



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Research Article

Feasibility of Isolating Heterotrophic and Autotrophic Diazotrophs from Periphyton Biofilm in Rice Fields and Evaluating Their Effects on Rice Growth under Greenhouse Conditions

Mehran Gholami¹, Hossein Ali Alikhani^{2*}, Hassan Etesami³, Zahra Karami¹,
Mohaddeseh Shirinzadeh⁴, and Hamidreza Zare Guildehi⁴

1-PhD Student, Department of soil science, University of Tehran, Tehran, Iran.

2-Full professor, Department of soil science, University of Tehran, Karaj, Iran.

3-Associate Professor, Department of soil science, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Former M.Sc. Student of Soil Science, Department of soil science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Article Info

Extended Abstract

Received: 2025-05-24

Accepted: 2025-09-29

Keywords:

Biofertilizer, Biological nitrogen fixation, Cyanobacteria, Nitrogen, Sustainable agriculture.

Corresponding author's email:

halikhan@ut.ac.ir

DOI:

10.22092/SBJ.2025.369574.280

Background and Objectives: Rice, a key staple crop for over half the global population, is mainly grown in Asia and heavily depends on synthetic nitrogen fertilizers, which harm the environment and raise costs. Improving nitrogen use efficiency (NUE) in rice is essential, as current NUE is 28–35%, below the global average. Strategies to enhance NUE include balanced fertilization, slow-release fertilizers, nitrification inhibitors, precision nitrogen management, and breeding for efficient varieties. However, these approaches face challenges like high costs, labor intensity, and technological inaccessibility for small farmers. Biological nitrogen fixation (BNF) offers a promising alternative, using nitrogen-fixing bacteria to enhance NUE and yield while reducing chemical inputs. Studies show rice roots host beneficial bacteria like *Azospirillum* and *Burkholderia*, which support BNF. Yet, their effectiveness can be limited by soil and environmental factors. Periphytic biofilms, formed at the soil-water interface in rice paddies, are emerging as a valuable component in nitrogen cycling. Rich in microorganisms such as cyanobacteria and protozoa, these biofilms stabilize nitrogen in the ecosystem, reduce nitrogen losses, and act as natural biofertilizers. They support nitrogen fixation and nutrient uptake, boosting rice growth. Despite their benefits, periphytic biofilms are understudied. Recent research focuses on isolating nitrogen-fixing bacteria from these biofilms to assess their impact on nitrogen levels and rice growth. This study highlights the potential of diazotrophic biofilm enrichment as a sustainable solution to reduce fertilizer dependency, improve crop productivity, and promote environmental sustainability in rice farming.

Materials and Methods: This study focused on evaluating soil, water, and periphytic biofilms in paddy fields in Gildeh, Iran, to investigate the impact of nitrogen-fixing microorganisms on rice plant nutrition. Soil, water, and periphyton samples were collected and analyzed for chemical properties using standard methods. Soil parameters such as pH, texture, nitrogen, phosphorus, and potassium content were measured. Microbial populations, including fungi and bacteria, were counted using plate count methods. To isolate nitrogen-fixing microbes (diazotrophs), periphyton samples were cultured on selective media. Bacterial and cyanobacterial isolates capable of growing on nitrogen-free media were identified through morphological and genetic analysis using 16S rRNA gene sequencing. *Delftia lacustris* (bacterial) and *Nostoc* sp. (cyanobacterial) were selected for further testing based on their nitrogen-fixing abilities. A greenhouse experiment was conducted in a completely randomized design with three replicates to assess the effects of these isolates, alone and in combination, on rice plant growth. Treatments included natural periphyton, periphyton enriched with isolates, and controls with and without nitrogen fertilizer. Rice seeds were

planted in pots with paddy soil, and periphyton treatments were applied. Growth conditions were controlled, and plants were monitored for 40 days. At the end of the experiment, soil and plant samples were analyzed for nutrient content. Plant height, dry weight, nitrogen (by Kjeldahl method), phosphorus (by spectrophotometry), and potassium (by flame photometry) concentrations were measured. The study aimed to compare the effectiveness of microbial inoculants with chemical fertilizers in enhancing rice plant nutrition, supporting the use of diazotrophic organisms as sustainable alternatives in agriculture.

Results: The study demonstrated that applying periphytic biofilms, enriched with beneficial microorganisms, significantly improved soil fertility by enhancing the availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in paddy fields. The enriched periphyton treatment (P+B+C) increased total soil nitrogen by 37.8% and ammonium by 42.1% compared to the unfertilized control. This improvement is largely due to biological nitrogen fixation carried out by microorganisms such as *Nostoc* species and *Delftia lacustris*, which convert atmospheric nitrogen into forms accessible to plants. Ammonium content also rose across all periphyton treatments after the growth period, indicating the active role of these microbial communities in nitrogen cycling. Soil phosphorus levels increased significantly with periphyton treatments (35%). The biofilms enhanced phosphorus availability by harboring phosphate-solubilizing microorganisms that release enzymes such as phosphatases. These enzymes break down organic phosphorus into forms that plants can absorb. Additionally, the periphyton helped regulate phosphorus availability over time, ensuring a steady supply during different growth stages of rice plants. Potassium availability also improved due to the presence of potassium-solubilizing microorganisms within the periphyton (15.36%). These microbes released substances that aided in converting fixed potassium into soluble forms, which plants can uptake. Periphyton also served as a reservoir, storing potassium early in the plant's development and releasing it when needed later in the growth cycle. Rice plants treated with periphyton showed clear improvements in growth, including greater height, biomass, and higher nutrient content. These benefits were linked to the activity of plant growth-promoting microbes that produce hormones, facilitate nutrient absorption, and protect against stress. Notably, *Delftia lacustris* and *Nostoc* species were crucial contributors to these effects. Overall, periphyton-based treatments offer a sustainable and effective alternative to chemical fertilizers, enhancing nutrient cycling and supporting healthier, more productive rice cultivation systems.

Conclusion: The results show that applying periphyton can significantly improve soil fertility and enhance the nutritional status of rice plants. Periphyton, rich in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), plays a key role in supporting rice growth. Treatments involving periphyton produced better outcomes than other treatments, especially when enriched with *Delftia lacustris* and *Nostoc* species, which greatly increased nitrogen availability compared to natural periphyton and controls. While nitrogen improvement was the main focus, phosphorus and potassium levels in the soil also showed notable increases. These nutrient enhancements supported greater rice plant height and dry weight, highlighting the value of periphyton enrichment in improving soil quality and plant development. The study emphasizes the potential of using microbial communities like periphytic biofilms to promote sustainability in rice production systems. Future research should explore the long-term effects of periphyton application across different environmental conditions to optimize its use in sustainable agriculture worldwide. Understanding the role of these biofilms in nitrogen cycling can inform biofertilization strategies aimed at reducing synthetic fertilizer use and increasing agricultural productivity. Overall, the findings suggest that periphytic biofilms act as important reservoirs for nitrogen-fixing microbes, playing a vital role in nutrient cycling in both aquatic and terrestrial ecosystems.

Cite this article: Gholami, M., L., Alikhani, H.A., Etessami, H., Karami, Z., Shirinzadeh, M., Zare Guildehi, H., 2025. Feasibility of Isolating Heterotrophic and Autotrophic Diazotrophs from Periphyton Biofilm in Rice Fields and Evaluating Their Effects on Rice Growth under Greenhouse Conditions. *Journal of Soil Biology*, 13 (2), 147-169.



