



19th Iranian Soil Science Congress
16-18 September, 2025



نوزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۲۵ تا ۲۷ شهریور ۱۴۰۴



۰۴۲۵۰-۳۲۰۳۱

مدیریت جامع نگر و هوشمند خاک و آب

Holistic and Smart Soil and Water Management

دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran



بررسی اثرات بیوفیلیم پریفایتون در فراهمی نیتروژن در خاک و بهبود رشد گیاه برنج

مهران غلامی^{۱*}، حسینعلی علیخانی^۲، حسن اعتصامی^۳، زهرا کرمی^۴

- ۱- پژوهشگر بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه اتاوا، کانادا
- ۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، ایران
- ۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، ایران
- ۴- دانشجو دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشگاه تهران، ایران

* mehran.gholami@uottawa.ca

mehrangholami@ut.ac.ir

چکیده

بیوفیلیم پریفایتون دارای نقش‌های گسترده‌ای در چرخش عناصر غذایی در تالاب‌های طبیعی و مصنوعی است. این بیوفیلیم با داشتن طیف وسیعی از دیازوتروف‌های هتروتروف و اتوتروف، در فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن و بهبود حاصلخیزی خاک در شالیزارها و تأمین بخشی از نیاز نیتروژنی گیاه برنج نقش پررنگی ایفا می‌کند. بدین منظور نمونه‌های پریفایتون از شالیزارهای شمال کشور جمع‌آوری شد و جداسازی دیازوتروف‌ها از آنها انجام گرفت. تیمارهای مختلف با مشارکت پریفایتون و دیازوتروف‌های برتر در فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن به مدت ۴۰ شبانه‌روز در شرایط گلخانه‌ای موردپایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از پژوهش نشان دادند که تیمارهای حاوی پریفایتون به طور قابل توجهی میزان نیتروژن کل و آمونیوم خاک را افزایش داد. افزایش فراهمی نیتروژن در محلول خاک، افزایش در پارامترهای رشد از جمله ارتفاع گیاه، وزن خشک و میزان نیتروژن کل گیاه را به دنبال داشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پریفایتون پتانسیل بسیار بالایی در فراهمی نیتروژن و حمایت از رشد گیاه برنج دارد که می‌تواند از کاربرد کودهای شیمیایی نیتروژنی بکاهد. با بهره‌گیری از پریفایتون‌های موجود در مزارع برنج، می‌توان روشی جدید در کشت پایدار و سالم گیاه برنج ارائه داد. کودهای زیستی مبتنی بر پریفایتون به عنوان یک گزینه نوین، می‌توانند سلامت خاک و گیاه را تضمین کنند.

واژگان کلیدی: پریفایتون، جلبک، سیانوباکتری، شالیزار، نیتروژن

مقدمه

کشاورزی سنگ بنای تولید مواد غذایی است که جمعیت رو به رشد جهانی را حفظ می‌کند. برنج غذای اصلی بیش از نیمی از ساکنان جهان است که در بیش از ۱۰۰ کشور کشت می‌شود که ۹۰ درصد از تولید جهانی این محصول در آسیا انجام می‌شود. به عنوان منبع اصلی تغذیه و معیشت میلیون‌ها نفر، برنج در میان محصولات اصلی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Fukagawa and Ziska, 2019; Lee, 2021). با این حال، کشت سنتی برنج اغلب به شدت به کودهای شیمیایی، به ویژه کودهای نیتروژنی برای به حداکثر رساندن محصول متکی است. این وابستگی به کودهای شیمیایی چندین چالش از جمله تخریب محیط زیست، هزینه‌های بالا در مرحله تولید، رواناب غنی‌شده با عناصر غذایی و افزایش مقاومت در برابر آفات را به همراه دارد (Sung et al., 2023; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2015). در این راستا، بهبود کارایی استفاده از نیتروژن در کشت برنج به یک راهکار حیاتی برای شیوه‌های کشاورزی پایدار تبدیل شده است. کارایی مصرف نیتروژن (NUE) برای برنج ۲۸ تا ۳۵ درصد گزارش شده است. این به طور قابل توجهی ۱۵ تا ۲۰ درصد کمتر از میانگین جهانی است (Wang et al., 2022). برای بهبود کارایی مصرف نیتروژن در کشت برنج، چندین استراتژی از جمله کوددهی مناسب بر اساس آزمون خاک، استفاده از بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون برای کاهش تلفات نیتروژن و استفاده از کودهای نیتروژنی آهسته‌رهش برای مطابقت با جذب توسط گیاه را می‌توان اجرا کرد. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن (BNF) یک رویکرد استراتژیک برای افزایش کارایی مصرف نیتروژن در کشت برنج است. تحقیقات فراوانی ریزوسفر برنج را به عنوان یک مخزن اصلی برای جداسازی تثبیت‌کنندگان نیتروژن موردبررسی قرار داده‌اند (Etesami, 2019; Khumairah et al., 2022; Mahmud et al., 2020). محققان برهمکنش بین گیاه برنج و دیازوتروف‌های خاک را افزایش دادند و باعث افزایش تثبیت زیستی نیتروژن و در نتیجه آن، افزایش عملکرد دانه در شرایط کمبود نیتروژن شدند (Ding et al., 2019; Etesami, 2019; Mahmud et al., 2020). بیوفیلیم‌های پریفایتونی به عنصری حیاتی در اکوسیستم شالیزار تبدیل شده‌اند، زیرا عناصر غذایی فراوان و نور مناسب در فصل مشترک آب و خاک در شالیزارهای برنج، محیطی ایده‌آل برای تشکیل و رشد آن‌ها ایجاد می‌کند (Lu et al., 2017; Reddy et al., 2022). پریفایتون شامل میکروارگانیسم‌های متنوع (جلبک‌ها، باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌سلولی‌ها و متازوآوها) همراه با مواد پلیمری خارج سلولی و مواد معدنی می‌باشد که یک میکرواکوسیستم پایدار ایجاد می‌کند و از شبکه عناصر غذایی و شارش انرژی پشتیبانی می‌کند. پریفایتون نقش کلیدی در تنظیم چرخه نیتروژن را با جذب نیتروژن اضافی و ممانعت از اتلاف آن ایفا می‌کند (Chen et al., 2022; Lu et al., 2017; Wu et al., 2018).

