



Investigating the role of periphyton types in the release and uptake of insoluble phosphorus in an in vitro experiment

Mehdi Beheshti¹, Hosseinali Alikhani^{✉2}, Ahmad Ali Pourbabaei³, Hassan Etesami⁴, Hadi Asadi Rahmani⁵, Mostafa Noroozi⁶

1. Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: m.beheshti@ut.ac.ir

2. Corresponding Author, Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: halikhan@ut.ac.ir

3. Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: pourbabaei@ut.ac.ir

4. Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hassanetesami@ut.ac.ir

5. Soil and Water Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: asadi_1999@yahoo.com

6. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran. Email: Noroozi.mostafa@alzahra.ac.i

Article Info

ABSTRACT

Article type: Research Article

Article history:

Received: Oct. 2, 2021

Revised: June. 23, 2022

Accepted: June. 26, 2022

Published online: Aug. 23, 2022

Keywords:

Phosphate-solubilizing bacteria,
Periphyton,
Slow-release fertilizer,
Phosphorus,
Algae.

Periphyton is a biological layer that is widely present in flood plains such as paddy fields and plays an important role in the nutrient cycle in such ecosystems. The role of this biological layer in dissolving and absorbing insoluble phosphorus in the country's paddy fields has not been recognized so far. This study was performed in the research laboratory of the department of soil science and engineering, university of Tehran in 2020 to investigate the role of periphyton grown in paddy fields of Guilan province in the release and absorption of phosphorus. For this purpose, 20 paddy fields in Guilan province were sampled from epipelton (LON) and epiphyton (TON). The results showed that about 68% of the population of autotrophic components in epipelton and epiphyton samples belonged to *Chlorella* and *Chlorococcum*. The genera *Lyngbya*, *Scenedesmus*, *Nostoc* and *Navicula* were the most abundant in the next ranks. The results of phosphate dissolution showed that samples of LON 6 and 13 and TON 8 have the highest solubility of phosphorus. Phosphorus uptake capacity was also very high in LON 6 and 13 samples and increased by 1840 and 2000% compared to the initial biomass, respectively. This amount was 825 percent in the TON 8. The results also showed that epipelton samples showed a higher ability than epiphyton samples in terms of phosphorus absorption and retention. In general, the results of this study showed that the periphytic biofilm has a high ability to absorb phosphorus, which reduces the waste of fertilizer used and therefore helps to increase its efficiency, and thus reduces non-point pollution.

Cite this article: Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Asadi Rahmani, H., & Noroozi, M. (2022). Investigating the role of periphyton types in the release and uptake of insoluble phosphorus in an in vitro experiment. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 53 (6), 1387-1402.

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.



DOI: <http://doi.org/10.22059/ijswr.2022.341492.669243>

بررسی نقش انواعی از پریفایتون در آزادسازی و جذب فسفر نامحلول در یک آزمایش درون شیشه‌ای

مهدی بهشتی^۱، حسینعلی علیخانی^۲، احمد علی پوربابایی^۳، حسن اعتصامی^۴، هادی اسدی رحمانی^۵، مصطفی نوروزی^۶۱. گروه مهندسی و علوم خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ایمیل: m.beheshti@ut.ac.ir۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی و علوم خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ایمیل: h.alikhan@ut.ac.ir۳. گروه مهندسی و علوم خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ایمیل: pourbabaei@ut.ac.ir۴. گروه مهندسی و علوم خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ایمیل: hassanetesami@ut.ac.ir۵. مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ایمیل: asadi_1999@yahoo.com۶. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. ایمیل: Noroozi.mostafa@alzahra.ac.ir

اطلاعات مقاله چکیده

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۶/۱

واژه‌های کلیدی:

باکتری حل‌کننده فسفات، پریفایتون، کود کندرها، فسفر، جلبک.

پریفایتون یک لایه زیستی است که به‌طور گسترده در زمین‌های غرقابی مانند شالیزارها حضور دارد و نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی در این اکوسیستم‌ها ایفا می‌کند. تاکنون، به نقش این لایه زیستی در انحلال و جذب فسفر نامحلول در شالیزارهای کشور پرداخته نشده است. این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۹ با هدف بررسی نقش پریفایتون‌های رشد کرده در شالیزارهای استان گیلان در آزادسازی و جذب فسفر انجام شد. برای این منظور از ۲۰ مزرعه شالیزایی استان گیلان از دو بخش اپی‌پلون (LON) و اپی‌فایتون (TON) نمونه‌برداری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که حدود ۶۸ درصد جمعیت اجزای اتوتروف در نمونه‌های اپی‌پلون و اپی‌فایتون مربوط به دو جنس *Chlorococcum* و *Chlorella* بود. جنس‌های *Lynghya*، *Navicula* و *Nostoc Scenedesmus* در رتبه‌های بعدی بیشترین فراوانی قرار داشتند. نتایج انحلال فسفات نشان داد که نمونه LON ۶ و ۱۳ و ۸ بیشترین توان انحلال فسفر را دارند. توان جذب فسفر در نمونه LON ۶ و ۱۳ نیز بسیار بالا بود و نسبت به زیست‌توده اولیه به ترتیب ۱۸۴۰ و ۲۰۰۰ درصد افزایش یافته است. این مقدار در نمونه ۸ TON برابر ۸۲۵ درصد بود. همچنین نتایج نشان داد که نمونه‌های اپی‌پلون توانایی بالاتری نسبت به نمونه‌های اپی‌فایتون از نظر جذب و نگهداری فسفر دارند. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که پریفایتون توانایی بالایی در جذب فسفر دارد که این به کاهش هدر رفت کود مصرف شده منجر می‌شود و به افزایش کارایی آن کمک شایانی می‌نماید و از این جهت منجر به کاهش آلودگی غیرنقطه‌ای می‌شود.