DOI: 10.22092/SBJ.2025.369574.280

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

امکان‌سنجی جداسازی تثبیت‌کنندگان نیتروژن اتوتروفی و هتروتروفی از زیست‌لایه پریفایتون در شالیزار و بررسی اثرات آن بر رشد گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای
مهران غلامی^۱، حسینعلی علیخانی^{۲*}، حسن اعتصامی^۳، زهرا کرمی^۱، محدثه شیرین‌زاده^۴ و حمیدرضا زارع گیلدهی^۴

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- استاد پژوهشی، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. halikhan@ut.ac.ir
۳- دانشیار پژوهشی، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۳ پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۷

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی پتانسیل زیست‌لایه پریفایتون و تثبیت‌کنندگان ساکن در آن برای تقویت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و بهبود حاصلخیزی خاک در شالیزارها بود. برای این منظور، نمونه‌های زیست‌لایه پریفایتونی از شالیزارهای استان گیلان جمع‌آوری شد و با تثبیت‌کنندگان جدا شده از خود زیست‌لایه که در آزمون توان تثبیت نیتروژن برتر شناخته شده بودند، غنی‌سازی شدند. به مدت ۴۰ روز در شرایط گلخانه‌ای اثر تیمارهای مختلف بر خاک و گیاه پایش گردید. نتایج نشان داد که زیست‌لایه پریفایتون پتانسیل بسیار بالایی در حاصلخیزی خاک و حمایت از رشد گیاه برنج دارد. تیمار پریفایتون غنی‌شده با باکتری و سیانوباکتری به طور قابل‌توجهی ویژگی‌های خاک از جمله میزان نیتروژن کل (۳۷/۸۳ درصد)، آمونیوم (۴۲/۱ درصد)، فسفر قابل‌جذب (۳۵ درصد) و پتاسیم قابل‌دسترس (۱۵/۳۶) را افزایش داد. حاصلخیزی خاک منجر به افزایش کارایی جذب نیتروژن توسط گیاه شد. افزایش فراهمی نیتروژن در محلول خاک، افزایش در پارامترهای رشد از جمله ارتفاع گیاه، وزن خشک، میزان نیتروژن (۳/۹۷ درصد)، فسفر (۵/۱۸ درصد) و پتاسیم (۵/۲۱ درصد) در بافت گیاهچه‌های برنج را به دنبال داشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که زیست‌لایه‌های موجود در شالیزارهای شمال ایران به مانند ریزوسفر گیاه برنج، میزبان طیف وسیعی از PGPRها از جمله انواع تثبیت‌کنندگان می‌باشند که با بهره‌گیری از آنها، می‌توان راهکاری نوین در کشت محصولی سالم و پایدار ارائه داد. کودهای زیستی مبتنی بر پریفایتون به عنوان روشی جدید می‌توانند سلامت خاک و گیاه را تضمین کنند.

واژه‌های کلیدی: تثبیت زیستی نیتروژن، سیانوباکتری، کشاورزی پایدار، کود زیستی، نیتروژن.

مقدمه

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., 2015; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2023). در این راستا، بهبود کارایی استفاده از نیتروژن در کشت برنج به یک راهکار حیاتی برای شیوه‌های کشاورزی پایدار تبدیل شده است. مصرف سرانه برنج در ایران حدود ۳۷/۵ کیلوگرم و تقاضای سالانه این محصول ۳۵۹۰۰۰۰ تن است (FAO, 2020). کل سطح زیرکشت برنج در این کشور حدود ۵۲۹۰۰۰ هکتار است که منجر به تولید محصول به میزان ۲۳۰۰۰۰۰ تن می‌گردد (Kouchaki-Penchah et al., 2023). طبق گزارشات، رتبه اول تولید برنج در کشور مربوط به استان گیلان و بعد از آن متعلق به استان مازندران است. به دلیل غرقابی بودن اراضی شالیزاری کارایی مصرف کودها در این نواحی پایین است. کارایی مصرف نیتروژن (NUE) برای برنج ۲۸ تا ۳۵ درصد گزارش شده است (Wang et al., 2022). برای بهبود کارایی مصرف نیتروژن در کشت برنج، چندین راهبرد 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. از طرفی تقسیط نیتروژن در طول فصل رشد بهتر می‌تواند با نیازهای محصول هماهنگ باشد. در حالی که راهبردهای بهبود کارایی مصرف نیتروژن در برنج مزایایی را ارائه می‌دهند، اما معایبی نیز دارند. برای مثال، کوددهی مناسب نیاز به آزمون‌های متعدد و پرهزینه خاکشناسی دارد، مهارکننده‌های نیتریفیکاسیون ممکن است در همه خاک‌ها مؤثر نباشند و یا گران باشند. کودهای آهسته‌رهش اغلب گران‌تر از کودهای معمولی هستند، و تقسیط کود نیز زمان و پیچیدگی کار را افزایش می‌دهد (Liu et al., 2023).

تثبیت بیولوژیکی نیتروژن (BNF) یک رویکرد راهبردی برای افزایش کارایی مصرف نیتروژن در کشت برنج است. تحقیقات فراوانی ریزوسفر برنج را به‌عنوان یک مخزن اصلی برای جداسازی تثبیت‌کنندگان نیتروژن موردبررسی قرار داده‌اند (Etesami, 2019; Khumairah et al., 2020; Mahmud et al., 2022). محققان برهمکنش بین گیاه برنج و تثبیت‌کنندگان خاک را افزایش دادند و باعث افزایش تثبیت زیستی نیتروژن و در نتیجه آن، افزایش عملکرد دانه در شرایط کمبود نیتروژن شدند. جنس‌های باکتریایی قابل‌توجه مرتبط با ریشه برنج عبارتند از: *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* و *Azoarcus* (Ding et al., 2019; Etesami, 2019; Mahmud et al., 2020). زیست‌لایه‌های 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 ریزجانداران متنوع (جلبک‌ها، باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، قارچ‌ها و تک‌سلولی‌ها) 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). ریزجانداران متنوع حاضر در زیست‌لایه 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

(TDS)، pH، EC، آمونیوم، نیترات، فسفر و پتاسیم مورد آنالیز قرار گرفتند (Baird et al., 2017). میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید در بافت پریفایتون نیز مورد بررسی قرار گرفتند (Arnon, 1949; Lightenthaler, 1987). نمونه‌های 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، نیترات، EC، کربن آلی و فسفر مورد آنالیز قرار گرفتند (Jones, 2001). همچنین تنفس پایه به روش Joggey (1956) اندازه‌گیری گردید.

جداسازی تثبیت‌کنندگان از زیست‌لایه پریفایتون

برای جداسازی تثبیت‌کنندگان 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 مورد بررسی 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. همچنین فراوانی جلبک‌ها، سیانوباکتری‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها به روش Standard Plate Count (SPC) در زیست‌لایه

یک زیستگاه مناسب برای باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) عمل می‌کنند (Beheshti et al., 2021). غنی‌سازی زیست‌لایه پریفایتون با ریزجانداران حل‌کننده فسفات باعث افزایش کیفیت رشد و تغذیه (مانند فسفر، آهن، روی، منگنز و مس) گیاه برنج شد (Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2022). اگرچه پتانسیل تثبیت نیتروژن باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر برنج قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است، اما اطلاعات بسیار اندکی در مورد پتانسیل تثبیت نیتروژن تثبیت‌کنندگان 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 غنی شده با تثبیت‌کنندگان 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 خاک، آب و زیست‌لایه‌های پریفایتونی از سطح خاک شالیزارهای روستای گیلده ($37^{\circ}08'17.7''N$ $49^{\circ}28'36.2''E$) در استان گیلان انجام شد. در فرآیند نمونه‌برداری از خاک، 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. نمونه‌های آب بلافاصله پس از ورود به آزمایشگاه از نظر میزان اکسیژن‌خواهی بیوشیمیایی (BOD_5)، اکسیژن‌خواهی شیمیایی (COD)، کل جامدات محلول

نوترینت برات، با استفاده از کیت ایزوله از Promega (Madison, WI, USA) انجام شد. تکثیر ژن 16S rRNA از پروتکل‌های ایجاد شده توسط Edwards و همکاران (۱۹۸۹) پیروی کرد. توالی‌یابی توسط شرکت Solgent در کره جنوبی انجام شد. ویرایش توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA حاصل با استفاده از نرم افزار EditSeq (version 5.1) پردازش شد. برای مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با ورودی‌های موجود در بانک اطلاعاتی GenBank، از (BLAST Basic Local Alignment Search Tool) استفاده کردیم. اطلاعات توالی برای سویه باکتریایی به پایگاه داده توالی نوکلئوتیدی GenBank ارسال شد. برای شناسایی مورفولوژیکی جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D)، ویژگی‌های ظاهری بر اساس تصاویر میکروسکوپی و منابع معتبر ارزیابی گردید (Prescott, 1962; Whitford and Schumacher, 1973; John et al., 2002).

