون، شاخص جوانه‌زنی، شاخص زنده مانی، لایه زیستی پریفایتون.

## مقدمه

با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در صنعت کشاورزی، به دلیل افزایش چشمگیر جمعیت و محدود بودن منابع خاک، آب و سایر منابع طبیعی، محدودیت دسترسی به غذا و تغذیه‌ی مناسب همچنان به عنوان محسوس‌ترین و شدیدترین شکل فقر در سرتاسر جهان شناخته می‌شود (ساسلاستیوتی ۲۰۱۸). برنج بعد از گندم مهم‌ترین محصول زراعی و غذای بیش از نیمی از مردم جهان است و برای رسیدن به امنیت غذایی، ضروری است (علی و همکاران ۲۰۲۰). سطح زیرکشت برنج بعد از گندم در رتبه دوم قرار داشته ولی از نظر کالری تولیدی، ارزش آن بیشتر از سایر غلات می‌باشد (زیارتی و عزیز ۲۰۱۴). امروزه با توجه به کم شدن سطح زیر کشت، تقاضا و میل برای افزایش و بالا بردن سطح تولید بیشتر شده و دست یافتن به چنین هدفی با تغذیه مناسب گیاه و افزایش کارایی مصرف کود امکان‌پذیر است. کود به عنوان یکی از عوامل محدود کننده رشد می‌باشد و مصرف بهینه آن نقش کلیدی در افزایش عملکرد برنج ایفاء می‌کند. علی رغم آن که استفاده از کودهای شیمیایی در سه دهه گذشته موفقیت‌های چشمگیری را در افزایش محصولات کشاورزی مخصوصاً برنج داشته ولی به دلیل عدم رعایت مصرف متعادل کود و نیز عدم توجه به مسائل زیست محیطی اثرات نامطلوبی بر جای گذاشته است (تیواری ۲۰۰۱). تولید پایدار برنج به ویژگی‌های فیزیکی محیط رشد، تغییرات آب و هوایی، جمعیت میکروبی و جریان بهینه مواد غذایی ضروری در خاک و آب بستگی دارد (کیاو و همکاران ۲۰۱۲). عموماً، بیشتر تحقیقات در زمین‌های غرقاب مصنوعی مانند شالیزارها تنها بر دو فاز آبی و خاکی متمرکز شده است و اهمیت جامعه میکروبی بین آن‌ها به عنوان سومین فاز نادیده گرفته می‌شود (لو و همکاران ۲۰۱۷). لایه‌ی زیستی پرفایتون<sup>۱</sup>

از انواع مختلفی از ریزجانداران از جمله باکتری‌ها، جلبک‌ها، قارچ‌ها، پروتوزا و متازوا تشکیل شده که در زیست‌بوم‌های آبی به طور گسترده رشد می‌کند (لیو و همکاران ۲۰۱۷؛ وو و همکاران ۲۰۱۶). شالیزارها قادرند تا یک محیط مناسب برای تشکیل و رشد پرفایتون به ویژه از نظر تأمین نور، آب، دما و عناصر غذایی فراهم آورند (کاسای ۱۹۹۹). پرفایتون به عنوان یک جامعه زیستی که عمدتاً از فتواتوتروف‌ها تشکیل شده است، می‌تواند مقدار زیادی از مواد غذایی را جذب کند، آنزیم‌های خارج سلولی مختلفی تولید کند و pH و شرایط ریداکس را از طریق مصرف دی‌اکسید کربن و آزادسازی اکسیژن در طی فرایند فتوسنتز تغییر دهد (الوود و همکاران ۲۰۱۲؛ لیو و همکاران ۲۰۱۶). بنابراین، پرفایتون می‌تواند جذب مواد غذایی معدنی را افزایش دهد، به عنوان یک مخزن موقت عمل کند و آزاد سازی پایدار عناصر غذایی در خاک را فراهم کند و بر چرخه نیتروژن (از طریق تثبیت نیتروژن، تصعید آمونیاک، نیترات‌سازی و نیترات‌زدایی مدیریت شده)، فسفر و پتاسیم مؤثر باشد (لو و همکاران ۲۰۱۷، وو و همکاران ۲۰۱۶). با این حال، رشد پرفایتون در شالیزارها در جذب مواد غذایی با برنج رقابت می‌کند و باعث تسریع در تخلیه عناصر غذایی از خاک می‌شود (لو و همکاران ۲۰۱۷). مطالعه‌ای که توسط وزارت کشاورزی چین انجام شد نشان داد که کارایی مصرف فسفر در شالیزارها تنها ۲۰-۱۰ درصد بود. آزادسازی فسفر از خاک به آب سطحی و هدر رفت آن و در مقابل کاهش زیست فراهمی فسفر (از طریق تشکیل شکل‌های مختلف فسفات‌های نامحلول) از عواملی هستند که باعث تقلیل کارایی مصرف فسفر در شالیزارها می‌شود (لو و همکاران ۲۰۱۷، وو و همکاران ۲۰۱۶). تقسیم‌بندی انواع پرفایتون معمولاً بر اساس سطح بستر تشکیل آن‌ها انجام می‌گیرد. برای مثال، اپی‌پلون‌ها پرفایتون‌هایی هستند که بر سطح خاک و اپی‌فایتون‌ها، پرفایتون‌هایی

<sup>1</sup> Periphytic biofilm

برای مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. دو جدایه باکتری برتر و دو جدایه قارچ برتر بر اساس ویژگی‌های محرک رشد گیاه که از توده این پریفایتون‌ها جداسازی شده بودند برای آزمون گلخانه‌ای و تهیه پریفایتون غنی‌شده مورد استفاده قرار گرفتند.

### تکثیر نمونه‌های پریفایتون طبیعی

برای کشت نمونه‌های پریفایتون به منظور تکثیر، ۱۰ گرم از توده پریفایتون را برداشته و به باریل ۱ لیتری حاوی محیط کشت BG11 (۲۰ میلی‌گرم در  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ، ۱۵۰ میلی‌گرم  $\text{NaNO}_3$ ، ۴۰ میلی‌گرم  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ، ۷۵ میلی‌گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۶ میلی‌گرم  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۴/۹۴ میلی‌گرم  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۸۶ میلی‌گرم  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ، ۱/۸۱ میلی‌گرم  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، عناصر غذایی کم مصرف: ۰/۲۲ میلی‌گرم  $\text{ZnSO}_4$ ، ۰/۳۹ میلی‌گرم  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ، ۰/۰۷۹ میلی‌گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  و ویتامین‌ها: ۰/۱۳ میلی‌گرم  $\text{B}_{12}$ ، ۰/۳۳ میلی‌گرم تیامین، ۰/۰۲ میلی‌گرم بیوتین در یک لیتر آب مقطر) اضافه نموده و حامل‌های سلولزی (با ابعاد  $2 \times 2$  سانتی‌متر) ضدعفونی شده به محیط اضافه گردید. ظروف حاوی پریفایتون در فیتوترون شبیه سازی شده با محیط در دوره نوری/تاریکی ۱۴ ساعت، دمای  $26^\circ\text{C}$  و شدت نور ۱۲۰۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد به مدت ۱ ماه نگهداری شدند. بعد از ۱ ماه، ریزجانداران بومی بر روی سطح حامل‌های سلولزی تشکیل شدند. به منظور هوادهی نمونه‌ها، درب باریل به صورت نیمه بسته بود و به صورت روزانه با دست تکان داده شدند می‌شدند (لو و همکاران ۲۰۱۶).