طبق گزارشات، پریفایتون می‌تواند تلفات نیتروژن در آب پوشاننده در شالیزار را تا ۴۸ درصد کاهش دهد (Su et al., 2017). میکروارگانیسم‌های متنوع حاضر در بیوفیلیم پریفایتون برای انجام واکنش‌های مختلف و پیچیده مرتبط با چرخه نیتروژن با یکدیگر همکاری می‌کنند، به طوری که مواد آلی تولیدشده انرژی کافی و الکترون‌های لازم را برای پشتیبانی از چرخه نیتروژن پایدار فراهم می‌کند (Chen et al., 2022). مشخص شده است که پریفایتون همچنین به عنوان یک زیستگاه مناسب برای باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) عمل می‌کنند (Beheshti et al., 2021). غنی‌سازی بیوفیلیم پریفایتون با میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات باعث افزایش کیفیت رشد و تغذیه (مانند فسفر، آهن، روی، منگنز و مس) گیاه برنج شد (Beheshti et al., 2022; Alikhani, Beheshti, et al., 2023). اگرچه پتانسیل تثبیت نیتروژن باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر برنج قبلاً موردبررسی قرار گرفته است، اما اطلاعات بسیار اندکی در مورد پتانسیل تثبیت نیتروژن دیازوتروف‌های جدا شده از پریفایتون وجود دارد. با توجه به این موضوع که پریفایتون‌های شالیزاری ممکن است میزبان باکتری‌هایی باشند که قادر به تثبیت نیتروژن هستند، این تحقیق با هدف ارزیابی اثربخشی پریفایتون غنی‌شده با دیازوتروف‌های هتروتروف و اتوتروف در افزایش سطوح نیتروژن و حمایت از رشد گیاه برنج انجام شد. اهمیت این مطالعه در پتانسیل آن برای ارائه روش‌های جایگزین پایدار و نوین برای کودهای شیمیایی نیتروژنی نهفته است. با بررسی این رویکرد جدید، هدف ما ارائه بینش‌های علمی جدید در مورد نقش جوامع میکروبی ناشناخته در شیوه‌های کشت پایدار برنج است که در نهایت سلامت محیط زیست و امنیت غذایی را افزایش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از بیوفیلم‌های پریفایتونی از سطح خاک شالیزارهای استان گیلان انجام شد. در فرآیند نمونه‌برداری از خاک به منظور کشت گلخانه‌ای، به توصیه‌های Gholami و همکاران (2020) برای به حداقل رساندن تلفات خاک عمل گردید. نمونه‌ها در ظروف استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. تهیه سری‌های رقت و کشت بر روی محیط‌کشت‌های اختصاصی از نمونه‌های پریفایتونی نیز بدون وقفه از نظر جمعیت سیانوباکتریایی و باکتریایی انجام پذیرفت. نمونه خاک در دمای اتاق هواخشک شدند و بعد از نرم‌کردن، از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند و برای بافت خاک، pH، نیتروژن کل، پتاسیم قابل جذب، آمونیوم، نترات، EC، کربن آلی و فسفر موردآنالیز قرار گرفتند (Jones, 2001). همچنین تنفس پایه به روش Joggey (1956) اندازه‌گیری گردید.

جداسازی دیازوتروف‌ها از بیوفیلم پریفایتون و سنجش کمی برای بررسی توان تثبیت نیتروژن