استناد: بهشتی، مهدی؛ علیخانی، حسینعلی؛ پوربابایی، احمدعلی؛ اعتصامی، حسن؛ اسدی رحمانی، هادی؛ نوروزی، مصطفی (۱۴۰۱). بررسی نقش انواعی از پریفایتون در آزادسازی و جذب فسفر نامحلول در یک آزمایش درون شیشه‌ای. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۳ (۶)، ۱۴۰۲-۱۳۸۷.

DOI: <http://doi.org/10.22059/ijswr.2022.341492.669243>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

به دلیل افزایش جمعیت و محدود بودن زمین‌های کشاورزی، خاک‌های شالیزاری معمولاً بیش از حد کوددهی می‌شوند. کارایی مصرف فسفر در شالیزارها کم بوده و تنها حدود ۲۰-۱۰ درصد است، و این باعث هدر رفت زیاد فسفر به آب‌های سطحی می‌شود (Shen et al., 2004; Wang et al., 2016). اگر چه، مدیریت‌های مختلفی مانند تغییر نوع کود، روش مصرف کود و کنترل رطوبت تاکنون به کار گرفته شده است، با این حال کارایی مصرف کود هنوز نیز به حد مطلوبی نرسیده است (Song et al., 2019; Wang et al., 2016). فسفر یک ماده غذایی ضروری برای رشد محصولات کشاورزی است و تأمین کافی آن در خاک حیاتی است (Zhang et al., 2008). با این حال فسفر مهم‌ترین عامل در بروز پدیده سرشارسازی^۱ از طریق افزایش غیرطبیعی رشد و تکثیر جلبک‌های مضر در آب‌های سطحی است (Smith and Schindler, 2009). بر این اساس، آزادسازی فسفر در تالاب‌های طبیعی باید کنترل شود (Lu et al., 2016). اما کنترل آن از منابع آلودگی‌های غیر نقطه‌ای مانند رواناب کشاورزی معمولاً دشوار است. مزارع شالیزاری یکی از منابع مهم آلودگی‌های غیر نقطه‌ای فسفر محسوب می‌شوند (Wu et al., 2018). فسفر معمولاً به عنوان کود پایه قبل از کشت برنج در کشاورزی سنتی استفاده می‌شود (Ayaga et al., 2006; Lan et al., 2012). به دلیل اینکه جذب فسفر به وسیله برنج در مرحله جوانه‌زنی کم است، مقدار اضافی فسفر به وسیله ذرات خاک تثبیت می‌شود یا از مزارع شالیزاری زهکش می‌شود (Arai and Sparks, 2007; Igwe et al., 2010; Lan et al., 2012). فسفر در دسترس در طول مراحل حساس گلدهی و بلوغ برنج که تقاضای فسفر زیاد است، محدود است. چنین عدم تطابقی در تأمین فسفر عامل اصلی کارایی کم فسفر و زهکش فسفر در شالیزارهاست (MacDonald et al., 2011; Yang and Lu, 2014; Zhou and Zhu, 2003). بنابراین مدیریت راهبردی با توجه به فرآیندهای بیوشیمیایی حاکم در خاک‌های غرقاب برای بهبود کارایی مصرف فسفر و کاهش ورود آن به رواناب‌ها ضروری است. عموماً بیشتر تحقیقات در زمین‌های غرقاب مصنوعی مانند شالیزارها تنها بر دو فاز آبی و خاکی متمرکز شده و اهمیت جامعه میکروبی بین آن‌ها به عنوان سومین فاز نادیده گرفته می‌شود (Lu et al., 2017). جلبک‌های رشته‌ای با پیوستن به سطح خاک/ رسوب و تشکیل اجتماع با باکتری، قارچ و دیگر میکرو و مزو ارگانسیم‌های خاک (برای مثال پروتوزا و متازوا) لایه‌ای را تشکیل می‌دهد که به عنوان لایه زیستی پرفیایتیک^۲ شناخته می‌شود (Wu et al., 2016; Liu et al., 2017). نقش پرفیایتون در چرخه عناصر غذایی در زیست‌بوم‌های آبی به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است، اگر چه اخیراً، علاقه به نقش آن در شالیزارها گسترش یافته است (Koski-Vähälä and Hartikainen, 2001; Li et al., 2017; Scinto and Reddy, 2003). پرفیایتون می‌تواند بدون توجه به وضعیت ماده غذایی، روی سطح خاک در شالیزارها گسترش یابد، اگر چه ترکیب میکروبی آن می‌تواند با گذشت زمان و همچنین با توجه به سطح ماده غذایی تغییر کند (Scinto and Reddy, 2003; Wang et al., 2013). تقسیم‌بندی انواع پرفیایتون معمولاً بر اساس سطح بستر تشکیل آن‌ها انجام می‌گیرد. برای مثال، اپی‌پلون‌ها^۳ پرفیایتون‌هایی هستند که بر سطح خاک و اپی‌فایتون‌ها^۴ پرفیایتون‌هایی هستند که در سطح ساقه گیاه برنج در شالیزارها تشکیل می‌شوند (Martin, 2019). عوامل متعددی مانند نوع و مقدار رس، pH، پتانسیل رداکس، میزان فسفر کل خاک اولیه، جامعه میکروبی، غلظت اکسیدهای آهن و آلومینیوم در شرایط اسیدی، و مقدار کربنات کلسیم در خاک‌های قلیایی می‌توانند فراهمی زیستی فسفر را در خاک‌های شالیزاری تحت تأثیر قرار دهند (Shafqat and Pierzynski, 2014). گزارش شده است که پرفیایتون نقشی اساسی در چرخه فسفر دارد و می‌تواند به عنوان یک منبع فسفر بالقوه در تالاب‌ها عمل کند (Dodds, 2003; Drake et al., 2012). از یک طرف، پرفیایتون میل زیادی به فسفر دارد و می‌تواند از طریق به دام انداختن (Dodds, 2003)، اسیمله کردن^۵ (Liu et al., 2016)، جذب (Lu et al., 2014a)، یا هم‌رسوبی^۶ (Borovec et al., 2010) آن را به طور مؤثری از آب خارج کند و از طرف دیگر، پرفیایتون می‌تواند آنزیم‌های خارج سلولی مانند فسفاتاز قلیایی ترشح کند که می‌تواند فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی را به فسفر محلول تبدیل کند (Ellwood et al., 2012; Lu et al., 2014b). پرفیایتون به دلیل اینکه بیشتر از جمعیت فتوتروفیک تشکیل شده است در طی فرآیند فتوستنتز CO₂ را مصرف کرده و O₂ آزاد می‌کند، که این منجر به افزایش pH می‌شود (Hayashi et al., 2012; Zhang et al., 2013). باکتری‌های تجمع دهنده پلی فسفات مانند *Acinetobacter*