### مطالعات میکروسکوپی اجزای اتوتروف پریفایتون طبیعی

برای مطالعات میکروسکوپی، ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط کشت‌های جامد ( $\text{BBM-agar}^4$ ، BG11 و

هستند که در سطح ساقه گیاه برنج در شالیزارها تشکیل می‌شوند (مارتین ۲۰۱۹). میکروفلور محرک رشد گیاه با سازوکارهای مختلفی مانند انحلال فسفات‌های نامحلول (منا و همکاران ۲۰۱۶؛ رودریگز و فراگا ۱۹۹۹)، تولید فیتوهورمون‌ها مانند ایندول استیک اسید<sup>۱</sup> (IAA) (مهناز و لازارویتز ۲۰۰۶؛ پاتن و گلیک ۲۰۰۲) و ترشح سیدروفور (چاپهارن و همکاران ۲۰۰۹؛ لیم و همکاران ۱۹۹۹) به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند. تاکنون پتانسیل محرک رشد ریزجانداران مختلف مانند باکتری و قارچ در لایه زیستی پریفایتون مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین، افزایش زیستی جمعیت ریزجانداران محرک رشد گیاه به لایه پریفایتون می‌تواند به مدیریت مصرف کود فسفر و به رشد بهتر گیاه برنج کمک کند. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی اثر پریفایتون‌های طبیعی و پریفایتون‌های غنی‌شده با باکتری، قارچ و مخلوط باکتری+ قارچ بر جوانه‌زنی بذور و شاخص‌های رشد گیاهچه‌های برنج در شرایط گلخانه‌ای بود.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

نمونه‌های پریفایتون انتخاب شده برای این مطالعه شامل دو نمونه اپی‌پلون پریفایتون (LON-6 و LON-13) و یک نمونه اپی‌فایتون (TON-8) بود که از مزارع شالیزاری استان گیلان در سال ۱۳۹۹ نمونه‌برداری شدند. برای نمونه‌برداری به وسیله کاردک ضدعفونی شده نمونه پریفایتون برداشت و به درون ظروف ضدعفونی شده منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل گردید (یانگ و همکاران ۲۰۱۶). به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها و قارچ‌ها از نمونه‌های پریفایتون، پس از تهیه سری‌های رقت، کشت سطحی به ترتیب بر روی محیط کشت‌های عمومی  $\text{NA}^2$  و  $\text{PDA}^3$  انجام شد. نمونه‌ها پیش از کشت

<sup>3</sup> Potato Dextrose Agar

<sup>4</sup> Bold's Basal Medium

<sup>1</sup> Indole Acetic Acid

<sup>2</sup> Nutrient Agar

۰/۲۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲/۵ گرم  $Ca_3(PO_4)_3$  در لیتر و با pH ۷/۲) استفاده شد و ارلن‌ها بعد از تلقیح با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (۲ جدایه باکتری و ۲ 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 سانتریفیوژ 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 وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unique UV/VIS 2100, Chine) 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  $KH_2PO_4$  محاسبه گردید. در این مرحله pH محلول نیز با دستگاه pH-متر (EYELA meter, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری گردید (چایهارن و لومیونگ ۲۰۰۹).

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

برای اندازه‌گیری توان تولید IAA از روش گلیک و پاتن (۱۹۹۶) استفاده شد. جدایه‌های باکتری و قارچ در محیط  $LB^2$  بدون و با ال-تریپتوفان ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیون‌ها در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون فیلتر (با صافی استریل ۰/۲۲ میکرون) شده را با ۲ میلی-لیتر معرف سالکوفسکی<sup>۳</sup> (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 اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی

(F/2<sup>1</sup>) داخل ظروف پتری ضد عفونی شده هشت سانتی-متری قرار داده شد. از هر کدام از نمونه‌های پریفایتون سری‌های رقت تا  $10^{-6}$  را با استفاده از آب مقطر درست کرده و از هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلیر برداشته و وسط هر ظرف پتری ریخته و با استفاده از میله شیشه‌ای استریل پخش گردید و دور پلیت‌ها با پارافیلیم درزگیری شد، سپس ظروف پتری کشت شده به اتاق فیتوترون انتقال داده شدند. بعد از حدود ۲۰ روز نمونه‌های جلبک، دیاتوم و سیانوباکتری بر روی پلیت‌ها رشد کرده و ظاهر شدند. بعد از رشد این اجزا بر روی هر ظرف پتری، تک کلنی‌ها را برداشته (هر تک کلنی که با بقیه از نظر رنگ، اندازه، شکل و غیره فرق داشته باشد) و به ظرف پتری دیگر منتقل کرده و به این ترتیب جداسازی و خالص‌سازی صورت گرفت. تک کلنی‌های جلبک به محیط کشت جامد BBM، سیانوباکتری به محیط کشت جامد BG11 و دیاتوم به محیط کشت F/2 منتقل شدند (یانگ و همکاران ۲۰۱۶). پس از خالص‌سازی اجزای پریفایتون، مطالعات میکروسکوپی از نمونه‌های جلبک، سیانوباکتری و دیاتوم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ انجام و عکس‌برداری صورت گرفت. شناسایی نمونه‌های جلبک، سیانوباکتری و دیاتوم با استفاده از کلیدهای رده‌بندی (وهر و همکاران ۲۰۱۵؛ اسکولبرگ و همکاران ۱۹۹۳) انجام شد. در نهایت، درصد اجزای اتوتروف مختلف از طریق شمارش تعداد ۳۰۰ کلنی در زیر میکروسکوپ در نمونه‌ها محاسبه گردید.

### آزمون کمی توان انحلال فسفات نامحلول معدنی و تغییر pH محیط کشت

در این مرحله برای بررسی توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های انتخاب شده (باکتری و قارچ)، از ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر مایع (۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم  $CaCl_2$ ،

<sup>3</sup> Salkowsky reagent

<sup>1</sup> Gillard

<sup>2</sup> Luria-Bertani

برای ۱ دقیقه و گسترش<sup>۴</sup> در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد (w/v) و رنگ آمیزی شده با DNA Safe Stain، در بافر (1X) TBE (۰/۰۹ M Tris base)، ۰/۰۹ sodium borate، ۰/۰۹ mM EDTA (pH=۸) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت انجام شد. سپس ژل با استفاده از دستگاه ژل داگ Alpha Imager (TM1200) تحت نور UV نمایان شده و تصویر ژل ثبت گردید. مقایسه باند تکثیر شده از یک نشانگر DNA با اندازه ۱۵۰۰ جفت باز (bp<sup>۵</sup>)، تکثیر بخش مورد نظر ژنوم را نشان داد. پس از انتخاب دو جدایه برتر قارچ بر اساس ویژگی‌ها محرک رشد گیاه، جدایه‌ها در محیط کشت PDA کشت داده شده و در تاریکی به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. DNA جدایه‌ها با استفاده از روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) استخراج گردید. در این مطالعه، ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریپوزمی (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 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' انجام شد. برنامه PCR برای تکثیر DNA دو جدایه قارچ بدین صورت تنظیم شد: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سلسیوس، ۴۲ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس، ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (اسپاگنولتی و همکاران ۲۰۱۷). محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA باکتری و ناحیه ITS قارچ با استفاده از کیت خالص‌سازی شده و به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی سویه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح

کالیبراسیون از مقادیر ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر لیتر IAA در محیط کشت فیلتر شده به عنوان استاندارد استفاده شد. برای اندازه‌گیری توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها از روش نیلندز و شیوون (۱۹۷۸) و محیط CAS-Agar استفاده شد و بر اساس شاخص نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) جدایه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

### شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر

جدایه‌های برتر باکتری از نظر ویژگی‌های محرک رشد گیاه 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 شیک شدند. به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) به طور جداگانه برای باکتری-های گرم مثبت و منفی استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی رمز کننده 16S rRNA از آغازگرهای عمومی (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1492R (3'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید (جیانگ و همکاران ۲۰۰۶). تکثیر با استفاده از یک ترموسایکلر GTC96S<sup>۱</sup> در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۰/۴ میکرولیتر DNA نمونه (۵۰ μgml<sup>-1</sup>)، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر 10X [۵۰ mM KCl، ۵۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM NP40 (V/V) ۰/۰۵ درصد و Triton X-100 (v/v) ۰/۰۵ درصد]، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۰/۰۵ درصد)، ۰/۲ (۱۰ pmol)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۵ U μl<sup>-1</sup>) Taq DNA polymerase (CinnaGen Co., Ltd. Iran) و ۱۹/۹ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر انجام شد. شرایط انجام PCR به صورت زیر تنظیم گردید: واسرشت اولیه<sup>۲</sup> در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، اتصال<sup>۳</sup> در ۵۵ درجه سلسیوس

<sup>۴</sup> Extension

<sup>۵</sup> Base pair

<sup>۱</sup> Cleaver Scientific Ltd.