برای جداسازی دیازوتروف‌های هتروتروف و اتوتروف، سری‌های رقت از نمونه‌های پریفایتون تهیه و بر روی محیط نوترینت آگار برای رشد باکتری‌ها و محیط BG11 برای سیانوباکتری‌ها کشت داده شدند. پلیت‌های نوترینت آگار به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد در تاریکی و پلیت‌های BG11 به مدت ۱۵ الی ۲۰ روز در دمای 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد تحت دوره‌های نور و تاریکی (۱۰/۱۴ ساعت) انکوباسیون شدند. پلیت‌ها به طور منظم برای تشکیل کلنی پایش شدند به طوری که از نظر ظاهر، بافت، رنگ، حاشیه، رنگدانه و اندازه موردبررسی قرار می‌گرفتند. کلنی‌هایی با صفات مورفولوژیکی متفاوت بر روی پلیت‌های نوترینت آگار و BG11 تازه خالص‌سازی شدند. سپس جدایه‌های باکتریایی خالص‌شده بعد از سه مرتبه شستشو با سرم فیزیولوژی در شرایط استریل بر روی پلیت‌های حاوی محیط N-Free Agar و جدایه‌های سیانوباکتریایی بر روی پلیت‌های BG11₀ (محیط BG11 بدون NaNO₃) کشت داده شدند. جدایه‌های باکتریایی و سیانوباکتریایی که در محیط‌های N-Free Agar و BG11₀ رشد کردند به عنوان تثبیت‌کنندگان نیتروژن در نظر گرفته شدند.

سپس جدایه‌های باکتریایی مرحله قبل در N-Free (با ترکیبی مشابه با N-Free Agar، به جز آگار) و جدایه‌های سیانوباکتریایی در محیط BG11₀ مایع رشد داده شدند. پس از رسیدن به کدورت مناسب ($OD_{600} = 0.5$)، ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از این مایه تلقیح‌ها به محیط‌های همسان جدید منتقل شدند. محیط‌های حاوی جدایه‌های باکتریایی در تاریکی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر دورانی به مدت ۱۶۸ ساعت و برای جدایه‌های سیانوباکتریایی محیط‌های BG11₀ تحت یک چرخه نور/تاریکی ۱۰/۱۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر دورانی به مدت ۲۴۰ ساعت انکوباسیون شدند. نمونه‌های شاهد از محیط‌های N-Free و BG11₀ بدون تلقیح باکتری یا سیانوباکتری نیز تهیه شد. مقدار تثبیت نیتروژن با استفاده از روش هضم گوگرد و سپس تقطیر با NaOH ۱۰ مولار اندازه‌گیری شد (Keeney and Bremner, 1966; Soares et al., 2006; Tang et al., 2020).

تیماربندی و کشت گلخانه‌ای گیاه برنج

برای بررسی اثرات جداگانه جدایه‌های دیازوتروف، پریفایتون طبیعی و پریفایتون غنی‌شده با جدایه‌های دیازوتروف بر تغذیه نیتروژنی گیاه برنج، یک آزمون گلخانه‌ای بر اساس طرح کاملاً تصادفی به مدت ۴۰ روز پیاده‌سازی و اجرا گردید. این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه تهران انجام شد. تیمارهای موردآزمایش در جدول ۱ آورده شده‌اند.

به منظور تهیه پریفایتون غنی‌شده و مایه‌های تلقیح از روش‌های بیان شده در پژوهش قبلی تیم پیروی کردیم (Beheshti et al., 2022). در مرحله بعدی از گلدان‌هایی به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۱۵ سانتی‌متر (بدون زهکش) با ۵ کیلوگرم خاک تهیه‌شده از شالیزار محل نمونه‌برداری اولیه واقع در روستای گیلده استفاده گردید. نیازهای تغذیه‌ای خاک مورداستفاده بر اساس داده‌های اولیه خاک و مطابق با نشریه موسسه تحقیقات برنج گیلان، با استفاده از منابع مختلف کودی (پتاسیم از سولفات پتاسیم، فسفر از سوپرفسفات تریپل و نیتروژن (تیمار کنترل مثبت) از اوره) تامین گردید. بذر برنج (رقم هاشمی) با

استفاده از محلول هیپوکلیت سدیم ۱ درصد به مدت پنج دقیقه استریل و پس از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر، عملیات کاشت با کشت ۱۵ بذر در هر گلدان انجام پذیرفت. سپس مطابق با هر تیمار ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون های جدایه ها، پریفایتون، پریفایتون غنی شده با جدایه های دیازوتروف که به طور جداگانه و یا کنسرسیوم تهیه شده بودند، به گلدان های مخصوص خود اعمال شدند. آبیاری با آب مقطر انجام گرفت و اطمینان حاصل شد که یک لایه آب ۵ سانتی متری روی سطح خاک باقی بماند. پس از گذشت ۵ روز، لایه پریفایتون به طور کامل بین سطح خاک و لایه آب شکل گرفت. گلدان ها به مدت ۴۰ روز در گلخانه با دمای بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۸۰ درصد و چرخه نور/تاریکی ۱۰/۱۴ ساعت نگهداری شدند. پس از پایان دوره ۴۰ روزه نسبت به جمع آوری گیاهان رشد کرده و نمونه گیری از خاک هر گلدان اقدام شد. آزمایش های خاک شامل اندازه گیری نیتروژن کل و آمونیوم (Bremner and Keeney, 1966) بودند. پس از سنجش ارتفاع گیاهان و وزن خشک آن ها، بافت گیاهی برای اندازه گیری غلظت نیتروژن مورد استفاده قرار گرفت (Jones, 2001).