تیماربندی و کشت گلخانه‌ای گیاه برنج

برای بررسی اثرات جداگانه جدایه‌های تثبیت‌کننده، پریفایتون طبیعی و پریفایتون غنی‌شده با جدایه‌های تثبیت‌کننده بر تغذیه نیتروژنی گیاه برنج، یک آزمون گلخانه‌ای بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به مدت ۴۰ روز پیاده‌سازی و اجرا گردید. این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه تهران انجام شد. تیمارهای موردآزمایش به شرح زیر بودند:

- (۱) کنترل منفی (بدون کود نیتروژنی، پریفایتون، باکتری یا سیانوباکتری) = A
- (۲) جدایه باکتریایی (ایزوله E) = B
- (۳) جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D) = C
- (۴) جدایه باکتریایی (ایزوله E) + جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D) = B+C
- (۵) پریفایتون طبیعی (غنی‌نشده) = P
- (۶) پریفایتون + جدایه باکتریایی (ایزوله E) = P+B

پریفایتون به دست آمد. میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید نیز ارزیابی و داده‌های حاصل در جدول ۳ آورده شده است.

سنجش کمی برای بررسی توان تثبیت نیتروژن

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 هر کدام 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).

شناسایی جدایه‌های موثر باکتریایی و سیانوباکتریایی

یک جدایه باکتریایی (ایزوله E) و یک جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D) بر اساس قابلیت بالای تثبیت بیولوژیکی نیتروژن انتخاب و متعاقباً شناسایی شدند. این روش شناسایی برای جدایه باکتریایی شامل تعیین توالی بخشی از ژن 16S rRNA و بر اساس پرایمرهای 27F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و 1492R-GGTTACCTTGTTACGACTT بود. شناسایی مولکولی جدایه باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن پس از استخراج DNA ژنومی آن از کشت رشد یافته در محیط

باقی بماند. پس از گذشت ۵ روز، لایه پریفایتون به طور کامل بین سطح خاک و لایه آب شکل گرفت. گلدان‌ها 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.

آنالیزهای مربوط به گلخانه

پس از پایان دوره ۴۰ روزه نسبت به جمع‌آوری گیاهان رشد کرده و نمونه‌گیری از خاک هر گلدان اقدام شد. آزمایش‌های خاک شامل اندازه‌گیری نیتروژن کل، فسفر قابل‌جذب (Olsen, 1954)، پتاسیم قابل‌دسترس (Knudsen et al., 1982) و آمونیوم (Bremner and Keeney, 1966) بودند. پس از سنجش ارتفاع گیاهان و وزن خشک آن‌ها، بافت گیاهی برای اندازه‌گیری غلظت نیتروژن، فسفر و پتاسیم مورد استفاده قرار گرفت (Jones, 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و نمایش گرافیکی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel ایجاد شد که در آن‌ها میله‌های خطا (Error Bars) نشان‌دهنده‌ی میزان خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشند.

نتایج و بحث

مشخصات نمونه‌های خاک، آب و پریفایتون

در (جدول ۱) مشخصات مربوط به نمونه‌های خاک آورده شده است. بافت خاک در کلاس بافتی رسی سیلتی با رنگ 2.5Y 7/3 قرار گرفت. pH خاک در محدوده کمی‌اسیدی و به میزان ۶/۶ ثبت گردید. هدایت الکتریکی خاک به میزان ۰/۱۱ دسی‌زیمنس بر متر اندازه‌گیری شد. میزان ماده آلی خاک حدود ۲ درصد به

(۷) پریفایتون + جدایه سیانوباکتریایی (ایزوله D) =

P+C

(۸) پریفایتون + جدایه باکتریایی (ایزوله E) + جدایه

سیانوباکتریایی (ایزوله D) = P+B+C

(۹) کنترل مثبت (۱۲۵ کیلوگرم در هکتار کود اوره)

U =

به منظور تهیه پریفایتون غنی‌شده و مایه‌های تلقیح از روش‌های مورد استفاده توسط Beheshti و همکاران (2022) استفاده گردید. 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 مورد استفاده بر اساس داده‌های اولیه خاک و مطابق با نشریه موسسه تحقیقات برنج کشور، با استفاده از منابع مختلف کودی (پتاسیم از سولفات پتاسیم ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار، فسفر از سوپرفسفات تریپل ۱۶۵ کیلوگرم در هکتار و نیتروژن ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار (تیمار کنترل مثبت) از اوره) تامین گردید. بذر برنج (رقم هاشمی تهیه شده از موسسه تحقیقات برنج کشور در استان گیلان) با استفاده از محلول هیپوکلریت 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 میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جدایه‌ها، پریفایتون، پریفایتون غنی‌شده با جدایه‌های تثبیت‌کننده که به طور جداگانه و یا کنسرسیوم تهیه شده بودند، به گلدان‌های مخصوص خود اعمال شدند (در تیمارهای B، C و P از پریفایتون، باکتری در غلظت 10^6 الی 10^7 CFU/ml یا سیانوباکتری در غلظت 10^6 الی 10^8 Cells/ml به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جداگانه تهیه شد اما در تیمارهای ترکیبی میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر بین اجزاء زنده تقسیم و و سوسپانسیون کلی تهیه گردید برای مثال جهت تهیه سوسپانسیون P+B میزان ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون پریفایتون با ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری مخلوط گردید). آبیاری با آب مقطر انجام گرفت و اطمینان حاصل شد که یک لایه آب ۵ سانتی‌متری روی سطح خاک

دست آمد. سایر موارد اندازه‌گیری شده در جدول قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۱ – ویژگی‌های خاک نمونه‌گیری شده از شالیزار
Table 1 – Soil characteristics of the paddy field

مقدار	واحد	شاخص
2.5Y 7/3	–	رنگ خاک (Soil Color)
40.22	%	رس (Clay)
5.08	%	شن (Sand)
54.7	%	سیلت (Silt)
رسی سیلتی	–	نوع بافت خاک (Soil texture class)
6.63	–	pH
0.11	dS/m	EC
0.22	%	نیتروژن کل (Total nitrogen)
68	mg/kg	آمونیم (Ammonium)
31	mg/kg	نیترات (Nitrate)
8.9	mg/kg	فسفر (Phosphorus)
173	mg/kg	پتاسیم (Potassium)
2.1	%	ماده آلی (Organic matter)
0.25	mg CO ₂ g ⁻¹ soil 24 h ⁻¹	تنفس پایه (Basal respiration)

مشخصات مربوط به نمونه‌های آب شالیزار در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ – ویژگی‌های آب نمونه‌گیری شده از شالیزار
Table 2 – Water characteristics of the paddy field

مقدار	واحد	پارامتر
12	mg/l	BOD ₅
192	mg/l	COD
7.74	–	pH
0.07	dS/m	EC
14	سانتی‌گراد	دما (Temperature)
50	mg/l	TDS
0.667	mg/l	آمونیاک (Ammonia)
13.28	mg/l	نیترات (Nitrate)
0.09	mg/l	فسفر (Phosphorus)
0.9	mg/l	پتاسیم (Potassium)

در جدول ۳ مشخصات مربوط به نمونه‌های پریفایتون شالیزار آورده شده است.