<sup>۲</sup> Initial denaturation

<sup>۳</sup> Annealing



باکتری و ۲ سویه قارچ همدردیفی انجام شد (تامورا و همکاران ۲۰۰۷). 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<sup>۱</sup> برای هر یک از آن‌ها به دست آمد.

شده و یک توالی کانتیگ برای هر سویه بدست آمد. سپس این توالی‌های کانتیگ در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند. تعداد مناسبی از توالی‌های ژن 16S rRNA برای هر کدام از دو سویه باکتری از طریق این پایگاه انتخاب و سپس به کمک نرم-افزار MEGA 5.1 بین این توالی‌ها و توالی‌های ۲ سویه

جدول ۱- شماره دسترسی جدایه برتر ثبت شده در سایت NCBI و درصد شباهت با سویه‌های احتمالی.

| تیمار     | نام سویه | شماره دسترسی | سویه احتمالی                       | درصد شباهت |
|-----------|----------|--------------|------------------------------------|------------|
| باکتری ۱۳ | 13BP25   | MW404643     | <i>Bacillus cereus</i>             | ۹۹/۸۶      |
| قارچ ۸    | 8FP12    | MW405460     | <i>Talaromyces stipitatus</i>      | ۹۹/۸۲      |
| باکتری ۶  | 6BP11    | MW404644     | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ۹۹/۵۷      |
| قارچ ۶    | 6FP9     | MW405459     | <i>Talaromyces minioluteus</i>     | ۹۹/۱       |

در نهایت، و هیچ اثر آنتاگونیستی بین آن‌ها مشاهده نشد. نمونه‌ها به مدت ۳ روز در فیتوترون نگهداری و پس از به تعادل رسیدن برای انجام آزمون گلخانه‌ای استفاده شدند. شایان ذکر است، نمونه‌های پریفایتون از قبل در محیط BG11 در باریل یک لیتری به مدت ۱ ماه رشد داده شده بودند.

#### آزمون گلخانه‌ای برنج

##### الف) کشت بذور و اعمال تیمارها

آزمون گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران انجام شد. برای این منظور، گلدان‌های ۲/۵ کیلوگرمی با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۱۵ سانتی‌متر برای آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند. نمونه خاک (ضد عفونی نشده) برای حدود ۴۰ روز در ابتدا غرقاب و گلخراب شد تا شرایط کشت بویژه از نظر اکسید و احیاء تا حد ممکن به شرایط مزارع شالیزاری نزدیک گردد. بذور برنج

#### تهیه پریفایتون غنی شده با ریز جانداران محرک رشد گیاه

برای تهیه پریفایتون غنی شده در ابتدا باکتری‌ها در محیط NB و قارچ‌ها در محیط PDB رشد داده شدند. پس از رشد به همان زیست بوم اولیه (پریفایتون مربوطه) که از آن جداسازی شده بودند اضافه شد تا پریفایتون غنی شده با سویه‌های برتر محرک رشد گیاه حاصل شود. جمعیت باکتری‌های اضافه شده  $10^8 \times 1$  و جمعیت قارچ  $10^6 \times 1$  CFU.ml<sup>-1</sup> بود. ۲۰۰ میلی‌لیتر از زادمایه ریز جانداران به ۸۰۰ میلی‌لیتر پریفایتون اضافه شد. برای تهیه مخلوط میکروبی مخلوط باکتری و قارچ نیز باکتری و قارچ به صورت جداگانه در محیط مربوطه کشت و در نهایت به نمونه پریفایتون اضافه گردید. اثر آنتاگونیستی بین باکتری و قارچ در ابتدا بررسی از طریق کشت در یک پلیت به صورت نقطه‌ای و مشاهده رشد آنها بررسی شد، بدین صورت که اگر اثر آنتاگونیستی وجود داشت در اطراف کلنی باکتری و قارچ هاله تشکیل می‌شد که

<sup>1</sup> Accession number

که در این فرمول:  $G_t$  تعداد بذور جوانه زده و  $D_t$  طول دوره جوانه زنی می باشد.

شاخص حیات جوانه‌های برنج با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد.

$$VI = GI \times H \quad [2]$$

که در این رابطه  $GI$  شاخص جوانه زنی و  $H$  ارتفاع بوته های برنج است. برای محاسبه زنده‌مانی جوانه‌های برنج پس از ۳۰ روز،  $H$  یا ارتفاع بوته‌های برنج در هر تیمار اندازه‌گیری شد. همچنین وزن ریشه و اندام هوایی شاخساره برنج نیز اندازه‌گیری گردید (لو و همکاران ۲۰۱۷). همچنین مقدار فسفر در شاخساره برنج بعد از برداشت به روش مولیبدومونو واناتات اندازه‌گیری شد (اولا و همکاران ۲۰۲۱).

### تحلیل آماری

تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها با نرم افزار SAS 9.2 پس از آزمون نرمال بودن با کولموگروف-اسمیرنوف انجام و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون توکی ( $P < 0.05$ ) استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### جدایه‌های میکروبی پریفایتون، ویژگی‌های محرک رشد گیاه و شناسایی مولکولی

بررسی ویژگی‌های محرک رشد گیاه جدایه‌های انتخاب شده نشان داد که بالاترین میزان توانایی انحلال فسفات نامحلول از منبع تری‌کلسیم فسفات مربوط به قارچ ۸ با  $7 \pm 818$  میلی‌گرم در لیتر بود که از نمونه اپی‌فایتون ۸ جداسازی شده بود. بالاترین توان تولید سیدروفور مربوط به قارچ ۶ با  $6/25 \pm 6$  بود که از نمونه اپی‌پلون ۶ جداسازی شده است. همچنین بالاترین توان تولید هورمون ایندول استیک اسید (IAA) هم مربوط به باکتری ۶ با  $7/4 \pm 205$  میکروگرم در میلی‌لیتر جداسازی شده از اپی‌پلون ۶ بود. نتایج شناسایی مولکولی نیز

(رقم هاشمی) با تیمار سدیم هیپوکلریت ۵ درصد برای ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شد و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس ۲۰ بذر برنج در سه تکرار برای هر تیمار در گلدان به صورت مستقیم قرار داده شد. حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون پریفایتون طبیعی رشد کرده در محیط BG11 (معادل ۲ g.kg<sup>-1</sup> وزن خشک) و پریفایتون غنی شده با باکتری و قارچ برتر و مخلوط باکتری + قارچ به گلدان‌ها اضافه شد. به گلدان شاهد ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. برای جلوگیری از تشکیل پریفایتون به گلدان‌های شاهد ۱ گرم سدیم آزید (NaN<sub>3</sub>) اضافه شد (لو و همکاران، ۲۰۱۷). تیمارهای آزمایشی شامل تیمار WP: بدون پریفایتون، تیمار PN1 اپی‌پلون ۱۳، PN2 اپی‌فایتون ۸ و PN3 اپی‌پلون ۶، PSB اپی‌پلون ۱۳ + باکتری برتر ۱۳، PSF اپی‌فایتون ۸ + قارچ برتر ۸ و PSBF اپی‌پلون ۶ + باکتری ۶ + قارچ برتر ۶، F0: بدون کود فسفر، F1: تأمین ۵۰ درصد کود فسفر از منبع مونو کلسیم فسفات، F2: تأمین ۱۰۰ درصد از مونو کلسیم فسفات و F3: تأمین ۱۰۰ درصد از منبع خاک فسفات به گلدان‌ها اضافه شد. بعد از حدود ۵ روز پریفایتون در بین سطح خاک و لایه آب بالای آن تشکیل شد. گلدان‌ها در سه تکرار و در گلخانه‌ای با دمای بین ۲۵-۳۵ °C به مدت ۳۰ روز در دوره نوری / تاریکی ۱۴/۱۰ و رطوبت نسبی ۸۰ درصد کشت شد.