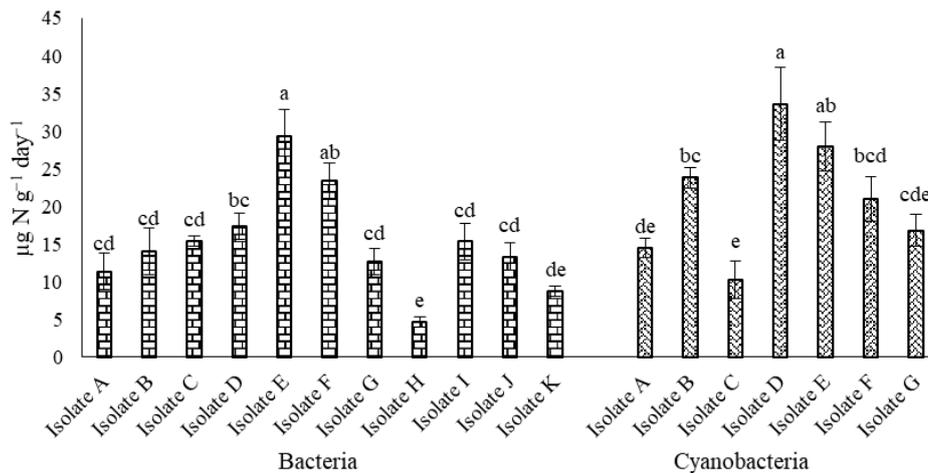
جدول ۱- نقشه تیمار بندی گلدان های آزمون گلخانه ای

کد اختصار	جزئیات تیمارها
A	کنترل منفی (بدون کود نیتروژنی، پریفایتون، باکتری یا سیانوباکتری)
B	جدایه باکتریایی (ایزوله E)
C	جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D)
B+C	جدایه باکتریایی (ایزوله E) + جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D)
P	پریفایتون طبیعی (غنی نشده)
P+B	پریفایتون + جدایه باکتریایی (ایزوله E)
P+C	پریفایتون + جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D)
P+B+C	پریفایتون + جدایه باکتریایی (ایزوله E) + جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D)
U	کنترل مثبت (۱۲۵ کیلوگرم در هکتار کود اوره)

نتایج و بحث

تعیین جدایه های باکتریایی و سیانوباکتریایی برتر در فرآیند تثبیت نیتروژن

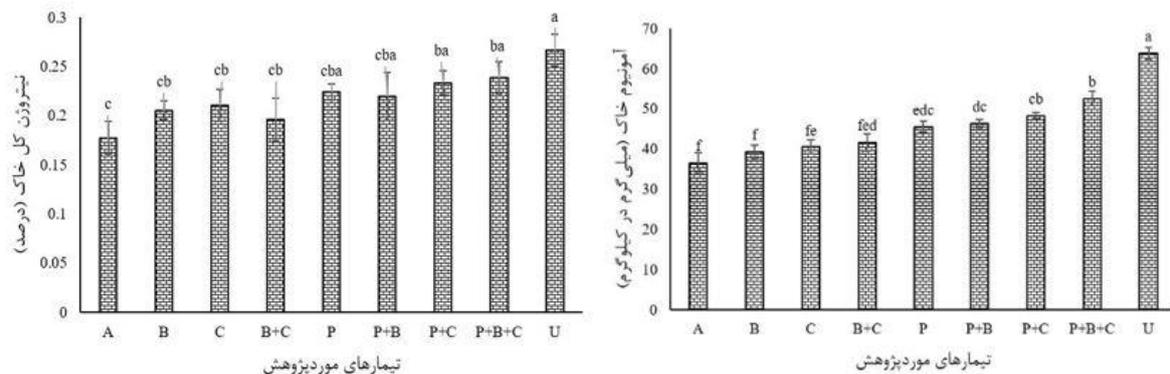
در مجموع ۵۱ جدایه باکتریایی و ۱۹ جدایه سیانوباکتریایی که از نظر مورفولوژی با همدیگر تفاوت داشتند، به ترتیب در محیط کشت های NA و BG11 جداسازی شدند. پس از کشت مجدد این جدایه ها در محیط کشت های بدون نیتروژن، تنها ۱۱ جدایه باکتری در محیط N-Free Agar و ۷ جدایه سیانوباکتری در محیط BG11₀ توانایی رشد داشتند. میزان تجمع نیتروژن در محیط کشت به روش کجلدال در شکل ۱ نشان داده شده است. جدایه باکتری E و جدایه سیانوباکتری D بالاترین میزان تثبیت نیتروژن را در بین جدایه های آزمایش شده نشان دادند. این جدایه ها برای آزمون گلخانه ای کشت برنج انتخاب شدند. تا به امروز، هیچ گزارشی در مورد جداسازی دیازوتروف ها از پریفایتون مزارع شالیزار وجود ندارد. با این حال، مطالعات قبلی ما با موفقیت باکتری ها و قارچ های حل کننده فسفر را از پریفایتون جدا و مستند کرده اند (Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2022; Beheshti et al., 2021).