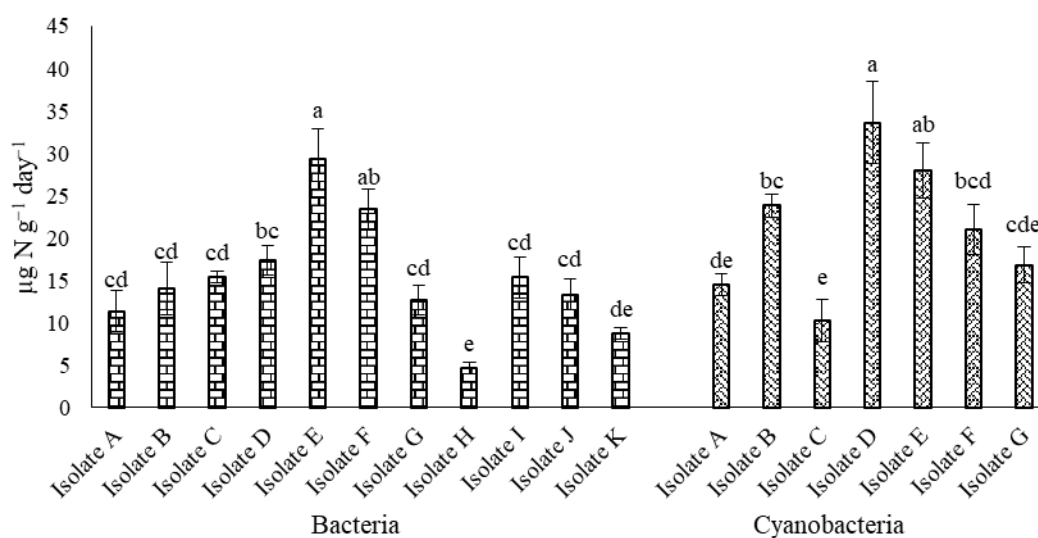
جدول ۳ – ویژگی‌های پریفایتون نمونه‌گیری شده از شالیزار
Table 3 – Periphyton characteristics of the paddy field

مقدار	واحد	پارامتر
61.5	(CFU g ⁻¹ dry soil ⁻¹) × 10 ³	فراوانی جلبک‌ها (Algae)
46.6	(CFU g ⁻¹ dry soil ⁻¹) × 10 ³	فراوانی سیانوباکتری‌ها (Cyanobacteria)
31	(CFU g ⁻¹ dry soil ⁻¹) × 10 ⁴	فراوانی باکتری‌ها (Bacteria)
2.3	(CFU g ⁻¹ dry soil ⁻¹) × 10 ⁴	فراوانی قارچ‌ها (Fungi)
0.174	mg/g	میزان کلروفیل a (Chlorophyll a)
0.020	mg/g	میزان کلروفیل b (Chlorophyll b)
0.675	µg/ml	میزان کاروتنوئید (Carotenoids)

دادند. این جدایه‌ها برای آزمون گلخانه‌ای کشت برنج انتخاب شدند. تا به امروز، هیچ گزارشی در مورد جداسازی تثبیت‌کنندگان از پریفایتون مزارع شالیزاری وجود ندارد. با این حال، مطالعات قبلی ما با موفقیت باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفر را از پریفایتون جدا و مستند کرده‌اند (Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2022; Beheshti et al., 2021). باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در پریفایتون‌های ساکن در اکوسیستم‌های طبیعی دارای آب شیرین مانند تالاب‌های طبیعی و آب شور مانند دریاها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، مکان‌هایی که شرایط برای تشکیل زیست‌لایه و تثبیت نیتروژن مساعد است (Chen et al., 2020; Su et al., 2017; Wu et al., 2018).

تعیین جدایه‌های 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 کشت‌های NA و BG11 جداسازی شدند. پس از کشت مجدد این جدایه‌ها در محیط کشت‌های 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 جدایه‌های آزمایش شده نشان



شکل ۱ - میزان تجمع نیتروژن کل در محیط کشت بدون نیتروژن
Figure 1 – Total nitrogen content in nitrogen-free culture medium

Nostoc sp. شناسایی کرد. گونه‌های *Delftia* به طور خاص در موضوع زیست‌لایه‌های پریفایتون در تحقیقات بررسی نشده‌اند، اما به عنوان بخشی از جوامع میکروبی متنوع شناخته می‌شوند که ممکن است شامل زیست‌لایه‌ها نیز باشند (Borsodi et al., 2007). گونه‌های *Delftia* به دلیل تطبیق‌پذیری متابولیک، از جمله قابلیت بالقوه در تثبیت نیتروژن مورد توجه قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال،

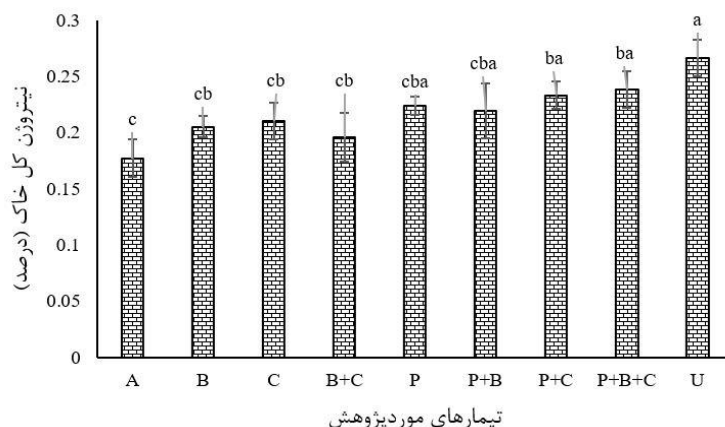
شناسایی جدایه‌های باکتریایی و سیانوباکتریایی برتر در فرآیند تثبیت نیتروژن

شناسایی مولکولی ایزوله باکتریایی نشان داد که جدایه E ۹۹/۷۹ درصد شباهت به *Delftia lacustris* دارد (شماره دسترسی PV500579). تجزیه و تحلیل‌های مورفولوژیکی نیز جدایه سیانوباکتری D را به عنوان

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

تیمارهای مختلف به طور قابل‌توجهی میزان نیتروژن کل و آمونیوم را در خاک افزایش دادند، که نقش حیاتی زیست‌لایه‌های پریفایتون و ریزجانداران تثبیت‌کننده مرتبط را در چرخه نیتروژن و بهبود حاصلخیزی خاک شالیزارها نشان می‌دهند. 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 یون‌های آمونیوم باعث افزایش سطح نیتروژن معدنی در خاک می‌شود که نقش مهمی در کشاورزی دارد. از طرفی، حضور ریزجانداران تثبیت‌کننده، از جمله *Delftia lacustris* و *Nostoc sp.* در زیست‌لایه پریفایتون، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را تسریع و فراهمی نیتروژن را تسهیل می‌کنند. گونه‌های *Delftia* به دلیل توان بالا در فعالیت نیتروژن‌سازی شناخته شده‌اند (Arvind et al., 2011; Han et al., 2005; Tang et al., 2020). سیانوباکتری‌های راسته *Nostocales* نقش اساسی در تبدیل آنزیمی نیتروژن اتمسفر به اشکال آلی و معدنی ایفا می‌کنند (Prasanna et al., 2011).

سویه *Delftia tsuruhatensis* از ریزوپلان برنج جدا و گزارش شد که فعالیت تثبیت نیتروژن قابل توجهی در محیط‌کشت‌های بدون نیتروژن نشان می‌دهد (Han et al., 2005). در تحقیق دیگری چنین بیان شده است که این باکتری دارای ژن *nifH* ضروری برای تثبیت نیتروژن است و همچنین رشد و مورفوزنر گیاه را تحریک می‌کند (Agafonova et al., 2017). مطالعاتی وجود دارند که جداسازی گونه‌های نوستوک را از خاک‌های شالیزاری مستند کرده‌اند. یکی از این مطالعات ساختار جامعه میکروبی را بررسی و حضور سیانوباکتری‌های مختلف از جمله نوستوک را گزارش کرد (Bharti et al., 2009; Saadatnia and Riahi, 2017). گونه‌های *Nostoc* به طور قابل‌توجهی پیچیدگی ساختاری زیست‌لایه‌ها را از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی افزایش می‌دهند. این سیانوباکتری‌ها کلنی‌های گسترده‌ای را تشکیل می‌دهند که به ساختار فیزیکی زیست‌لایه‌ها کمک و در عین حال تعاملات میکروبی متنوعی را در محیط خود تسهیل می‌کنند (Saha et al., 2021; Teikari et al., 2024). به دلیل برخی محدودیت‌های مالی و زمانی، پژوهشگران به شناسایی مورفولوژیکی گونه سیانوباکتری حاضر در این مطالعه اکتفا کردند که توصیه می‌گردد در مطالعات آتی نسبت به شناسایی مولکولی سیانوباکتری نیز اقدام گردد.