#### ب) شاخص جوانه‌زنی بذور

آزمون جوانه‌زنی بذور برنج مستقیماً درون گلدان‌ها انجام گرفت و گلدان‌های غرقاب به صورت روزانه بررسی و وقتی که طول ریشه در حال ظهور برابر یا بزرگتر از طول دانه برنج شد به عنوان بذر جوانه زده در نظر گرفته شد. درصد جوانه زنی با استفاده از فرمول ۱ محاسبه گردید (لو و همکاران ۲۰۱۷).

$$GI = \sum_{t=1}^n \frac{G_t}{D_t} \quad [1]$$

سویه‌های *Talaromyces* و *Talaromyces minioluteu* و *stipitatus* بیشترین شباهت را دارند (جدول ۲).

نشان داد که باکتری‌های منتخب ۱۳ و ۶ به ترتیب به سویه‌های *Bacillus cereus* و *Acinetobacter calcoaceticus* و جدایه‌های قارچ ۶ و ۸ به ترتیب به

جدول ۲- نتایج ویژگی‌های محرک رشد گیاه و شناسایی مولکولی سویه‌های جداسازی شده برای آزمون گلخانه‌ای.

| ریزجاندار | میزان انحلال فسفر (mg L <sup>-1</sup> ) | pH محیط تری کلسیم فسفات  | توان تولید سیدروفور (HD/CD) | توان تولید IAA (µg mL <sup>-1</sup> ) | شماره دسترسی | درصد شباهت | نزدیک‌ترین سویه                    |
|-----------|---|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------|------------|------------------------------------|
| باکتری ۱۳ | ۳۲۷/۳ ± ۷/۸ <sup>d</sup>                | ۳/۸۰ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup> | ۳/۲۰ ± ۱/۱ <sup>d</sup>     | ۱۷۵ ± ۳/۵ <sup>c</sup>                | MW404643     | ۹۹/۸۶      | <i>Bacillus cereus</i>             |
| باکتری ۶  | ۳۵۴ ± ۹/۲ <sup>c</sup>                  | ۳/۸۰ ± ۰/۰۸ <sup>a</sup> | ۳/۴۰ ± ۱/۱۷ <sup>c</sup>    | ۲۰۵ ± ۴/۷ <sup>a</sup>                | MW404644     | ۹۹/۵۷      | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| قارچ ۶    | ۷۴۲ ± ۶ <sup>b</sup>                    | ۳/۹۰ ± ۱/۱ <sup>a</sup>  | ۶/۲۰ ± ۲/۵ <sup>a</sup>     | ۱۸۶ ± ۷ <sup>b</sup>                  | MW405459     | ۹۹/۶۴      | <i>Talaromyces minioluteu</i>      |
| قارچ ۸    | ۸۱۸ ± ۷ <sup>a</sup>                    | ۲/۱۰ ± ۰/۰۲ <sup>b</sup> | ۵/۸۰ ± ۱/۴۲ <sup>b</sup>    | ۹۷ ± ۳/۵ <sup>d</sup>                 | MW405460     | ۹۹/۸۲      | <i>Talaromyces stipitatus</i>      |

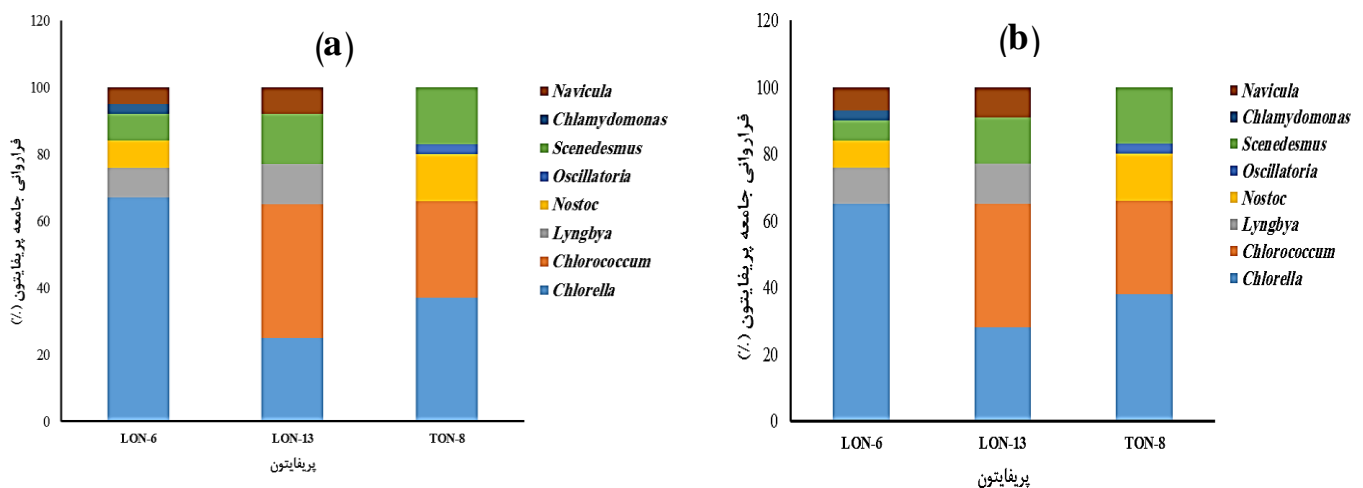
### جمعیت اجزای اتوتروف و هتروتروف در پریفایتون طبیعی و غنی شده

نتایج نشان داد که در پریفایتون غنی از باکتری و قارچ برتر جمعیت اجزای اتوتروف حفظ شده و تا حدودی به تعادل رسیده‌اند. در پریفایتون LON-6 که مخلوط باکتری برتر ۶ و قارچ برتر ۶ به آن اضافه شده است جمعیت کل باکتری ۱۰<sup>۷</sup> × ۸ و جمعیت باکتری حل کننده فسفات ۱۰<sup>۷</sup> × ۱/۴ در نمونه غنی شده نسبت به نمونه طبیعی افزایش نشان داد. در این نمونه جمعیت کل قارچ ۱۰<sup>۵</sup> × ۱/۳۲ و جمعیت قارچ حل کننده فسفات نیز ۱۰<sup>۴</sup> × ۸/۷ افزایش یافت که با مقدار جمعیت مخلوط اضافه شده همخوانی دارد. برای دو نمونه دیگر پریفایتون نیز مقدار افزایش جمعیت باکتری و قارچ برتر اضافه شده به نمونه نوترکیب با جمعیت شمارش شده بعد از سه روز بر روی پلیت همخوانی داشت که نشان از به تعادل رسیدن جمعیت اضافه شده با توده اصلی پریفایتون دارد (جدول ۳). بررسی جمعیت اجزای اتوتروف در پریفایتون‌های غنی شده نشان داد که تغییری در جمعیت

این اجزاء نسبت به نمونه طبیعی ایجاد نشده است. در پریفایتون LON-6 و TON-8 جمعیت جنس *Collerela* به ترتیب دو و یک درصد کاهش یافته است. در پریفایتون LON-13 جمعیت جنس *Chlorococcum* سه درصد افزایش یافته است که این تغییرات نسبت به پریفایتون طبیعی اولیه بسیار ناچیز است (شکل ۱). در مطالعات متعددی از مخلوط میکروبی جلبک-باکتری به منظور اهداف مختلف مانند حذف عناصر از آب، افزایش شاخص‌های رشد گیاهان استفاده شده است. برای مثال آدی و همکاران (۲۰۱۳) مخلوط میکروبی (*Achrochaete*, *Amphora*, *Berkeleya*, *Cyanobacteria*, *Licmophora*, *Gloeothece*, *Grammatophora*, *Lyngbya* و سو و همکاران (*Melosira*, *Navicula*, *Uliva*, *Ulothrix Filamentous*) (۲۰۱۱) از مخلوط میکروبی (*cyanobacteria*, *Bacteroidia*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria*, *Gammaproteobacteria*) برای حذف عناصر غذایی از آب استفاده کرده‌اند.