شکل ۱ - میزان نیتروژن تثبیت شده توسط جدایه های باکتریایی و سیانوباکتریایی در محیط کشت های اختصاصی

اثر تیمارهای مختلف بر میزان نیتروژن کل (N_T) و آمونیوم (NH_4^+) خاک

تیمارهای مختلف به طور قابل توجهی میزان نیتروژن کل و آمونیوم را در خاک افزایش دادند، که نقش حیاتی بیوفیلیم های پریفایتون و میکروارگانیسم های دیازوتروف مرتبط را در چرخه نیتروژن و بهبود حاصلخیزی خاک شالیزارها نشان می دهند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان نیتروژن کل در تیمار اوره به عنوان شاهد مثبت (U) منجر به افزایش ۴۶/۱۵ درصدی گردید، به دنبال آن تیمار P+C+B با ۳۷/۸۳ درصد، تیمار P+C با ۳۱/۵۷ درصد، تیمار P+B با ۲۷/۰۲ درصد و تیمار P با ۲۳/۰۷ درصد در مقابل تیمار A به عنوان تیمار شاهد منفی (۲/۷ درصد) موجب افزایش در میزان نیتروژن خاک شدند. استفاده از کود اوره تحت واکنش هیدرولیز در محلول خاک و با تولید یون های آمونیوم باعث افزایش سطح نیتروژن معدنی در خاک می شود که نقش مهمی در کشاورزی دارد. از طرفی، حضور میکروارگانیسم های دیازوتروف در بیوفیلیم پریفایتون، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را تسریع و فراهمی نیتروژن را تسهیل می کنند.



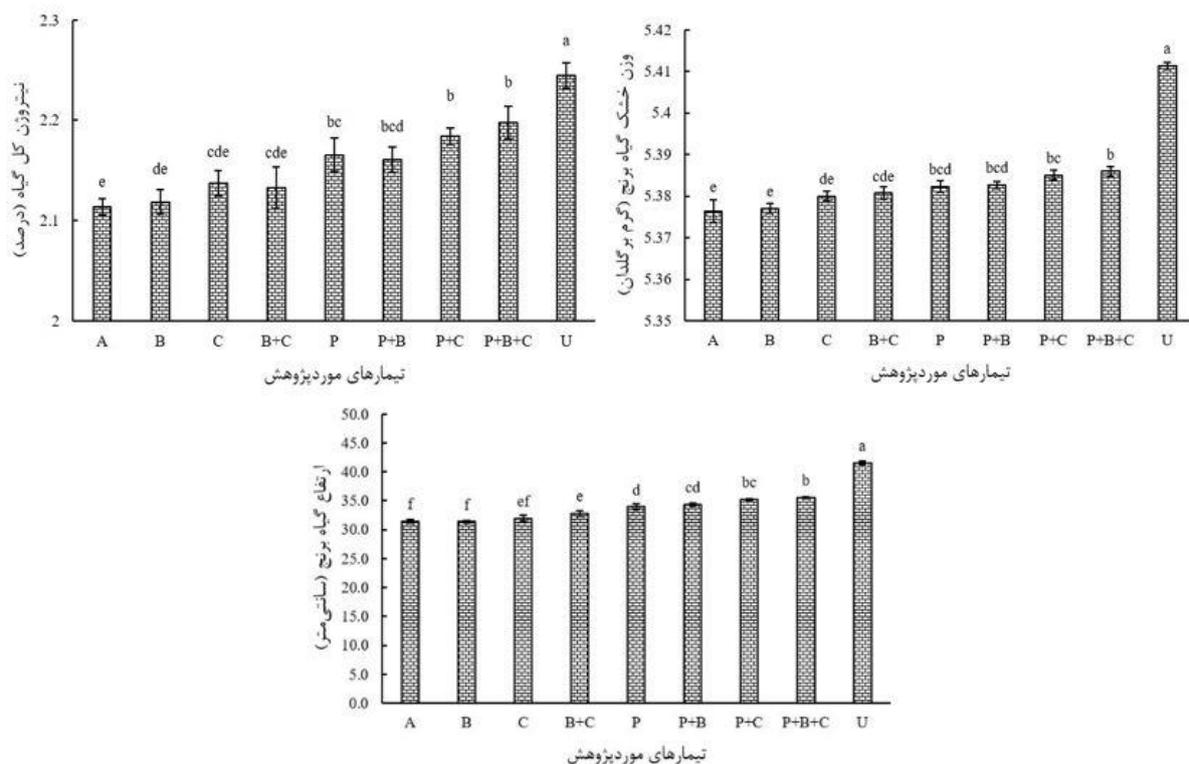
شکل ۲ - میزان نیتروژن کل و آمونیوم خاک در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه

مشابه با نیتروژن کل، میزان آمونیوم (NH_4^+) در تمام تیمارهای حاوی پریفایتون پس از دوره رشد افزایش یافت (شکل ۲). تیمار اوره (U) با ۷۰/۸۳ درصد بیشترین افزایش را نشان داد و پس از آن تیمارهای P+B+C (۴۲/۱۰ درصد)، P+C (۳۰/۵۲ درصد)، P (۲۴/۴۶ درصد)، P+B (۲۳/۹۵ درصد)، B+C (۱۶/۳۰ درصد)، C (۹/۴۷ درصد) و B (۸/۶۰ درصد) موجب افزایش در میزان نیتروژن آمونیومی خاک شدند. این نتایج نشان می دهند که پریفایتون با افزایش فراهمی آمونیوم نقش مهمی در چرخه نیتروژن ایفا می کند. اثربخشی پریفایتون در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن تحت تأثیر عوامل محیطی مانند رطوبت و فراهمی مواد مغذی است (Liao and Inglett, 2014). فعالیت نیتروژنازی در شرایط نوری بالاتر است، این مورد نشان می دهد