۱ Eutrophication

۲ Periphytic Biofilm

۳ Epipelton

۴ Epiphyton

۵ Assimilation

۶ Co-precipitation

Pesudomonas قادر به جذب مقادیر زیاد فسفر به صورت معدنی و ذخیره آن به صورت پلی فسفات داخل سلولی هستند (Carvalho et al., 2007; Oehmen et al., 2014). Roeselers et al (2007) گزارش کردند که پیش تیمار بستر توسط *Betaproteobacteria* رشد و چسبندگی *Microcoleus vaginatus* را به سطوح پلی کربنات سرعت می بخشد. فسفر از طریق رسوب با یون های کلسیم و منیزیم در pH بالا و تشکیل هیدروکسی آپاتیت (Lu et al., 2016) و جذب سطحی با تشکیل پیوند هیدروژنی با پلی ساکاریدهای ترشح شده از جلبک ها و باکتری ها از آب سطحی جذب و خارج شود (Li et al., 2013). مطالعات گذشته مشخص کرده است که برخی از جلبک ها در توده پریفایتون قادر به تشکیل مواد معدنی کربناته مانند کلسیت بر روی سطوح ریز خود هستند که به جذب فسفر توسط لایه زیستی پریفایتون کمک می کند (Scinto and Reddy, 2003). گزارش شده است که ریزسازواره های حل کننده فسفات در آب و رسوبات به فراوانی حضور دارند و در انحلال Ca-P بسیار مؤثر هستند (Fankem et al., 2006; Maitra et al., 2015). با فرض بر این که پریفایتون تنظیم کننده مهمی برای زیست فراهمی فسفر خاک است با کاهش قابل توجه محتوای فسفر در آب شالیزار، فسفر محلول در آب، فسفر به آسانی در دسترس، فسفر موجود در توده جلبک و فسفر قابل دسترس را در خاک های شالیزاری افزایش می دهد (Koski-Vähälä and Hartikainen, 2001). باین حال، این اثر بالقوه سودمند پریفایتون در چرخه فسفر در مراحل اساسی (اولیه یا اواخر) رشد برنج در شالیزار کم مورد توجه قرار گرفته است (Hayashi et al., 2012). بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی نقش پریفایتون در جذب و آزادسازی فسفر از منبع نامحلول فسفر در یک آزمایش درون شیشه ای طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

نمونه برداری از توده پریفایتون

برای نمونه برداری در سال ۱۳۹۹ از ۲۰ مزرعه شالیزار در استان گیلان انتخاب و در هر نقطه از دو بخش اپی پلون (LON) و اپی فایتون (TON) به وسیله کاردک ضد عفونی شده نمونه برداشته و درون لوله های آزمایش استریل قرار داده و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران منتقل شدند (Yang et al., 2016). جدول ۱ نقاط نمونه برداری شده مزارع شالیزار در استان گیلان را نشان می دهد.

جدول ۱- مختصات نقاط نمونه برداری از شالیزارهای استان گیلان

شماره نمونه	منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	فسفر قابل جذب (خاک) (mg. kg ⁻¹)	فسفر محلول (آب) (mg. L ⁻¹)	فسفر کل (آب) (mg. L ⁻¹)
۱	رستم آباد	E 49 3058.63	N 36 5235.23	۱۲	۰/۸	۲۵
۲	سیاهکل	E 49 5203.36	N 370744.99	۲۵/۲	۲	۳۲
۳	آستانه اشرفیه	E 49 5529.38	N 371812.82	۸/۸	۱	۲۷
۴	لشت نشاء	E 49 5322.82	N 372106.42	۶/۳	۱/۵	۳۰
۵	کوچه اصفهان	E 49 4737.75	N 371617.25	۷/۸	۱/۶	۳۰
۶	خشکاروندان	E 49 54 02.6	N 371622.9	۸/۲	۱/۸	۳۱
۷	خشک بیجار	E 49 4534.05	N 372117.03	۳۲	۰/۷۵	۲۳
۸	فرشم بالا	E 49 4228.88	N 372054.39	۲۱/۲	۱/۳	۲۸
۹	باغچه بنه	E 49 4604.98	N 372355.05	۱۴	۱/۸	۲۴
۱۰	مریدان	E 500904.47	N 370700.06	۱۳	۰/۶۸	۱۸
۱۱	کوچصفهان - محله لاله دشت	E 49 4522.91	N 371650.40	۱۶/۶	۱/۴	۲۳
۱۲	سنگر	E 49 4159.20	N 371222.00	۲۵/۲	۰/۹	۲۰
۱۳	شفت	E 492337.64	N 371040.72	۹/۹	۱/۲	۱۸
۱۴	ایستگاه گیله پردر سر ۱	E 49 3933.69	N 371153.50	۱۰	۱/۳	۲۵
۱۵	ایستگاه گیله پردر سر ۲	E 49 3932.63	N 371200.43	۱۱/۲	۱/۵	۲۶
۱۶	مرکز تحقیقات برنج ۱	E 49 3731.20	N 371217.77	۲۲/۹	۰/۸	۱۸
۱۷	مرکز تحقیقات برنج ۲	E 49 3733.48	N 371219.28	۲۴	۰/۷۵	۱۷
۱۸	فشتام	E 49 3906.30	N 370942.27	۱۳/۳	۰/۵	۱۲
۱۹	جعفر آباد ۱	E 49 4244.11	N 371635.03	۱۸/۹	۰/۶۵	۱۵
۲۰	جعفر آباد ۲	E 49 4318.24	N 371544.69	۱۹/۳	۰/۸	۱۷