جدول ۳- جمعیت کل و ریزجاندارن حل‌کننده فسفات ( $CFU\ mL^{-1}$ ) قبل و بعد از غنی‌سازی پریفایتوین‌های مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای.

| پریفایتوین | نوع تیمار                     | جمعیت کل باکتری     | جمعیت کل قارچ    | جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات | جمعیت قارچ‌های حل‌کننده فسفات |
|------------|-------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| LON-6      | اصلی                          | $11/2 \times 10^6$  | $18 \times 10^3$ | $4/6 \times 10^3$               | $13 \times 10^1$              |
|            | غنی شده با باکتری و قارچ برتر | $12 \times 10^{14}$ | $15 \times 10^9$ | $6 \times 10^{10}$              | $10 \times 10^6$              |
| LON-13     | اصلی                          | $13/5 \times 10^6$  | $20 \times 10^3$ | $2/5 \times 10^3$               | $4 \times 10^1$               |
|            | غنی شده با باکتری برتر        | $7 \times 10^{14}$  | $18 \times 10^3$ | $9 \times 10^{10}$              | $6 \times 10^1$               |
| TON-8      | اصلی                          | $15 \times 10^9$    | $12 \times 10^2$ | $7 \times 10^2$                 | $9 \times 10^1$               |
|            | غنی شده با قارچ برتر          | $13 \times 10^9$    | $10 \times 10^8$ | $6 \times 10^2$                 | $8 \times 10^6$               |



شکل ۱- ترکیب اجزای جمعیت اتوتروف در پریفایتوین طبیعی (a) و غنی شده با ریزجاندار محرک رشد گیاه (b).

### شاخص جوانه‌زنی بذور برنج

برتر محرک رشد گیاه (PSBF) بیشترین شاخص جوانه زنی را نشان داد. بعد از این تیمار، تیمار پریفایتوین غنی‌شده با باکتری برتر ۱۳ (PSB) بیشترین تأثیر را بر افزایش شاخص جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد. به طور کلی تیمارهای پریفایتوین طبیعی حدود  $1/4$  برابر و پریفایتوین‌های غنی‌شده حدود  $1/9$  برابر شاخص جوانه‌زنی را نسبت به تیمار شاهد افزایش داده‌اند. عوامل مختلفی از جمله آب، دما و pH بر جوانه‌زنی بذر برنج در شالیزارها تأثیر دارند. با این

جدول تجزیه واریانس پارامترهای اندازه‌گیری شده در جدول ۴ آمده است. مقایسه میانگین‌ها برای اثر تیمارهای پریفایتوین طبیعی، پریفایتوین غنی شده و کود فسفر بر شاخص جوانه‌زنی گیاهچه‌های برنج در شکل ۲ نشان داده شده است. بین سطوح مختلف کود فسفر در تمام تیمارهای پریفایتوین با نمونه بدون کود فسفر تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد ( $P < 0/05$ ) وجود داشت. تیمار غنی‌شده با مخلوط باکتری ۶ و قارچ ۶

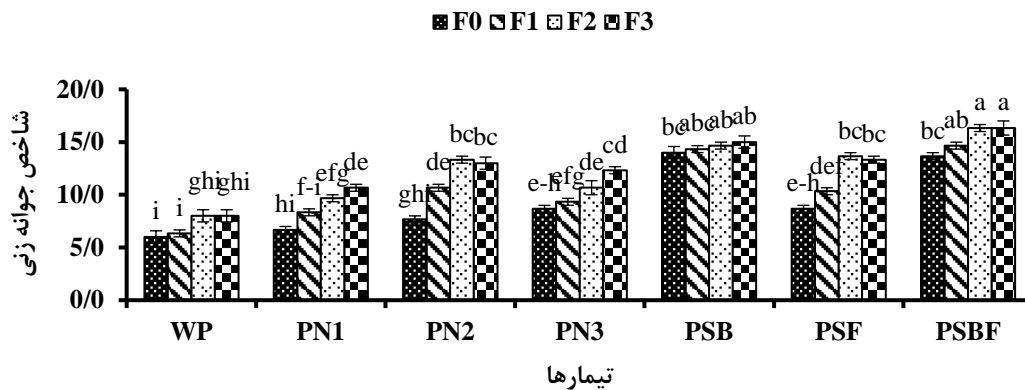
حال، تأثیر پریفایتون بر جوانه‌زنی بذور برنج به ندرت مطالعه شده است. زیرا مطالعه پریفایتون بر روی سطح خاک در شالیزارها هنوز در مراحل اولیه است (وو، ۲۰۱۳). مشخص شده است که پریفایتون در حفاصل بین خاک و آب در مزارع شالیزاری در همه جا وجود دارد (یانگ و همکاران ۲۰۱۶) و بنابراین کم و بیش ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی حفاصل خاک و آب، به ویژه pH را تغییر می‌دهد (یانگ و همکاران ۲۰۱۶؛ لو و همکاران ۲۰۱۶). در نتیجه، وجود پریفایتون بر جوانه‌زنی بذور برنج تأثیر می‌گذارد. لو و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که حضور پریفایتون شاخص

جوانه‌زنی بذور برنج را افزایش می‌دهد. بلنپ و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که وجود پوسته‌های زیستی خاک در اکوسیستم‌های بیابانی دمای سطح خاک را تا ۱۴ درجه سلسیوس بیشتر از خاک بدون پوسته افزایش می‌دهد. همچنین دریافتند که سیانوباکترها می‌توانند تا ده برابر یا بیشتر آب جذب کنند. همان‌طور که مشخص شده است، سیانوباکترها یکی از اجزای اصلی لایه زیستی پریفایتون هستند (لو و همکاران ۲۰۱۴؛ وو و همکاران ۲۰۱۱). در نتیجه، وجود پریفایتون دما و رطوبت سطح خاک را افزایش داده و در نهایت جوانه‌زنی بذور برنج را تسهیل می‌کند.

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های برنج در آزمون گلخانه‌ای.

| میانگین مربعات |                  |          |               |                |                | درجه آزادی | منابع تغییرات              |
|----------------|------------------|----------|---------------|----------------|----------------|------------|----------------------------|
| وزن زیست توده  | فسفر اندام هوایی | طول ریشه | ارتفاع گیاهچه | شاخص زنده مانی | شاخص جوانه زنی |            |                            |
| ۱۲/۷**         | ۰/۰۰۷**          | ۴۱/۴**   | ۱۸۹/۹**       | ۳۸۴۳**         | ۱۰۱/۷**        | ۶          | تیمار پریفایتون            |
| ۱۱/۱۲**        | ۰/۰۱**           | ۱۹/۱**   | ۹۳/۲**        | ۱۰۴۱**         | ۵۱/۲**         | ۳          | کود فسفر                   |
| ۰/۲۷*          | ۰/۰۰۰۲**         | ۰/۰۹ns   | ۸/۴**         | ۶۹**           | ۲/۱**          | ۱۸         | تیمار پریفایتون × کود فسفر |
| ۰/۱۳           | ۰/۰۰۰۰۰۷         | ۰/۰۳     | ۰/۹۳          | ۱۱             | ۰/۵۵           | ۵۶         | خطا                        |
| -              | -                | -        | -             | -              | -              | ۸۳         | کل                         |
| ۷/۲            | ۳/۴              | ۴/۹      | ۸/۷           | ۵/۳            | ۶/۶            | -          | ضریب تغییرات (%)           |

\*\* معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد ( $P < ۰/۰۱$ )، \* معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد ( $P < ۰/۰۵$ ) و ns عدم معنی‌داری می‌باشد.