که جامعه تثبیت کننده نیتروژن در پریفایتون در درجه اول از سیانوباکتری‌ها تشکیل شده است (Inglett et al., 2004; Liao and Inglett, 2012). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ریشه‌های گیاه تلقیح شده با *Nostoc punctiforme* تشکیل هتروسپیست و فعالیت نیتروژنازی را به دنبال دارد که بر نقش سیانوباکتری‌ها در تثبیت نیتروژن تاکید می‌کند (Alvarez et al., 2020, 2023). این فعل و انفعالات میکروبی به طور قابل توجهی به افزایش میزان آمونیوم خاک کمک می‌کنند که متعاقباً حاصلخیزی خاک و رشد گیاه را در محیط‌های فقیر از مواد مغذی بهبود می‌بخشد. غنی‌سازی بیوفیلم‌های پریفایتونی با میکروارگانیسم‌های دیازوتروف در مدیریت شالیزار، دسترسی نیتروژن را از طریق مستقیم و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن افزایش می‌دهد. این یافته‌ها بر پتانسیل کودهای زیستی مبتنی بر پریفایتون در زراعت پایدار برنج با کاهش اتکا به کودهای شیمیایی و در عین حال بهبود چرخه مواد مغذی و سلامت خاک تاکید می‌کند.

اثر تیمارهای مختلف بر میزان نیتروژن کل (N)، ارتفاع و وزن خشک گیاه برنج

کاربرد تیمارهای حاوی پریفایتون و اوره (U) به طور قابل توجهی مقادیر نیتروژن، ارتفاع و وزن خشک را در گیاهچه‌های برنج پس از یک دوره رشد ۴۰ روزه افزایش دادند (شکل ۳). بیوفیلم پریفایتون به واسطه دارا بودن دیازوتروف‌های اتوتروف و هتروتروف و متعاقب آن از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، افزایش فراهمی این عنصر در شالیزارها را به دنبال دارد و نیتروژن معدنی را برای جذب گیاه برنج در شالیزارها فراهم می‌کند (Jaiswal et al., 2021; Álvarez et al., 2020, 2023). همچنین حضور سیانوباکتری‌ها، انتقال نیتروژن به گیاه برنج را تسهیل می‌کند و سلامت کلی گیاه را از طریق تولید انواع مختلف هورمون‌ها و آنزیم‌های کلیدی تضمین و تولید نهایی محصول را ارتقاء می‌دهند. بیوفیلم پریفایتون علاوه بر جامعه اتوتروفي، طیف وسیعی از هتروتروف‌های تثبیت کننده نیتروژن از قبیل ازتوباکترها و آزوسپریلیوم‌ها را نیز دارا می‌باشد که جمعاً به حفظ و فراهمی نیتروژن در خاک و آب کمک می‌کنند. مشاهده شد که تیمار اوره (U) که به عنوان کنترل مثبت عمل می‌کرد، بالاترین ارتفاع و وزن خشک گیاهچه برنج را با میانگین ارتفاع حدود ۴۱/۵۶ سانتی‌متر و میانگین وزن ۵/۴۱ گرم بر گلدان ثبت کرد. در مطالعات قبلی، کاربرد پریفایتون غنی شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) منجر به بهبود پارامترهای مورفولوژیکی گیاه برنج از جمله افزایش ارتفاع و زیست توده گیاهی شده بود (Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2022; Haghani et al., 2024). نشان داده شده است که که تلقیح با دیازوتروف‌های هتروتروف منجر به افزایش وزن کلی گیاه شد بدین صورت که افزایش قابل توجهی در وزن خشک اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده با این سویه مشاهده شد (۲۵/۹۸ درصد). نتایج این تحقیق بیان داشت که باکتری تثبیت کننده نیتروژن باعث افزایش طول ساقه و وزن خشک گردید (Abod et al., 2019). میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه، رشد برنج را از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله آزادسازی هورمون‌های گیاهی مانند IAA، ترشح سیدروفورها، تثبیت نیتروژن و فعالیت ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید دامیناز افزایش می‌دهند (Etesami, 2019). از طرفی سیانوباکتری‌ها در خاک‌های مختلف از جمله مزارع کشاورزی و شالیزارهای برنج حضور دارند و بخشی از جامعه پروکاریوتی معروف به PGPB هستند. گونه‌های اصلی سیانوباکتریایی تثبیت کننده نیتروژن که در مزارع برنج یافت می‌شوند عبارتند از آنابنا، اولوزیرا، نوستوک، کالوتریکس، تولیپوتریکس، سیتونما و پلکتونما. این سیانوباکتری‌ها نه تنها محصولات را با تثبیت نیتروژن و تولید مواد آلی پشتیبانی می‌کنند، بلکه حلالیت فسفات‌ها را افزایش می‌دهند و به واسطه فتوسنتز، اکسیژن را برای ریشه‌ها فراهم می‌کنند. همچنین انواع هورمون‌ها و ویتامین‌هایی را ترشح می‌کنند که رشد و عملکرد برنج را افزایش می‌دهند (Bao et al., 2021; Prasanna et al., 2015; Renuka et al., 2018).