کشت نمونه‌های پریفایتون

به منظور کشت و تکثیر نمونه‌های پریفایتون ۱۰ گرم از توده پریفایتون را برداشته و به باریل ۱ لیتری حاوی محیط کشت BG11 (۲۰ میلی‌گرم در لیتر Na_2CO_3 ، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر NaNO_3 ، ۴۰ میلی‌گرم در لیتر K_2HPO_4 ، ۷۵ میلی‌گرم در لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۶ میلی‌گرم در لیتر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۴/۹۴ میلی‌گرم در لیتر $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۸۶ میلی‌گرم در لیتر H_3BO_4 ، ۱/۸۱ میلی‌گرم در لیتر $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، عناصر ریزمغذی: ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر ZnSO_4 ، ۰/۳۹ میلی‌گرم در لیتر Na_2MoO_4 ، ۰/۰۷۹ میلی‌گرم در لیتر $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ و ویتامین‌ها: ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر B_{12} ، ۰/۳۳ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بیوتین) اضافه نموده و تعداد ۱۰ عدد از حامل‌های فایبرگلاس ابعاد 2×2 سانتی‌متر) استریل به محیط اضافه گردید. ظروف حاوی پریفایتون در فیتوترون شبیه‌سازی شده با محیط شالیزار در دوره نوری/تاریکی ۱۴ ساعت، دمای 26°C و شدت نور 12000 لوکس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد به مدت ۱ ماه نگهداری شدند. به منظور هوادهی نمونه‌ها درب باریل به صورت نیمه بسته بود و به صورت روزانه با دست شیک می‌شدند. بعد از یک ماه لایه‌ی زیستی پریفایتون بر روی سطح حامل گلاسی تشکیل شدند (Lu et al., 2016).

مطالعات میکروسکوپی اجزای اتوتروف پریفایتون

برای مطالعات میکروسکوپی ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط کشت‌های جامد (BBM-agar، BG11 و f/2) استریل (121°C) نموده و داخل ظروف پتری استریل هشت سانتی‌متری ریخته شد. از هر کدام از نمونه‌های پریفایتون سری‌های رقت تا 10^{-6} را با استفاده از آب مقطر استریل و از هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و مرکز هر ظرف پتری ریخته و با استفاده از میله شیشه‌ای استریل پخش گردید. 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 اجزای مذکور بر روی هر ظرف پتری، تک کلنی‌ها را برداشته (هر تک کلنی که با بقیه از نظر رنگ، اندازه، شکل متفاوت 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 (Yang et al., 2016). پس از خالص‌سازی اجزا پریفایتون، مطالعات میکروسکوپی از نمونه‌های جلبک، سیانو باکتری و دیاتوم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ انجام و عکس برداری صورت گرفت. شناسایی نمونه‌های جلبک، سیانوباکتری و دیاتوم با استفاده از کلیدهای رده‌بندی (Skulberg et al., 1993; Wehr et al., 2015) انجام شد. در نهایت، درصد اجزای اتوتروف مختلف در نمونه‌ها محاسبه گردید.

مطالعه فراوانی کل باکتری‌ها و انواع حل‌کننده فسفات

برای شمارش کل باکتری‌ها ۱۰ گرم از توده پریفایتون به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد. سوسپانسون به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. رقت‌های دهدهی تا 10^{-6} تهیه و از هر رقت یک‌دهم میلی‌لیتر در سه تکرار روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی سیکلوهگزیمید (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پخش شده و ظروف پتری در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. شمارش تعداد کلنی‌ها روزانه به مدت یک هفته از زمان کشت انجام شد (Gronewold and Wolpert, 2008). برای شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفات، از رقت دهدهی تا 10^{-5} و از هر رقت مقدار یک‌دهم میلی‌لیتر در سه تکرار روی محیط کشت اسپربر^۱ حاوی سیکلوهگزیمید (گلوکز؛ ۱۰ گرم، عصاره مخمر؛ ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم با هفت مولکول آب؛ ۰/۲۵ گرم، ۲/۵ تری‌کلسیم فسفات؛ ۲/۵ گرم، آگار؛ ۱۵ گرم در لیتر به اضافه ۱۰۰ میلی‌گرم سیکلوهگزیمید در لیتر) پخش شده و ظروف پتری در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. برای شناسایی و شمارش کلنی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از خصوصیت شفاف‌سازی محیط پیرامون کلنی (هاله بی‌رنگ) آنها استفاده شده و شمارش بصورت روزانه تا ۱۴ روز برای غربالگری اولیه جدایه‌های دارای توانایی انحلال فسفات (در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس) انجام شد و جمعیت باکتری‌های دارای پتانسیل انحلال فسفات نامحلول در توده پریفایتون شمارش گردید (Delvasto et al., 2008).