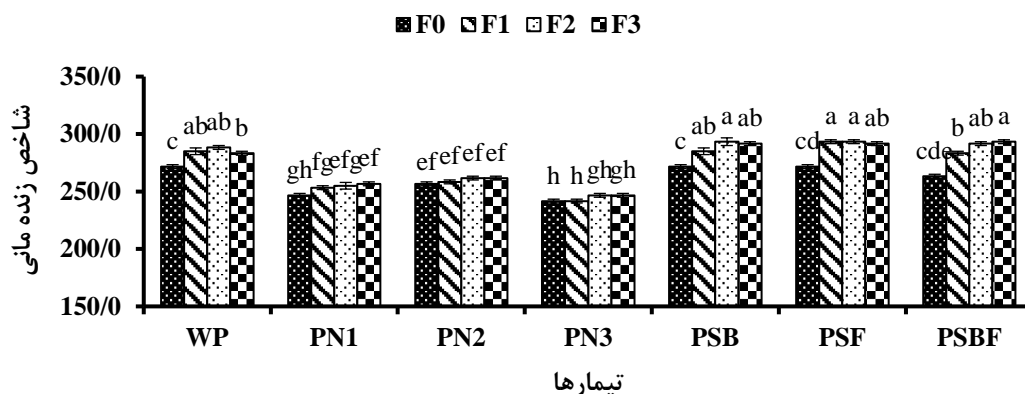


شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص جوانه زنی بذور برنج.

### شاخص زنده مانگی

می‌تواند از نفوذ ریشه برنج به خاک جلوگیری و بنابراین زنده مانگی جوانه برنج را کاهش دهد. به طور کلی پذیرفته شده است که مهار رشد گیاه توسط پریفایتون عمدتاً به دلیل رقابت بین گیاهان و پریفایتون برای مواد غذایی و نور است (دیاز و همکاران ۲۰۰۷؛ جونز و سایر ۲۰۰۳). این احتمالاً به دلیل اثر منفی لایه ضخیم پریفایتون که مانع از رشد و استقرار جوانه‌های برنج در اوایل دوره رشد می‌باشد. شکل ۴، تشکیل لایه ضخیم زیستی پریفایتون رشد کرده در سطح گلدان در این مطالعه را نشان می‌دهد که مانع از خروج و استقرار گیاهچه‌های برنج جوانه زده شده است. با توجه به نتایج مشاهده شده حضور پریفایتون در شالیزارها از جنبه مدیریت علف‌های هرز می‌تواند مفید باشد و مانع از رشد علف‌های هرز می‌شود (لو و همکاران ۲۰۱۷).

بررسی شاخص زنده مانگی گیاهچه‌های برنج نشان داد که در تیمارهای پریفایتون طبیعی میزان شاخص زنده مانگی به طور معناداری نسبت به تیمار شاهد (بدون پریفایتون) و پریفایتون غنی شده نیز کاهش یافته است. این کاهش در سه نوع پریفایتون طبیعی نسبت به تیمار شاهد بدون پریفایتون به طور میانگین حدود ۱۰ درصد است. در تیمارهای پریفایتون غنی شده با تیمار شاهد در سطوح ۱۰۰٪ تأمین نیاز کودی از منبع مونوکلسیم فسفات (F2) و خاک فسفات (F3) اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۳). حضور پریفایتون زنده مانگی جوانه‌های برنج را نسبت به تیمار بدون پریفایتون کاهش داد. در سطح خاک، لایه زیستی پریفایتون،



## شکل ۳- تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص زنده‌مانی گیاهچه‌های برنج.

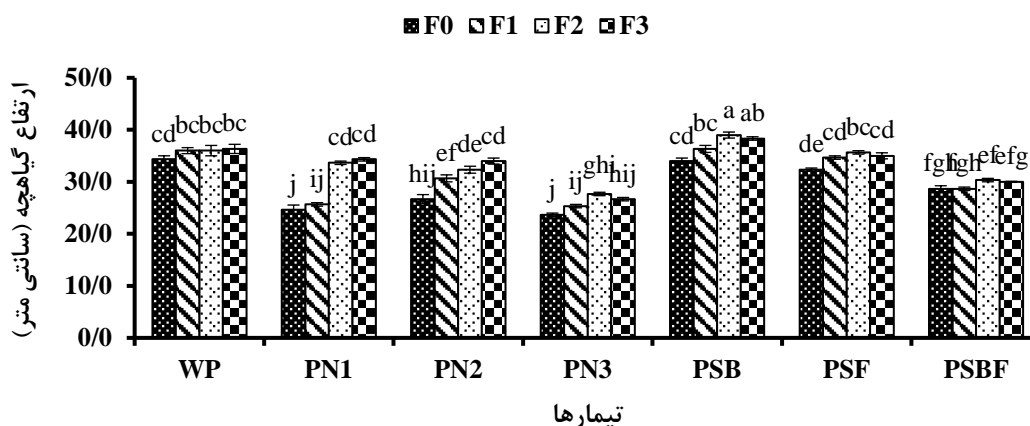
معناداری از لحاظ آماری در سطح ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) مشاهده شد. بیشترین ارتفاع اندازه‌گیری شده مربوط به تیمار پریفایتون غنی شده با باکتری ۱۳ (PSB) در سطح F2 به میزان ۳۹ سانتی‌متر بود. به طور کلی در تیمارهای پریفایتون طبیعی حدود ۱۵ درصد ارتفاع جوانه‌های برنج نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای پریفایتون غنی‌شده با ریزجانداران برتر محرک رشد کمتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که تیمارهای پریفایتون طبیعی منجر به کاهش ارتفاع جوانه‌های برنج شده‌اند. در مطالعه‌ای حضور پریفایتون حدود ۲۷ درصد ارتفاع گیاهچه‌های برنج را نسبت به تیمار بدون پریفایتون کاهش داد (لو و همکاران ۲۰۱۷). در مطالعات متعددی گزارش شده است که استفاده از مخلوط ریزجانداران حل‌کننده فسفات و محرک رشد گیاه منجر به افزایش ارتفاع گیاه می‌شوند (گوسوامی و همکاران ۲۰۱۹؛ سایکیا و همکاران ۲۰۱۸).



شکل ۴- لایه ضخیم (Mate) پریفایتون تشکیل شده در سطح گلدان‌ها.

## ارتفاع گیاهچه‌های برنج

مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر ارتفاع گیاهچه‌های برنج در شکل ۵ نشان داده شده است. بین سطوح مختلف کودی بدون کود (F0)، تأمین ۵۰ درصد نیاز کودی از منبع مونوکلسیم فسفات (F1) و تأمین ۱۰۰ درصد نیاز کودی از مونوکلسیم فسفات (F2) و تأمین ۱۰۰ درصد نیاز کودی از منبع خاک فسفات (F3) در اکثر تیمارهای آزمایشی به جز تیمار شاهد تفاوت



شکل ۵- تأثیر تیمارهای مختلف بر ارتفاع گیاهچه‌های برنج.