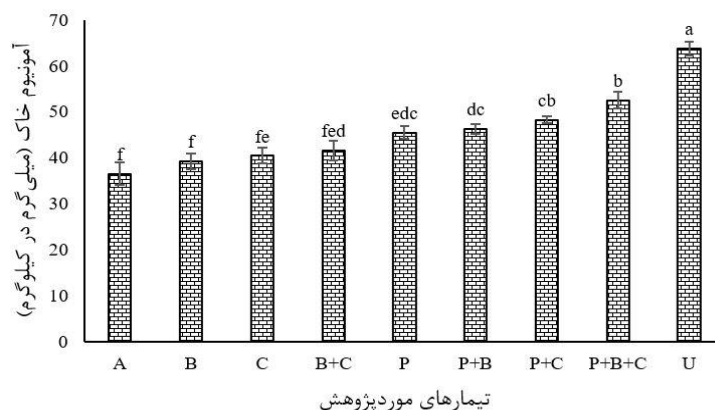


شکل ۲- میزان نیتروژن کل خاک در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. کنترل منفی A، جدایه باکتریایی B، جدایه سیانوباکتریایی C، جدایه باکتریایی + جدایه سیانوباکتریایی B+C، پریفایتون طبیعی P، پریفایتون + جدایه باکتریایی P+B، پریفایتون + جدایه سیانوباکتریایی P+C، پریفایتون + جدایه باکتریایی + جدایه سیانوباکتریایی P+B+C، کنترل مثبت U.

Figure 2 - Total soil nitrogen content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Negative control A, bacterial isolate B, cyanobacterial isolate C, bacterial isolate + cyanobacterial isolate B+C, natural periphyton P, periphyton + bacterial isolate P+B, periphyton + cyanobacterial isolate P+C, periphyton + bacterial isolate + cyanobacterial isolate P+B+C, positive control U.

نشان داده‌اند که ریشه‌های گیاه تلقیح‌شده با *Nostoc punctiforme* تشکیل هتروسیست و فعالیت نیتروژنازی را به دنبال دارد که بر نقش سیانوباکتری‌ها در تثبیت نیتروژن تاکید می‌کند (Alvarez et al., 2020, 2023). از دیگر سو، فعالیت نیتروژنازی بالای باکتری *Delftia lacustris* از روش Acetelyne Reduction Assay اثبات شده است (Arvind et al., 2011). 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 زیست‌لایه‌های پریفایتونی با ریزجانداران تثبیت‌کننده 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.

مشابه با نیتروژن کل، میزان آمونیوم (NH_4^+) در تمام تیمارهای حاوی پریفایتون پس از دوره رشد افزایش یافت (شکل ۳). 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 می‌دهند که پریفایتون با افزایش فراهمی آمونیوم نقش مهمی در چرخه نیتروژن ایفا می‌کند. 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 می‌دهد که جامعه تثبیت‌کننده نیتروژن در پریفایتون در درجه اول از سیانوباکتری‌ها تشکیل شده است (Inglett et al., 2004; Liao and Inglett, 2012). مطالعات قبلی



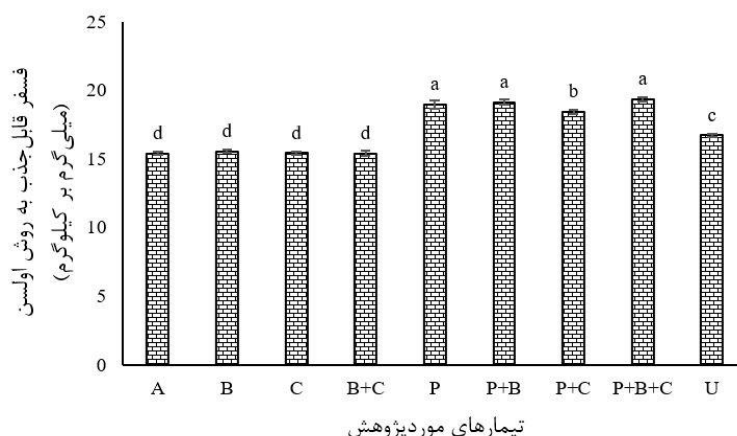
شکل ۳ - میزان آمونیوم خاک در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 3 - Total soil ammonium content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

۱۱/۰۲ درصد و U با ۳/۸۷ درصد به ترتیب موجب افزایش پتاسیم محلول خاک شدند. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که زیست‌لایه پریفایتون می‌تواند دسترسی گیاه به فسفر در اراضی شالیزاری را به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از ریزجاندانان حل‌کننده فسفات، از جمله انواع باکتری‌ها و قارچ‌ها، بهبود بخشد (Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2021, 2022). گزارش شده است که استفاده از پریفایتون در مراحل بعدی رشد برنج می‌تواند هم به عنوان منبع فسفر و هم به عنوان یک فعال‌کننده عمل کند و غلظت فسفر موجود در خاک را افزایش دهد. فراهمی زیستی فسفر تنظیم‌شده توسط پریفایتون با نیازهای گیاه برنج مطابقت دارد و کارایی استفاده از فسفر را در شالیزارهای دارای خاک آهکی بهبود می‌بخشد (Haghani et al., 2024).

اثر تیمارهای مختلف بر میزان فسفر قابل جذب (P) و پتاسیم قابل دسترس (K) خاک

همانطور که در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است، تیمارهای حاوی پریفایتون به طور قابل‌توجهی فراهمی فسفر (P) و پتاسیم (K) را در خاک در طول زمان افزایش دادند. در روز ارزیابی نهایی، فسفر قابل‌جذب ۳۵/۰۱ درصد در تیمار P+B+C، ۳۲/۲۲ درصد در تیمار P+B، ۳۱/۳۹ درصد در تیمار P و ۲۳/۸۳ درصد در تیمار P+C افزایش یافت. تیمار U نیز موجب افزایش ۱۷/۰۱ درصدی در فسفر قابل‌جذب خاک گردید. به طور مشابه، تیمارهای حاوی پریفایتون منجر به افزایش پتاسیم قابل دسترس شدند. به طوری که تیمارهای P+B+C با ۱۵/۳۶ درصد، P+C با ۱۲/۸۳ درصد، P با ۱۱/۵۸ درصد، P+B با

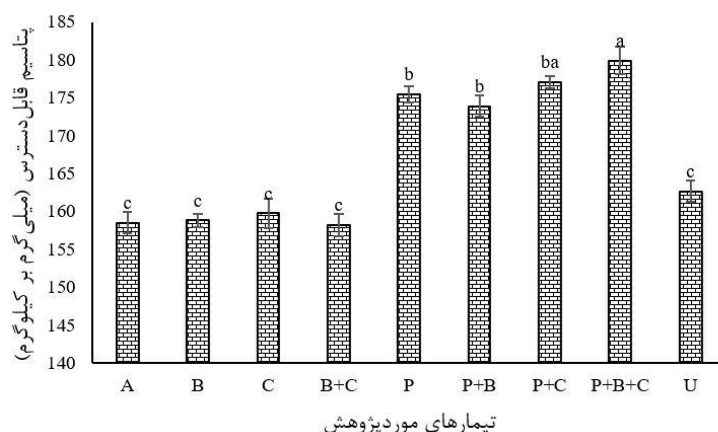


شکل ۴- میزان فسفر قابل جذب خاک در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 4 - Available soil phosphorus content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

که پریفایتون سطوح ریز متخلخلی را فراهم می‌کند که به عنوان مکان‌های جذب عناصر مغذی عمل می‌کنند و به دسترسی پایدار پتاسیم کمک می‌کنند (Alikhani et al., 2023). علاوه بر این موارد، اجزای فوتوتروف در پریفایتون به ویژه جلبک‌ها، برای فرآیندهای متابولیکی خود به پتاسیم نیاز دارند که منجر به نوسانات موقت در سطوح پتاسیم آب و خاک می‌شود. با این حال، پریفایتون می‌تواند به طور موثر پتاسیم را در مراحل اولیه رشد گیاه ذخیره کند و از تلفات آن جلوگیری کرده و آن را در مراحل بعدی چرخه رشد گیاه در دسترس قرار دهد. با استفاده از توانایی‌های طبیعی این جوامع میکروبی نوین برای انحلال مواد نامحلول و تنظیم پویایی و بازچرخش عناصر مغذی، کشاورزان می‌توانند عملکرد محصول را بهینه کنند و در عین حال اتکا به کودهای شیمیایی را کاهش دهند.