مطالعه فراوانی کل قارچ‌ها و انواع حل‌کننده فسفات

برای شمارش کل قارچ‌ها نیز از همان سوسپانسیون 10^{-1} تهیه شد قبلی رقت‌های دهدهی تا 10^{-4} تهیه و از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر



در سه تکرار روی محیط کشت PDA حاوی ۰/۰۱۴ گرم رزبنگال و ۰/۰۶ گرم استرپتومایسین پخش شده و پتری دیش‌ها در دمای ۳۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. شمارش تعداد قارچ در ظرف مدت دو هفته از زمان کشت انجام شد (Yamamoto et al., 2019). برای شمارش قارچ‌های حل‌کننده فسفات رقت‌های تا 10^{-4} از سوسپانسیون آماده‌شده برای شمارش کل قارچ‌ها، استفاده و از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در سه تکرار روی محیط اسپربر جامد حاوی رزبنگال (۰/۰۱۴ گرم در لیتر) و استرپتومایسین (۰/۰۶ گرم در لیتر) پخش شده و ظروف پتری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس نگهداری گردید. برای شناسایی و شمارش قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خصوصیت تشکیل هاله شفاف پیرامون کلنی (هاله شفاف) استفاده شد و شمارش ظرف مدت ۱۴ روز بعد از کشت انجام گردید و جمعیت قارچ‌های دارای پتانسیل انحلال فسفات نامحلول در توده پریفایتون شمارش گردید (Adhikari and Pandey, 2019).

آزمون توان انحلال فسفات نامحلول توسط توده پریفایتون در محیط BG11 اصلاح شده

برای انجام آزمون انحلال فسفات نامحلول توسط لایه زیستی پریفایتون ابتدا نمونه‌ها در محیط BG11 اصلاح‌شده (بدون منبع فسفر) به مدت ۲ هفته در فیتوترون کشت داده شد. پس از رشد توده پریفایتون، نمونه‌ها چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع BG11 اصلاح‌شده که در آن فرم‌های مختلف فسفر موجود در محیط حذف و به جای آن‌ها فسفر از منبع فسفات نامحلول تری کلسیم فسفات به مقدار ۵ گرم در لیتر اضافه شده بود انتقال داده شدند. نمونه‌ها در داخل فیتوترون در شرایط ذکرشده بخش اول به مدت ۱ ماه نگهداری شد. در بازه‌های زمانی روز صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ام از محیط نمونه‌برداری و پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۵۰۰g و مدت زمان ۱۰ دقیقه مقدار فسفر محلول و pH محیط نیز اندازه‌گیری گردید. در روز سی‌ام نیز برای اندازه‌گیری میزان فسفر جذب‌شده توسط پریفایتون، ابتدا توده پریفایتون چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد تا فسفر رسوب‌کرده بر روی آن شسته شود. برای اندازه‌گیری فسفر کل ۰/۵ گرم توده خشک پریفایتون را در دمای ۴۵۰ درجه سلسیوس به مدت پنج ساعت قرار داده و بعد از آن با هیدروکلریک اسید ۲ مولار هضم شد. مقدار فسفر در عصاره به روش مولیبدوانادات در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Pei et al., 2015).

آنالیز آماری

داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با یک فاکتور نوع پریفایتون مورد تجزیه قرار گرفت. تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها با نرم‌افزار 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. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2019 رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج شمارش اجزای هتروتروف نمونه‌های پریفایتون

نتایج شمارش جمعیت اجزای هتروتروف لایه زیستی ایپی‌پلون نمونه‌برداری شده از ۲۰ مزرعه شالیزاری در استان گیلان در جدول ۲ آمده است. بیشترین جمعیت کل باکتری‌های شمارش‌شده در نمونه شماره ۲ مربوط به منطقه سیاهکل با جمعیت 14×10^6 CFU/g و بیشترین جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در نمونه شماره ۲ مربوط به منطقه سیاهکل با جمعیت $5/5 \times 10^3$ CFU/g بود. جمعیت کل قارچ‌ها در محدوده 7×10^3 تا 21×10^3 CFU/g در مناطق مختلف متغیر بود. بالاترین جمعیت قارچ‌های حل‌کننده فسفات در مناطق سیاهکل و مزرعه پژوهشی موسسه تحقیقات برنج با 14×10^1 CFU/g شمارش گردید. مقدار فسفر قابل جذب خاک منطقه سیاهکل برابر $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ و مقدار فسفر محلول در آب برابر $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ بود که با جمعیت باکتری و قارچ‌های حل‌کننده فسفات همخوانی دارد (جدول ۱).

نتایج شمارش جمعیت کل باکتری و قارچ و همچنین باکتری و قارچ‌های حل‌کننده فسفات در لایه زیستی ایپی‌فایتون نشان داد بیشترین جمعیت کل باکتری‌ها در نمونه شماره ۸ مربوط به منطقه فرشم بالا با 15×10^5 CFU/g و بیشترین جمعیت کل قارچ‌ها در مناطق لشت‌نشاء، فرشم بالا و سنگر با جمعیت 12×10^2 CFU/g بود. بیشترین جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در نمونه شماره ۶ مربوط به منطقه خشکان‌رود با 6×10^2 CFU/g و برای جمعیت قارچ‌های حل‌کننده فسفات بالاترین جمعیت در نمونه مزرعه پژوهشی موسسه تحقیقات برنج ۲ با جمعیت 14×10^1 CFU/g شمارش گردید (جدول ۳).