شکل ۳- میزان نیتروژن کل، ارتفاع و وزن خشک گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیوفیلم پریفایتون همانند ریزوسفر برنج دارای پتانسیل بسیار بالا و نوینی برای جداسازی انواع ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه به منظور بهبود حاصلخیزی خاک و وضعیت تغذیه‌ای گیاه برنج است. پریفایتون با جمعیت متنوع PGPRها، نقش حمایتی مهمی در رشد گیاه برنج ایفا می‌کند. تیمارهای حاوی پریفایتون در مقایسه با سایر تیمارها به نتایج متفاوت و بهتری منجر شدند. علاوه بر این، نتایج نشان داد که غنی‌سازی پریفایتون با باکتری‌ها و سیانوباکتری‌های دیازوتروف، فراهمی نیتروژن را به طور معنی‌داری افزایش داد. نتایج این تحقیق بر پتانسیل استفاده از جوامع میکروبی برای بهبود پایداری سیستم‌های تولید برنج تاکید می‌کند. تحقیقات آتی باید اثرات بلندمدت این عمل را تحت شرایط محیطی مختلف در نظر بگیرد و هدف آن به حداکثر رساندن مزایای آن در شیوه‌های کشاورزی پایدار برنج باشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری انجام شده است.

- Abod, É., Laslo, É., Szentes, S., Lányi, S., & Mara, G. (2019). Plant growth-promoting bacteria: strategies to improve wheat growth and development under sustainable agriculture. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability: From Theory to Practices*, 1-17.
- Alikhani, H. A., Ahmadi, H., Etesami, H., Noroozi, M., Rahmani, H. A., & Emami, S. (2023). Studies on Autotrophic Components of Periphyton in Some Iranian Aquatic Ecosystems. *International Journal of Environmental Research*, 17(2), 24.
- Alikhani, H. A., Beheshti, M., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Asadi Rahmani, H., & Noroozi, M. (2023). Phosphorus Use Management in Paddy Fields by Enriching Periphyton with Its Phosphate-Solubilizing Bacteria and Fungi at the Late Stage of Rice Growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(2), 1896-1912. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01145-2>
- Álvarez, C., Jiménez-Ríos, L., Iniesta-Pallarés, M., Jurado-Flores, A., Molina-Heredia, F. P., Ng, C. K., & Mariscal, V. (2023). Symbiosis between cyanobacteria and plants: from molecular studies to agronomic applications. *Journal of Experimental Botany*, 74(19), 6145-6157.
- Álvarez, C., Navarro, J. A., Molina-Heredia, F. P., & Mariscal, V. (2020). Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the symbiotic strain *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(8), 1040-1045.
- Bao, J., Zhuo, C., Zhang, D., Li, Y., Hu, F., Li, H., Su, Z., Liang, Y., & He, H. (2021). Potential applicability of a cyanobacterium as a biofertilizer and biopesticide in rice fields. *Plant and Soil*, 463, 97-112.
- Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Asadi Rahmani, H., & Noroozi, M. (2022). Enriching periphyton with phosphate-solubilizing microorganisms improves the growth and concentration of phosphorus and micronutrients of rice plant in calcareous paddy soil. *Rhizosphere*, 24, 100590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100590>
- Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Asadi Rahmani, H., & Norouzi, M. (2021). Periphytic biofilm and rice rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria and fungi: A possible use for activating occluded P in periphytic biofilms in paddy fields. *Rhizosphere*, 19, 100395. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100395>
- Bremner, J., & Keeney, D. (1966). Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 3. Exchangeable ammonium, nitrate, and nitrite by extraction-distillation methods. *Soil Science Society of America Journal*, 30(5), 577-582.
- Chen, Z., Dolfing, J., Zhuang, S., & Wu, Y. (2022). Periphytic biofilms-mediated microbial interactions and their impact on the nitrogen cycle in rice paddies. *Eco-environment & health*, 1(3), 172-180.
- Ding, L.-J., Cui, H.-L., Nie, S.-A., Long, X.-E., Duan, G.-L., & Zhu, Y.-G. (2019). Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(5), fiz040.
- Etesami, H. (2019). Plant growth promotion and suppression of fungal pathogens in rice (*Oryza sativa* L.) by plant growth-promoting bacteria. *Field crops: sustainable management by PGPR*, 351-383.
- Fukagawa, N. K., & Ziska, L. H. (2019). Rice: Importance for Global Nutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 65(Supplement), S2-s3. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S2>
- Gholami, M., Sharifi, Z., Karami, Z., Haghghi, S., Minouei, S. F., Zema, D. A., & Lucas-Borja, M. E. (2020). The potential impacts of soil sampling on erosion. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, 4909-4916.
- Haghani, Z., Alikhani, H. A., Amirhosseini, K., Emami, S., & Etesami, H. (2024). Assessing the potential of functionally-enhanced periphyton in supplying rice plant phosphorus nutrition in paddy fields. *Rhizosphere*, 31, 100951. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100951>
- Inglett, P., Reddy, K., & McCormick, P. (2004). Periphyton chemistry and nitrogenase activity in a northern Everglades ecosystem. *Biogeochemistry*, 67, 213-233.
- Jaiswal, P., Dhar, D. W., Sharma, N., Jain, S., Nehra, P., Singh, B., Singh, Y., & Saxena, S. (2021). Evaluating the role of endophytic cyanobacterial isolates on growth promotion and N/P status of rice crop. *Vegetos*, 1-7.
- Jones, J. B. (2001). *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. CRC press.
- Keeney, D., & Bremner, J. (1966). A chemical index of soil nitrogen availability. *Nature*, 211(5051), 892-893.
- Khumairah, F. H., Setiawati, M. R., Fitriatin, B. N., Simarmata, T., Alfaraj, S., Ansari, M. J., Enshasy, H. A. E., Sayyed, R., & Najafi, S. (2022). Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from saline soil improve nitrogen fixation and alleviate salt stress in rice plants. *Frontiers in microbiology*, 13, 905210.
- Lee, S. (2021). Recent advances on nitrogen use efficiency in rice. *Agronomy*, 11(4), 753.
- Liao, X., & Inglett, P. W. (2012). Biological nitrogen fixation in periphyton of native and restored Everglades marl prairies. *Wetlands*, 32, 137-148.