نشان داده شده است که خاک‌های شالیزاری دارای پریفایتون طبیعی باعث افزایش سطح Olsen-P می‌گردند (Wu et al., 2018). زیست‌لایه‌های پریفایتونی از طریق ترشح فسفات‌ها نقش مهمی در تبدیل فسفر آلی به اشکال معدنی (عمدتاً ارتوفسفات) دارند (Sharma et al., 2005; Weigelhofer et al., 2018). علاوه بر این، جلبک‌ها به حفظ سطح فسفر آلی در خاک و آب کمک می‌کنند (Al-Maliki and Ebreesum, 2020). در مورد پتاسیم، گزارش شده است که میکروبیوم‌های اپی‌فایتیک، به ویژه باکتری‌های آزادکننده پتاسیم (KSB) و قارچ‌های مرتبط با پریفایتون، نقش پیشگامی در تشکیل و تثبیت زیست‌لایه ایفا می‌کنند و باعث افزایش آزادسازی پتاسیم و میزان آن در محلول خاک می‌شوند. پژوهشگران مشاهده کردند که بالاترین غلظت پتاسیم موجود در محیط کشت غنی از بیوتیت به ۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم رسید. به طوری



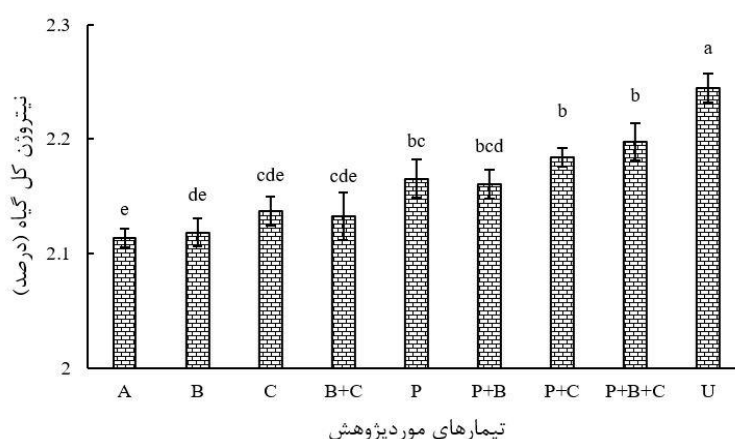
شکل ۵- میزان پتاسیم قابل‌دسترس خاک در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 5 - Available soil potassium content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

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.

اثر تیمارهای مختلف بر میزان نیتروژن کل (N)، فسفر (P) و پتاسیم (K) گیاه برنج

کاربرد تیمارهای حاوی پریفایتون و اوره (U) به طور قابل توجهی مقادیر نیتروژن، فسفر و پتاسیم کل را در گیاهچه‌های برنج پس از یک دوره رشد ۴۰ روزه افزایش دادند (شکل‌های ۶، ۷ و ۸). زیست‌لایه پریفایتون به واسطه دارا بودن تثبیت‌کنندگان اتوتروف و هتروتروف و متعاقب

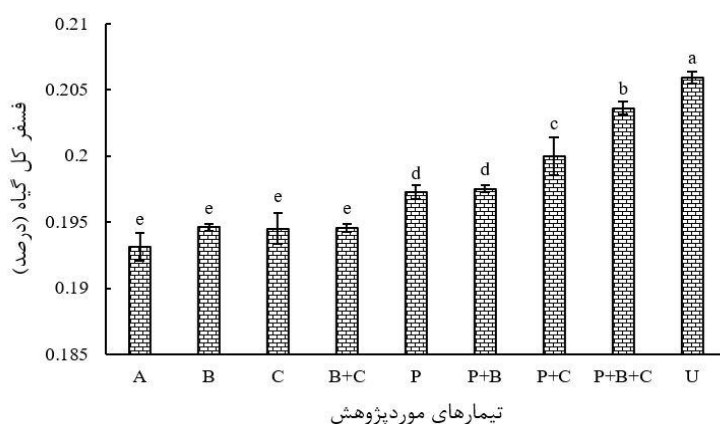


شکل ۶- میزان نیتروژن کل گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 6 - Total plant nitrogen content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

حفظ و قابلیت جذب فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاه برنج را فراهم می‌کنند. پریفایتون به سرعت فسفر ورودی از کود شیمیایی را در مراحل اولیه انباشت می‌کند و سپس از طریق تجزیه میکروبی، فراهمی زیستی فسفر را افزایش می‌دهد (Abod et al., 2019; Jørgensen et al., 2009). همچنین ریزجانداران ساکن در پریفایتون مواد مخاطی ترشح می‌کنند که به جذب فسفر محلول کمک و از تلفات فسفر جلوگیری می‌کنند و در نتیجه کارایی مصرف فسفر را بهبود می‌بخشند (Karageorgiou et al., 2007).

زیست‌لایه پریفایتون علاوه بر جامعه اتوتروفی، طیف وسیعی از هتروتروف‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از قبیل ازتوباکترها و آزوسپریلیوم‌ها را نیز دارا می‌باشد که جمعاً به حفظ و فراهمی نیتروژن در خاک و آب کمک می‌کنند. از دیگر سو، پریفایتون با دربرداشتن انواع باکتری‌ها و قارچ‌های آزادکننده پتاسیم و حل‌کننده فسفات موجبات



شکل ۷ - میزان فسفر کل گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

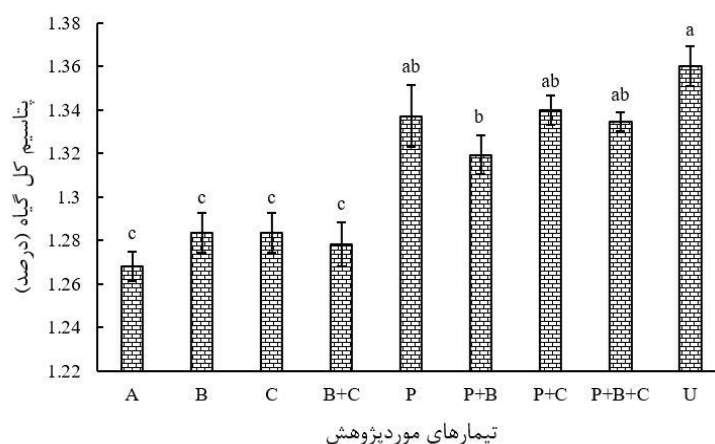
Figure 7 - Total plant phosphorus content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

خلاصه، پریفایتون میزبان مجموعه متنوعی از ریزوباکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) می‌باشد که نیاز به ادغام آن در سیستم‌های کشت برنج را افزایش می‌دهد. به طور کلی پریفایتون با طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، حل‌کننده فسفر و آزادکننده پتاسیم توانایی بالایی در تامین اشکال معدنی و قابل جذب این عناصر در محلول خاک ایفا می‌کند اما بر طبق نمودارها، توانایی و ترجیح گیاه در وهله اول و شرایط خاک و محیط در وهله دوم عوامل تعیین‌کننده برای اثربخشی نهایی این فراهمی‌ها بر خود گیاه برنج هستند. به عنوان مثال کاربرد کود اوره در حد کفایت (تیمار U) موجب افزایش جذب و تجمع این عناصر (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) در بافت گیاه گردید در حالی که تیمارهای حاوی پریفایتون موجب

در مورد عنصر پتاسیم، اگرچه این عنصر در خاک به وفور یافت می‌شود، اما اکثریت آن به صورت ثابت وجود دارد و فقط حدود دو درصد از آن برای جذب گیاه در دسترس است (Jalali et al., 2021). آزادکنندگان پتاسیم، حلالیت این عنصر را از طریق اسیدی کردن، تولید سیدروفور و ترشح پلیمرهای خارج سلولی افزایش می‌دهند، که در مجموع به افزایش فراهمی پتاسیم کمک می‌کند (Bahadur et al., 2019; Jain et al., 2022). با توجه به نیاز بالای گیاه برنج به پتاسیم، کاربرد پریفایتون با کودهای پتاسیمی می‌تواند به حفظ تعادل مواد مغذی و جلوگیری از بیش مصرفی و تلفات این عنصر در شالیزارها کمک کند (Raheb and Heidari, 2012; Towfighi, 1998; Yaghoubi Khanghahi et al., 2018). به طور

را به شدت افزایش دادند، اما سرعت جذب و تأثیر آن بر رشد در کوتاه‌مدت همچنان در تیمار کود شیمیایی محلول (تیمار U) بالاتر بود. این موضوع تفاوت کلیدی بین فراهمی بیولوژیکی و دسترسی فوری شیمیایی عناصر را برجسته می‌کند.