جدول ۲- برآورد جمعیت کل باکتری و قارچ و جمعیت جامعه هتروتروف حل کننده فسفات در نمونه‌های اپی پلون

کد نمونه	منطقه	جمعیت کل باکتری ها $10^6 \times$	جمعیت کل قارچ‌ها $10^3 \times$	باکتری‌های حل کننده فسفات $10^3 \times$	قارچ‌های حل کننده فسفات $10^1 \times$
LON-1	رستم‌آباد	۲/۲	۱۲	۰/۸	۸
LON-2	سیاهکل	۱۴/۱	۲۵	۵/۵	۱۴
LON-3	آستانه اشرفیه	۲/۵	۱۰	۶	۷
LON-4	لشت نشاء	۳/۶	۱۵	۱/۵	۵
LON-5	کوچه اصفهان	۳/۶	۱۴	۱/۶	۹
LON-6	خشکان رود	۱۱/۲	۱۸	۴/۶	۱۳
LON-7	خشک بیجار	۱۳/۸	۱۸	۵	۱۲
LON-8	فرشم بالا	۴/۵	۱۱	۱۰	۱۲
LON-9	باغچه بنه	۴/۲	۱۲	۱/۸	۸/۵
LON-10	مردان	۴/۶	۱۲	۲/۲	۸
LON-11	کوچه اصفهان - محله لاله دشت	۳/۳	۱۴	۱/۴	۹
LON-12	سنگر	۱۳/۵	۲۰	۲/۵	۴
LON-13	شفت	۲/۸	۱۰	۱/۲	۷
LON-14	ایستگاه گیله پردر سر ۱	۸/۸	۱۳	۳/۹	۴
LON-15	ایستگاه گیله پردر سر ۲	۹/۹	۱۴	۴/۱	۵
LON-16	مرکز تحقیقات برنج ۱	۱۲/۱	۱۸	۲/۵	۴
LON-17	مرکز تحقیقات برنج ۲	۱۲	۲۱	۲	۱۴
LON-18	فشتام	۱/۱	۷	۰/۵	۲
LON-19	جعفرآباد ۱	۵/۲	۱۲	۳/۵	۷/۷
LON-20	جعفرآباد ۲	۴/۸	۱۱	۳/۳	۷/۵

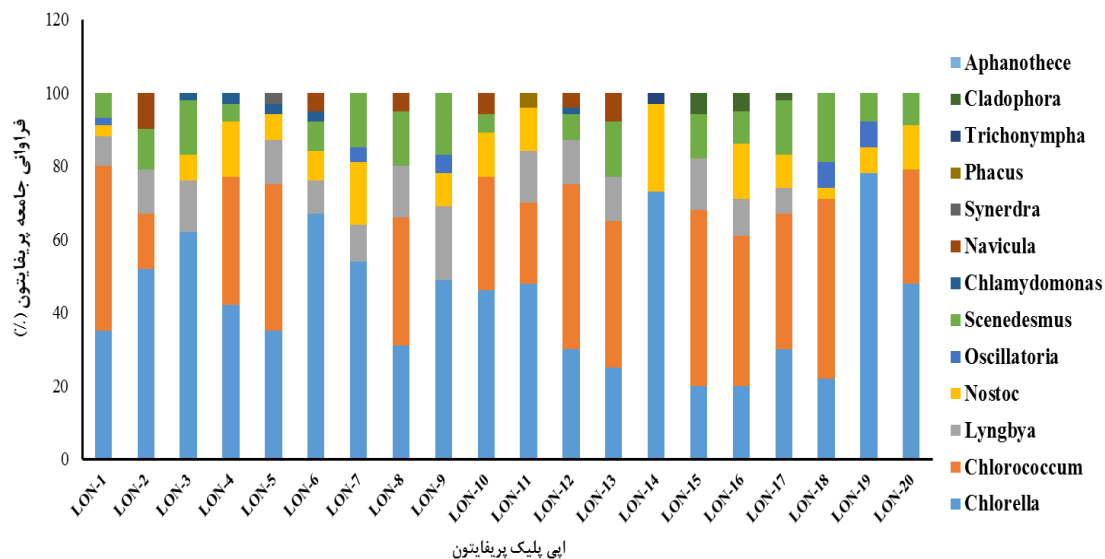
جدول ۳- برآورد جمعیت کل باکتری و قارچ و جمعیت جامعه هتروتروف حل کننده فسفات در نمونه‌های اپی فایتون

کد نمونه	منطقه	جمعیت کل باکتری ها $10^6 \times$	جمعیت کل قارچ‌ها 10^2	باکتری‌های حل کننده فسفات 10^2	قارچ‌های حل کننده فسفات 10^1
TON-1	رستم‌آباد	۳/۲	۵	۱	۲
TON-2	سیاهکل	۱۲	۷	۴	۱
TON-3	آستانه اشرفیه	۲	۶	۳	۳
TON-4	لشت نشاء	۳	۱۲	۲	۱
TON-5	کوچه اصفهان	۲	۷	۱/۵	۱
TON-6	خشکان رود	۱۰	۹	۶	۸
TON-7	خشک بیجار	۱۱	۹	۴	۴
TON-8	فرشم بالا	۱۵	۱۲	۷	۹
TON-9	باغچه بنه	۳	۴	۱/۵	۴
TON-10	مردان	۲	۴	۲/۳	۵
TON-11	کوچه اصفهان - محله لاله دشت	۳	۵	۲	۳
TON-12	سنگر	۱۱	۱۲	۲/۵	۴
TON-13	شفت	۲	۵	۱	۵
TON-14	ایستگاه گیله پردر سر ۱	۱۱	۶	۴	۲
TON-15	ایستگاه گیله پردر سر ۲	۲	۴	۲	۳
TON-16	مرکز تحقیقات برنج ۱	۱۰	۴	۲	۴
TON-17	مرکز تحقیقات برنج ۲	۱۱	۵	۲	۱۴
TON-18	فشتام	۱	۲	۱/۳	۲
TON-19	جعفرآباد ۱	۳	۳	۲	۳
TON-20	جعفرآباد ۲	۵	۵	۱	۲