- Liao, X., & Inglett, P. W. (2014). Dynamics of periphyton nitrogen fixation in short-hydroperiod wetlands revealed by high-resolution seasonal sampling. *Hydrobiologia*, 722, 263-277.
- Lu, H., Liu, J., Kerr, P. G., Shao, H., & 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.
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 97.
- Prasanna, R., Adak, A., Verma, S., Bidyarani, N., Babu, S., Pal, M., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2015). Cyanobacterial inoculation in rice grown under flooded and SRI modes of cultivation elicits differential effects on plant growth and nutrient dynamics. *Ecological Engineering*, 84, 532-541.
- Reddy, K. R., DeLaune, R. D., & Inglett, P. W. (2022). Biogeochemistry of wetlands: science and applications. CRC press.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., & Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology advances*, 36(4), 1255-1273.
- Soares, R. A., Roesch, L. F. W., Zanatta, G., de Oliveira Camargo, F. A., & Passaglia, L. M. P. (2006). Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology*, 33(3), 221-234.
- Su, J., Kang, D., Xiang, W., & Wu, C. (2017). Periphyton biofilm development and its role in nutrient cycling in paddy microcosms. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 810-819.
- Tang, A., Haruna, A. O., Majid, N. M. A., & Jalloh, M. B. (2020). Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*, 8(3), 442.
- Wang, B., Zhou, G., Guo, S., Li, X., Yuan, J., & Hu, A. (2022). Improving Nitrogen Use Efficiency in Rice for Sustainable Agriculture: Strategies and Future Perspectives. *Life (Basel)*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/life12101653>
- Wu, Y., Liu, J., & Rene, E. R. (2018). Periphytic biofilms: a promising nutrient utilization regulator in wetlands. *Bioresource technology*, 248, 44-48.
- Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528(7580), 51-59.

Investigating the Effects of Periphyton Biofilm on Nitrogen Availability in Soil and the Improvement of Rice Plant Growth

Mehran Gholami^{*1}, Hossein Ali Alikhani², Hassan Etesami³, Zahra Karami⁴

1- Researcher in Soil Biology and Biotechnology, University of Ottawa, Canada

2- Professor, Department of Soil Science, University of Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Soil Science, University of Tehran, Iran

4- PhD Student in Soil Chemistry and Fertility, University of Tehran, Iran

*mehran.gholami@uottawa.ca

mehrangholami@ut.ac.ir

Abstract

Periphyton biofilms play an important role in the nutrient cycle of both natural and artificial wetlands. These biofilms, which host a diverse community of heterotrophic and autotrophic diazotrophs, contribute significantly to biological nitrogen fixation and enhance soil fertility in rice fields by partially meeting the nitrogen requirements of rice plants. In this study, periphyton samples were collected from rice fields in northern regions of the country, and diazotrophic bacteria were isolated. Various treatments involving periphyton and selected high-performing diazotrophs were applied and monitored over 40 days under greenhouse conditions. The results demonstrated that treatments containing periphyton significantly increased both total nitrogen and ammonium levels in the soil. This enhanced nitrogen availability in the soil solution led to improved plant growth parameters, including increased plant height, dry biomass, and total nitrogen content in the plants. Overall, the findings highlight the high potential of periphyton to supply nitrogen and support the growth of rice plants, thereby reducing the need for synthetic nitrogen fertilizers. The use of periphyton in rice cultivation offers a promising, sustainable approach to enhance soil and plant health. Periphyton-based biofertilizers could serve as a novel and environmentally friendly alternative for sustainable rice farming.

Keywords: Algae, Cyanobacteria, Nitrogen, Paddy field, Periphyton