بیشترین فراهمی این عناصر در محلول خاک شده بودند اما مصرف کود اوره (تیمار U) در این پژوهش نتایج نهایی را غیرقابل انتظار کرد و این نکته مهم‌ترین موردی است که محققان باید در تحقیقات آینده و همچنین در توصیه به زارعان برنج به آن توجه ویژه نمایند. این یافته نشان می‌دهد که اگرچه تیمارهای بیولوژیک فراهمی عناصر در خاک



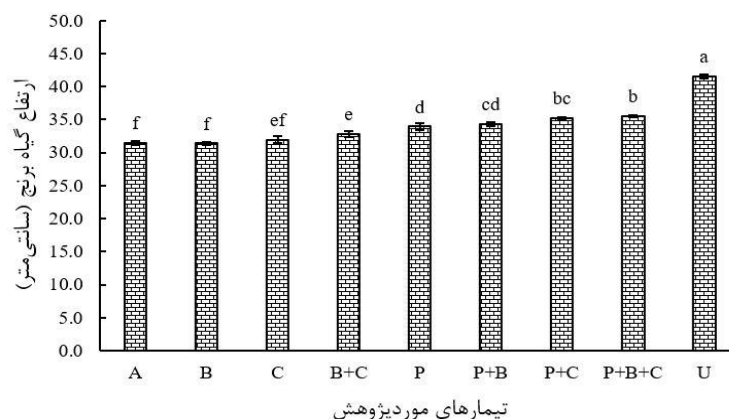
شکل ۸- میزان پتاسیم کل گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 8 - Total plant potassium content in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

محرك رشد گیاه (PGPB) منجر به بهبود پارامترهای مورفولوژیکی گیاه برنج از جمله افزایش ارتفاع و زیست توده گیاهی شده بود (Alikhani et al., 2021; Alikhani, Beheshti, et al., 2023; Beheshti et al., 2022; Haghani et al., 2024; Leylasi Marand et al., 2025). *Delftia* sp. جداشده از ریزوسفر به عنوان یک باکتری محرك رشد گیاه شناخته می‌شود. به طوری که *Delftia* sp. دارای توانایی تولید سیدروفورها و ایندول استیک‌اسید (IAA) هستند، اگرچه این مطالعات سویه‌های *Delftia lacustris* را به عنوان تولیدکننده سیدروفور ذکر نکرده‌اند (Han et al., 2005).

اثر تیمارهای مختلف بر میزان ارتفاع و وزن خشک گیاه برنج

تیمارهای دارای پریفایتون، چه طبیعی و چه غنی شده با جدایه‌ها، به طور قابل توجهی ارتفاع و وزن خشک بوته‌های برنج را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دادند (شکل‌های ۹ و ۱۰). 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 غنی‌شده با باکتری‌های

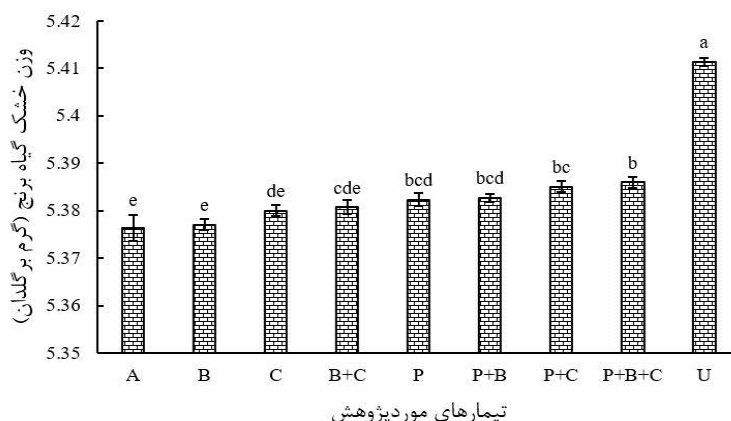


شکل ۹- میزان ارتفاع گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 9 - Plant height in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

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). دریافتند که طول ریشه و ارتفاع ساقه گیاهچه‌های برنج ۱۰ روزه پس از تلقیح با سیانوباکتری، نسبت به شاهد، پنج برابر افزایش یافت. پژوهشگران جمعیت سیانوباکتریایی را از پنج گروه مختلف فیلوژنتیکی برای تلقیح به کرت‌های برنج انتخاب کردند. آن‌ها گزارش کردند که وضعیت گیاه برنج در کرت‌های تلقیح شده، سبزتر و سالم‌تر از کنترل‌های غیرتلقیح شده به نظر می‌رسند. همچنین اندازه‌گیری‌های مرتبط با آنالیز خوشه و دانه نشان داد که تعداد بیشتری از دانه‌های سنگین‌تر در هر خوشه از کرت‌های تلقیح شده وجود دارند (Iniesta-Pallarés et al., 2021).

نشان داده شده است که که تلقیح با سویه *Delftia lacustris* 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 *Delftia lacustris* باعث افزایش طول ساقه و وزن خشک گردید (Abod et al., 2019). ریزجانداران 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-کربوکسیلیک‌اسید دامیناز افزایش می‌دهند (Etesami, 2019; Khosravi et al., 2025). 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 تثبیت‌کننده نیتروژن که در مزارع برنج یافت می‌شوند عبارتند از آنابنا، آلولوزیرا، نوستوک، کالوتریکس، تولیپوتریکس، سیتونما و پلکتونما. این



شکل ۱۰ - میزان وزن خشک گیاه در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۴۰ روزه کشت گیاه برنج در گلخانه. برای توضیحات تیمارها به عنوان شکل ۲ مراجعه شود.

Figure 10 - Plant dry weight in different treatments after the 40-day rice cultivation period in the greenhouse. Refer to caption of Fig. 2 for description of treatments.

این عمل را تحت شرایط محیطی مختلف در نظر بگیرد و هدف آن به حداکثر رساندن مزایای آن در شیوه‌های کشاورزی پایدار برنج در سطح ایران باشد. علاوه بر این، درک بیشتر از نقش این زیست‌لایه در چرخه نیتروژن، کاربردهای پنهان بالقوه‌ای در راهبردهای مربوط به کودهای زیستی خواهد داشت که برای افزایش بهره‌وری زراعت برنج و در عین حال کاهش اتکا به کودهای شیمیایی می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند. در مجموع، این یافته‌ها بر پتانسیل زیست‌لایه‌های پریفایتونی به‌عنوان مخازنی جدید برای جداسازی تثبیت‌کننده‌های پرتوان نیتروژن، که به چرخه این عنصر و سایر مواد مغذی در تالاب‌های طبیعی و مصنوعی کمک می‌کنند، تأکید می‌کند.