به طور کلی نتایج شمارش اجزای هتروتروف در لایه زیستی پریفایتون از دو زیست‌بوم مختلف نشان داد که جمعیت کل باکتری‌ها و قارچ‌ها در اپی‌پلون تقریباً ۱۰ برابر اپی‌فایتون است. جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات نیز در لایه زیستی اپی‌پلون نیز حدود ۱۰ برابر جمعیت قارچ‌های حل‌کننده فسفات تقریباً ۴ برابر آن در لایه زیستی اپی‌فایتون است. این نتایج نشان می‌دهد که در مزارع شالیزاری جمعیت ریزسازواره‌های حل‌کننده فسفات در لایه زیستی تشکیل شده بر روی سطح خاک (اپی‌پلون) بسیار بیشتر از لایه زیستی تشکیل شده بر روی سطح گیاه (اپی‌فایتون) است. در مطالعه‌ای در کشور چین با بررسی اجزای پروکاریوت پریفایتون مشخص شد که بیشترین فراوانی را شاخه‌های اپی‌پلیک پریفایتیک *Cyanobacteria*، *Chloroflexi*، *Actinobacteria*، *Proteobacteria* تشکیل می‌دهند (Su et al., 2017).

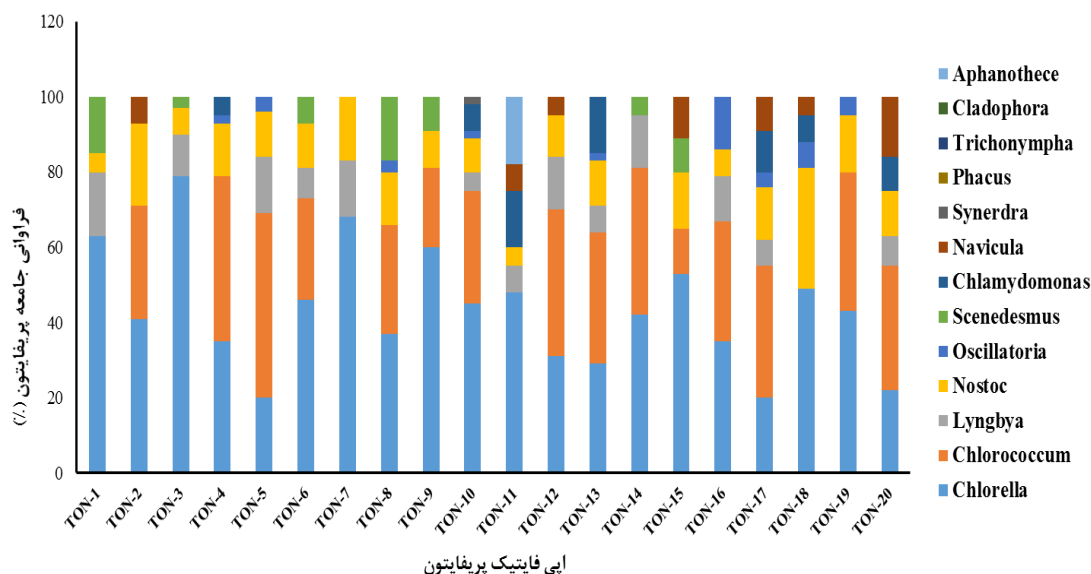
نتایج شمارش و شناسایی مورفولوژیک اجزای اتوتروف نمونه‌های پریفایتون

بررسی جمعیت جامعه اتوتروف شامل جلبک‌ها، سیانوباکتری‌ها و دیاتومه‌ها در اپی‌پلون پریفایتون جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان گیلان نشان داد که بیشترین درصد جمعیت را جنس *Chlorella* با ۴۳/۳۵ درصد و کمترین فراوانی را جنس *Trichonympha* که تنها در نمونه شماره ۱۴ مشاهده شد. در رتبه بعدی بیشترین فراوانی جنس *Chlorococcum* با میانگین ۲۵/۷ درصد در کل مناطق قرار داشت. جنس‌های *Lyngbya*، *Scenedesmus* و *Nostoc* به ترتیب با میانگین ۹/۶، ۸/۴ و ۸ درصد در رتبه‌های بعدی بیشترین فراوانی قرار داشتند. جنس‌های *Cladophora*، *Navicula*، *Chlamydomonas* و *Chlorella* تنها در تعدادی از مناطق مشاهده شدند. در دو نمونه اپی‌پلون پریفایتون شماره ۶ و ۱۳ که توانایی بالایی در آزادسازی و نگهداری فسفر دارند تنوع جنس جمعیت اتوتروف شامل ۶۷ درصد *Chlorella*، ۹ درصد *Lyngbya*، ۸ درصد *Nostoc*، ۸ درصد *Scenedesmus*، ۳ درصد *Chlamydomonas* و ۵ درصد *Navicula* در نمونه شماره ۶ و ۲۵ درصد *Chlorella*، ۴۰ درصد *Chlorococcum*، ۱۲ درصد *Lyngbya*، ۱۵ درصد *Scenedesmus* و ۸ درصد *Navicula* در نمونه شماره ۱۳ بود (شکل ۱).