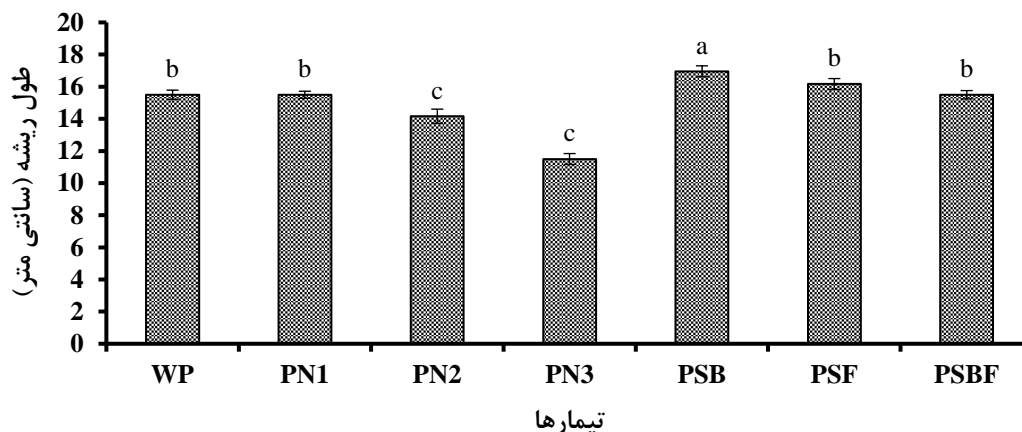
## طول ریشه گیاهچه‌های برنج

ریشه اندازه‌گیری شده مربوط به تیمار پریفایتون نو ترکیب با باکتری ۱۳ (PSB) با ۱۶/۹۵ سانتی‌متر بود. کمترین طول ریشه هم در تیمار پریفایتون طبیعی (PN3) با ۱۱/۵ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل ۶). لو و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که حضور پریفایتون

مقایسه میانگین اثر اصلی تیمارهای مختلف پریفایتون طبیعی و غنی شده بر طول ریشه گیاهچه‌های برنج نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف در سطح ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) وجود دارد. بیشترین طول

گیاه نخود شده است (ساگنا و همکاران ۲۰۱۵). گزارش شده است تولید هورمون IAA منجر به افزایش تولید ریشه گیاه می‌شود (نین و همکاران ۲۰۱۲).

حدود ۱۰ درصد طول ریشه گیاهچه برنج را نسبت به تیمار شاهد کاهش داده است. استفاده از باکتری *Bacillus sp.* RM-2 و قارچ *Aspergillus niger S-36* به صورت جداگانه و مخلوط منجر به افزایش طول ریشه



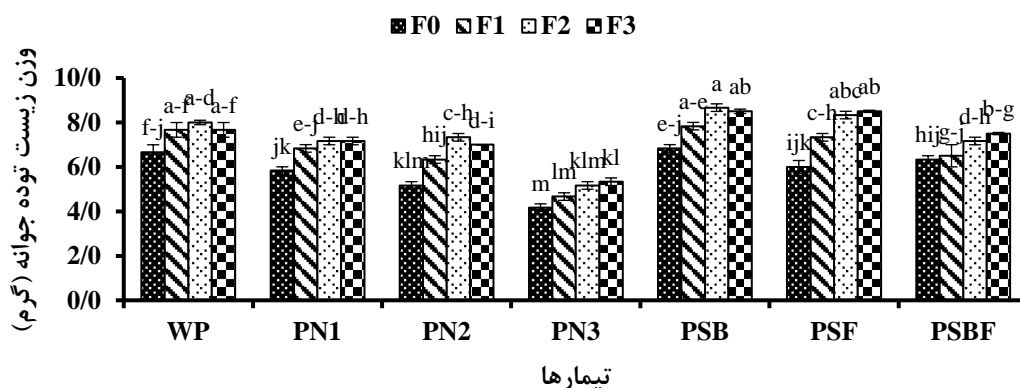
شکل ۶- تأثیر تیمارهای مختلف بر طول ریشه گیاهچه‌های برنج.

F3 تفاوت معناداری از لحاظ آماری مشاهده نشد. وزن زیست توده در تیمار PSF در سطح کودی F2 و F3 به ترتیب برابر ۸/۵ و ۸/۵ گرم اندازه‌گیری شد. کاهش در وزن زیست توده در تیمارهای پریفایتون طبیعی می‌تواند به دلیل رقابت در جذب عناصر غذایی و فضا برای رشد باشد. در تحقیقی حضور پریفایتون حدود ۳۸ درصد وزن زیست توده گیاهچه برنج را نسبت به تیمار شاهد بدون پریفایتون کاهش داد (لو و همکاران، ۲۰۱۷). در تحقیقی دیگر استفاده از باکتری *Bacillus sp.* RM-2 و قارچ *Aspergillus niger S-36* به صورت جداگانه و مخلوط منجر به افزایش وزن زیست توده گیاه نخود شده که بیشترین اثر در تیمار مخلوط میکروبی مشاهده شده است (ساگنا و همکاران ۲۰۱۵).

#### وزن زیست توده گیاهچه‌های برنج

مقایسه میانگین اثر متقابل پریفایتون‌های مختلف و سطوح مختلف کود فسفر بر وزن زیست توده گیاهچه‌های برنج در شکل ۷ نشان داده شده است. در اکثر تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف کود فسفر بر وزن زیست توده تأثیر داشته و منجر به تفاوت معناداری در سطح ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) شد. در تیمار پریفایتون طبیعی PN3 که نمونه اپی‌پلون ۶ بود در سطوح مختلف کود فسفر حدود ۱۰ درصد وزن زیست توده کمتری نسبت به تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. بیشترین زیست توده توده گیاهچه برنج در تیمار PSB در سطح کودی F2 و F3 با ۸/۷ و ۸/۳ گرم اندازه‌گیری شد ولی بین این تیمارها با تیمار PSF که پریفایتون غنی شده با قارچ برتر محرک رشد گیاه بود در هر دو سطح کودی F2 و



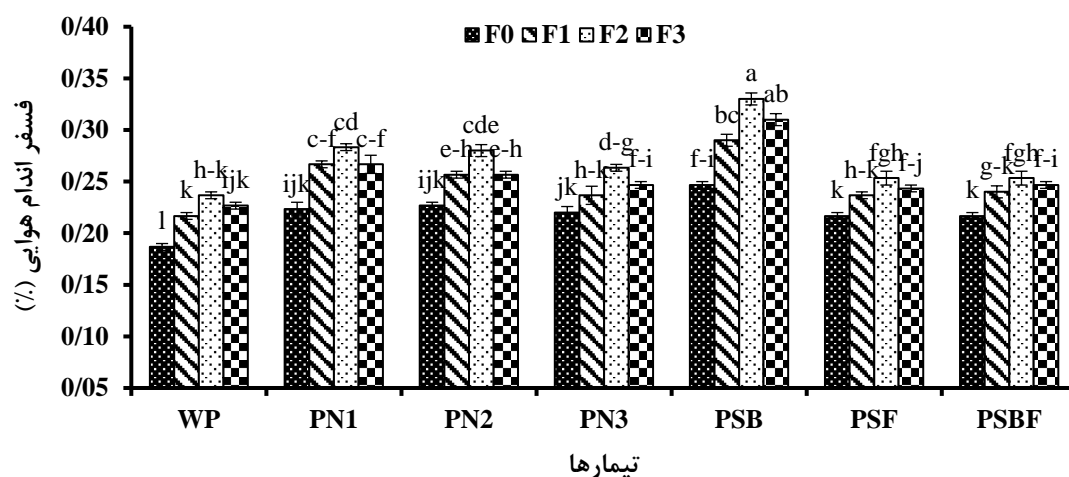


شکل ۷- تأثیر تیمارهای مختلف بر وزن زیست توده گیاهچه‌های برنج.