سپاسگزاری

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

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که زیست‌لایه 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. همانطور که توسط یافته‌ها نشان داده شد، 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 *Delftia lacustris* و *Nostoc sp.* فراهمی نیتروژن را به طور معنی‌داری افزایش داد. اگرچه هدف اصلی این پژوهش بر فراهمی نیتروژن متمرکز بود، اما مشاهده شد که سطوح فسفر (P) و پتاسیم (K) در خاک نیز بهبود قابل‌توجهی را تجربه کردند. نتایج این تحقیق بر پتانسیل استفاده از جوامع میکروبی برای بهبود پایداری سیستم‌های تولید برنج تأکید می‌کند. تحقیقات آتی باید اثرات بلندمدت

References

1. 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.
2. Agafonova, N., Doronina, N., Kaparullina, E., Fedorov, D., Gafarov, A., Sazonova, O., Sokolov, S., & Trotsenko, Y. A. (2017). A novel Delftia plant symbiont capable of autotrophic methylotrophy. *Microbiology*, 86, 96-105.
3. Al-Maliki, S., & Ebreesum, H. (2020). Changes in soil carbon mineralization, soil microbes, roots density and soil structure following the application of the arbuscular mycorrhizal fungi and green algae in the arid saline soil. *Rhizosphere*, 14, 100203.
4. 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.
5. 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>
6. Alikhani, H., Ahmadi, H., Etesami, H., Noroozi, M., Asadi Rahmani, H., & Emami, S. (2021). Study of periphyton (algae flora) community in aquatic ecosystems of Guilan province. *Journal of Soil Biology*, 9(1), 29-39. (In Persian).
7. 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.
8. 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.
9. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1.
10. Arvind, G., Sood, S., Rahi, P., Thakur, R., Chauhan, S., & Nee Chadha, I. C. (2011). Diversity analysis of diazotrophic bacteria associated with the roots of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(6), 545-555.
11. Bahadur, I., Maurya, R., Roy, P., & Kumar, A. (2019). Potassium-solubilizing bacteria (KSB): a microbial tool for K-solubility, cycling, and availability to plants. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability: From Theory to Practices*, 257-265.
12. Baird, R. B., Eaton, A. D., & Rice, E. W. (Eds.). (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association.
13. 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.
14. 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.

15. Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabae, A. A., Etesami, H., Asadi Rahmani, H., & Noroozi, 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>
16. Bharti, A., Velmourougane, K., & Prasanna, R. (2017). Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2729-2744.
17. Borsodi, A. K., Rusznyák, A., Molnár, P., Vladár, P., Reskóné, M. N., Tóth, E. M., Sipos, R., Gedeon, G., & Márialigeti, K. (2007). Metabolic activity and phylogenetic diversity of reed (*Phragmites australis*) periphyton bacterial communities in a Hungarian shallow soda lake. *Microbial ecology*, 53, 612-620.
18. 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.
19. Chen, X., Chen, X., Zhao, Y., Zhou, H., Xiong, X., & Wu, C. (2020). Effects of microplastic biofilms on nutrient cycling in simulated freshwater systems. *Science of the Total Environment*, 719, 137276.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Gholami, M., Sharifi, Z., Karami, Z., Haghighi, 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.
24. 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>
25. Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., & Song, W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and applied microbiology*, 28(1), 66-76.
26. Inglett, P., Reddy, K., & McCormick, P. (2004). Periphyton chemistry and nitrogenase activity in a northern Everglades ecosystem. *Biogeochemistry*, 67, 213-233.
27. Iniesta-Pallarés, M., Álvarez, C., Gordillo-Cantón, F. M., Ramírez-Moncayo, C., Alves-Martínez, P., Molina-Heredia, F. P., & Mariscal, V. (2021). Sustaining rice production through biofertilization with N2-fixing cyanobacteria. *Applied Sciences*, 11(10), 4628.
28. Jaggi, W. (1976). Die Bestimmung der CO₂-Bildung als Maß der bodenbiologischen Aktivität. *Schweiz Landwirtschaft Forschung Band*, 15(314), 317-380.
29. Jain, D., Saheewala, H., Sanadhaya, S., Joshi, A., Bhojiya, A. A., Verma, A. K., & Mohanty, S. R. (2022). Potassium solubilizing microorganisms as soil health

- engineers: An insight into molecular mechanism. In *Rhizosphere engineering* (pp. 199-214). Elsevier.
30. 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.
31. Jalali, M., Antoniadis, V., & Najafi, S. (2021). Assessment of trace element pollution in northern and western Iranian agricultural soils: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1-30.
32. John, D. M., Whitton, B. A., & Brook, A. J. (2002). *The freshwater algal flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press.
33. Jones, J. B. (2001). *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. CRC press.
34. Jørgensen, N. O., Brandt, K. K., Nybroe, O., & Hansen, M. (2009). *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2195-2199.
35. Karageorgiou, K., Paschalis, M., & Anastassakis, G. N. (2007). Removal of phosphate species from solution by adsorption onto calcite used as natural adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 139(3), 447-452.
36. Keeney, D., & Bremner, J. (1966). A chemical index of soil nitrogen availability. *Nature*, 211(5051), 892-893.
37. Khosravi, H., Otadi, A., Alikhani, H., & Etesami, H. (2025). Evaluation and Comparative Analysis of Plant Growth-Promoting Traits in Diverse Groups of Rhizosphere Bacteria. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 235-260. (In Persian).
38. 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.
39. Knudsen, D., Peterson, G., & Pratt, P. (1982). Lithium, sodium, and potassium. *Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties*, 9, 225-246.
40. Kouchaki-Penchah, H., Alizadeh, M. R., & Aghamolki, M. T. K. (2023). Measuring eco-efficiency of rice cropping systems in Iran: An integrated economic and environmental approach. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 57, 103281.
41. Leylasi Marand, M., Alikhani, H., Pourbabaee, A. A., & Shariati, S. (2025). Comparison of the plant growth-stimulating ability of epiphyton and epiphyton microbial communities in some rice fields of Guilan province. *Journal of Soil Biology*. (In Persian).
42. Liao, X., & Inglett, P. W. (2012). Biological nitrogen fixation in periphyton of native and restored Everglades marl prairies. *Wetlands*, 32, 137-148.
43. 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.
44. Lightenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
45. Liu, Y., Hu, B., & Chu, C. (2023). Toward improving nitrogen use efficiency in rice: Utilization, coordination, and availability. *Current Opinion in Plant Biology*, 71, 102327.
46. 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.
47. Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 97.
48. Olsen, S. R. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. US Department of Agriculture.
49. 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.
50. Prasanna, R., Singh, R. N., Joshi, M., Madhan, K., Pal, R. K., & Nain, L. (2011). Monitoring the biofertilizing potential and establishment of inoculated cyanobacteria in soil using physiological and molecular markers. *Journal of Applied Phycology*, 23, 301-308.
51. Prescott, G. W. (1962). *Algae of the western Great Lakes*. Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, Germany.
52. Raheb, A., & Heidari, A. (2012). Effects of clay mineralogy and physico-chemical properties on potassium availability under soil aquatic conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(4), 747-761.
53. Reddy, K. R., DeLaune, R. D., & Inglett, P. W. (2022). *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*. CRC press.
54. 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.
55. Saadatnia, H., & Riahi, H. (2009). Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant, Soil and Environment*, 55(5), 207-212.
56. Saha, S., Bulzu, P.-A., Urajová, P., Mareš, J., Konert, G., Câmara Manoel, J., Macho, M., Ewe, D., Hrouzek, P., & Masojídek, J. (2021). Quorum sensing signals from epibiont mediate the induction of bioactive peptides in mat-forming cyanobacteria *Nostoc*. *BioRxiv*, 2021.2004.2023.441229.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Teikari, J. E., Russo, D. A., Heuser, M., Baumann, O., Zedler, J. A., Liaimer, A., & Dittmann, E. (2024). Competition and interdependence define multifaceted interactions of symbiotic *Nostoc* sp. and *Agrobacterium* sp. under inorganic carbon limitation. *bioRxiv*, 2024.2007.2016.603663.
61. Towfighi, H. (1998). Study of rice response to potassium fertilizer in paddy soils of northern Iran. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 29, 869-883.
62. 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>

63. Weigelhofer, G., Ramião, J. P., Pitzl, B., Bondar-Kunze, E., & O'Keeffe, J. (2018). Decoupled water-sediment interactions restrict the phosphorus buffer mechanism in agricultural streams. *Science of the Total Environment*, 628, 44-52.
64. Wu, Y., Liu, J., & Rene, E. R. (2018). Periphytic biofilms: a promising nutrient utilization regulator in wetlands. *Bioresource technology*, 248, 44-48.
65. Yaghoubi Khanghahi, M., Pirdashti, H., Rahimian, H., Nematzadeh, G., & Ghajar Sepanlou, M. (2018). Potassium solubilising bacteria (KSB) isolated from rice paddy soil: from isolation, identification to K use efficiency. *Symbiosis*, 76, 13-23.
66. 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.