### فسفر شاخصاره گیاه برنج

$P <$  نتایج نشان داد در تمام تیمارهای آزمایشی با افزایش سطح کود فسفر مقدار فسفر شاخصاره افزایش نشان داده است. تیمارهای PSB و PN1 به طور میانگین به ترتیب ۳۵/۸ و ۲۰ درصد در سطوح مختلف کودی فسفر شاخصاره را نسبت به تیمار شاهد افزایش داده‌اند (شکل ۸). در تیمار PSB به دلیل استفاده از باکتری برتر حل کننده فسفات میزان فسفر در شاخصاره افزایش بیشتری نشان داده است.

بررسی مقدار فسفر شاخصاره گیاه برنج برداشت شده نشان داد که بیشترین مقدار فسفر در تیمار PSB در سطح کودی F2 با غلظت ۰/۳۳ درصد اندازه‌گیری شد که تفاوت معناداری با همین تیمار پریفایتون در سطح کودی F3 نداشت ولی با سایر تیمارهای پریفایتون در سطوح کودی مختلف اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $0.05$ ).



شکل ۸- تأثیر تیمارهای مختلف بر فسفر بخش هوایی گیاه برنج.

### نتیجه‌گیری کلی

گلدان‌ها که مانع از عبور جوانه‌های برنج از این لایه ضخیم می‌شود، کاهش داد. البته این موضوع در سیستم کشت ایران که به صورت نشاکاری است و گیاهچه برنج از خزانه به زمین منتقل می‌شود مشکل ساز نیست. غنی‌کردن پریفایتون با ریزجانداران برتر محرک رشد

طبق نتایج این مطالعه مشخص شد که حضور لایه زیستی پریفایتون شاخص جوانه‌زنی را افزایش ولی شاخص زنده‌مانی جوانه‌های برنج را به دلیل حضور لایه ضخیم پریفایتون در سطح آب فوقانی خاک درون

و طول ریشه در گیاه برنج می‌شود. در نهایت می‌توان گفت پریفایتون می‌تواند پتانسیل استفاده به عنوان یک کود زیستی در شالیزارها را داشته باشد که به جوانه‌زنی و رشد بهتر بذور برنج کمک می‌نماید. در این مطالعه مشخص شد که پریفایتون پریفایتون طبیعی که با باکتری محرک رشد گیاه *Bacillus cereus* غنی شده (PSB) بود بهترین پاسخ را در بهبود ویژگی‌های محرک رشد گیاه برنج دارد.

گیاه از برخی اثرات منفی پریفایتون مانند کاهش درصد زنده‌مانی به دلیل کمک به رشد و استقرار بهتر گیاهچه‌های برنج می‌کاهد. حضور پریفایتون در شالیزارها بر چرخه عناصر غذایی به ویژه فسفر تأثیرگذار است و استفاده از ریزجاندارن دارای پتانسیل انحلال فسفر و محرک رشد گیاه همراه با پریفایتون به افزایش نگهداری و جذب کود فسفرمصرفی در شالیزارها کمک نموده و همچنین باعث افزایش جذب فسفر و شاخص‌های رشد مانند ارتفاع، وزن زیست‌توده

#### منابع مورد استفاده

- Adey WH, Laughinghouse HD, Miller JB, Hayek LAC, Thompson JG, Bertman S, Hampel K and Puvanendran S, 2013. Algal turf scrubber (ATS) flowways on the Great Wicomico River, Chesapeake Bay: productivity, algal community structure, substrate and chemistry I. *Journal of Phycology* 49: 489-501.
- Ali W, Mao K, Zhang H, Junaid M, Xu N, Rasool A, Feng X and Yang Z, 2020. Comprehensive review of the basic chemical behaviours, sources, processes, and endpoints of trace element contamination in paddy soil-rice systems in rice-growing countries. *Journal of Hazardous Materials* 397, 122720.
- Chaiharin 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.
- Chaiharin 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.
- Díaz-Olarte J, Valoyes-Valois V, Guisande C, Torres NN, González-Bermúdez A, Sanabria-Aranda L, Hernández AMM, Duque SR, Marciales L J and Nuñez-Avellaneda M, 2007. Periphyton and phytoplankton associated with the tropical carnivorous plant *Utricularia foliosa*. *Aquatic Botany* 87: 285-291.
- Ellwood NT, Di Pippo F and Albertano P, 2012. Phosphatase activities of cultured phototrophic biofilms. *Water Research* 46: 378-386.
- Goswami SK, Kashyap P and Awasthi S, 2019. Deciphering rhizosphere microbiome for the development of novel bacterial consortium and its evaluation for salt stress management in solanaceous crops in India. *Indian Phytopathology* 72: 479-488.
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR and Fields MW, 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3832-3845.
- Jones JI and Sayer CD, 2003. Does the fish-invertebrate-periphyton cascade precipitate plant loss in shallow lakes? *Ecology* 84: 2155-2167.
- Kasai F, 1999. Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application. *Chemosphere* 38: 919-931.
- Lim HS, Lee JM and Kim SD, 1999. Role of siderophore in biological control of *Fusarium solani* by *Pseudomonas fluorescens* GL20. Kinki University Agricultural Research Institute Report, Pp. 47-58.
- 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, 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, 2016. Periphytic biofilm: A buffer for phosphorus precipitation and release between sediments and water. *Chemosphere* 144: 2058-2064.
- 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: 8782-8791.
- Martin JL, 2019. *Hydro-Environmental Analysis: Freshwater Environments*. CRC Press.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP and Meena RS, 2016. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer-Verlag.
- 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.
- Nain L, Yadav R and Saxena J, 2012. Characterization of multifaceted Bacillus sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. *Applied Soil Ecology* 59: 124-135.
- 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.
- 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 & Environment* 146: 103-112.
- Rodríguez H and Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- Saikia J, Sarma RK, Dhandia R, Yadav A, Bharali R, Gupta VK and Saikia R, 2018. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports* 8: 1-16.
- Saxena J, Saini A, Ravi I, Chandra S and Garg V, 2015. Consortium of phosphate-solubilizing bacteria and fungi for promotion of growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Crop Improvement* 29: 353-369.
- Skulberg, OM, Carmichael WW, Codd GA and Skulberg R, 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, 145-164.
- Spagnoletti FN, Tobar N, Di Pardo AF, Chiochio VM and Lavado RS, 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Applied Soil Ecology* 111: 25-32.
- Su Y, Mennerich A and Urban B, 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research* 45: 3351-3358.
- Susilastuti D, 2018. Agricultural production and its implications on economic growth and poverty reduction.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tiwari K, 2001. Phosphorus needs of Indian soils and crops. *Better Crops International* 15, 6.
- Ulloa M, Nunes-Nesi A, da Fonseca-Pereira P, Poblete-Grant P, Reyes-Díaz M and Cartes P, 2021. The effect of silicon supply on photosynthesis and carbohydrate metabolism in two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars contrasting in response to phosphorus nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry* 169: 236-248.
- Wehr JD, Sheath RG and Kociolek JP, 2015. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier.
- Wu Y, 2013. The studies of periphyton: From waters to soils. *Hydrology Current Research* 4, 2.
- 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.
- Wu Y, Liu J, Yang L, Chen H, Zhang S, Zhao H and Zhang N, 2011. Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. *Environmental Microbiology* 13: 604-615.
- 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.
- Zhang W, Ma W, Ji, Y, Fan M, Oenema O and Zhang F, 2008. Efficiency, economics, and environmental implications of phosphorus resource use and the fertilizer industry in China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 80: 131-144.

Ziarati P and Azizi N, 2014. Consequences of cooking method in essential and heavy metal contents in brown and polished Alikazemi rice. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 4: 280-287.