شکل ۱- درصد فراوانی جامعه اتوتروف تشخیص داده شده نمونه‌های پریفایتون اپی‌پلون

بررسی جامعه اتوتروف در نمونه‌های اپی‌فایتون پریفایتون نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به جنس *Chlorella* با ۴۳/۳ درصد و کمترین آن مربوط به جنس *Synerdra* با ۰/۱ درصد بود. جنس‌های *Aphanothece* و *Synerdra* به ترتیب تنها در نمونه‌های ۱۱ و ۱۰ مشاهده شدند. در رتبه بعدی بیشترین فراوانی جنس *Chlorococcum* با ۲۴/۶ درصد قرار داشت. جنس‌های *Nostoc*، *Lyngbya*، *Chlamydomonas* و *Scenedesmus* به ترتیب با ۱۲/۵، ۷، ۳/۴۵ و ۳/۲۵ درصد در رتبه‌های بعدی بیشترین فراوانی جمعیت جامعه اتوتروف قرار داشتند. نمونه اپی‌فایتون پریفایتون شماره ۸ که توانایی بالایی در آزادسازی و نگهداری فسفر دارد از لحاظ ترکیب جمعیت جامعه اتوتروف شامل ۳۷ درصد *Chlorella*، ۲۹ درصد *Chlorococcum*، ۱۷ درصد *Scenedesmus*، ۱۴ درصد *Nostoc* و ۳ درصد جنس *Oscillatoria* بود (شکل ۲).



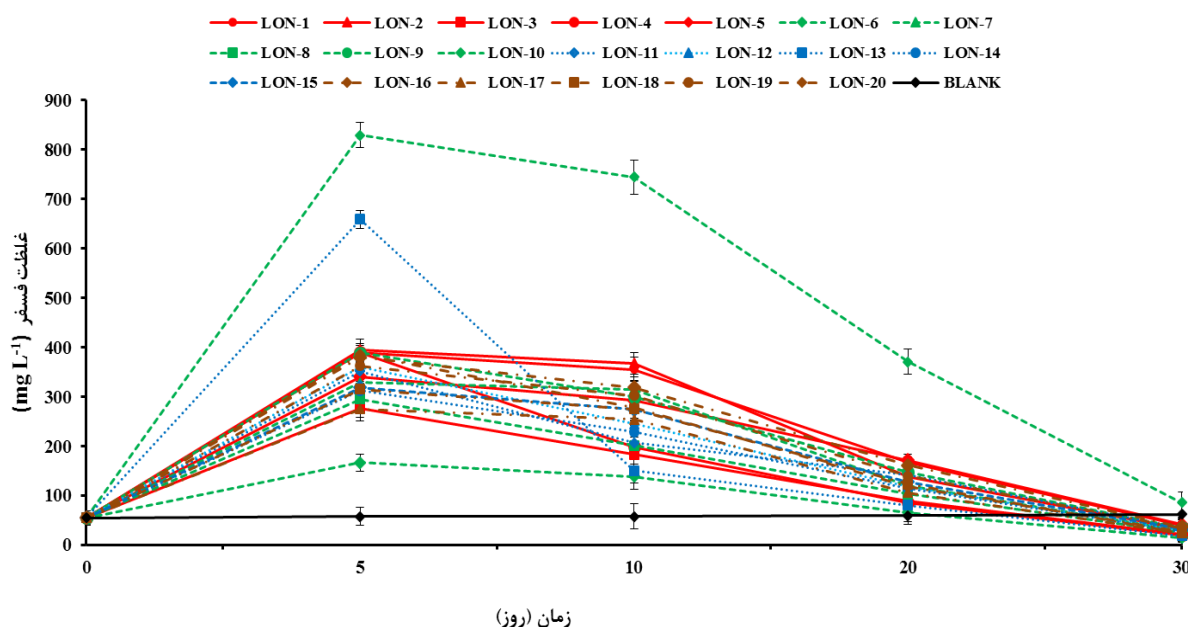
شکل ۲- درصد فراوانی جامعه اتوتروف تشخیص داده شده نمونه‌های پریفایتون ایبی فایتون

به طور کلی، نتایج نشان داد، ترکیب این دو زیست‌بوم جامعه اتوتروف در دو زیستگاه سطح خاک (اپی‌پلون) و روی گیاه (اپی‌فایتون) تفاوت جزئی با هم داشتند. جامعه اتوتروف غالب در هر دو زیست‌بوم شامل جنس‌های *Chlorella* و *Chlorococcum* بود که تقریباً ۶۸ درصد جامعه اتوتروف را تشکیل می‌دادند. در زیست‌بوم اپی‌پلون جنس‌های *Scenedesmus* و *Lyngbya* در رتبه بعدی بیشترین فراوانی قرار داشتند ولی در زیست‌بوم اپی‌فایتون جنس‌های *Nostoc* و *Lyngbya* قرار داشتند. در نمونه اپی‌پلون جنس‌های *Phacus*، *Trichonympha* و *Cladophora* مشاهده شد که در اپی‌فایتون این جنس‌ها شناسایی نشدند. در اپی‌فایتون جنس *Aphanothece* مشاهده شد که در بخش اپی‌پلون وجود نداشت. (Zhao et al. (2019) رشد پریفایتون را در شرایط دمایی و شدت نور مختلف بررسی کردند که نتایج نشان داد در شرایط نور و دمای طبیعی جنس‌های *Scenedesmus*، *Lyngbya*، *Chlorococcum* و *Chlorella* بیشترین فراوانی جمعیت را داشتند. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد جنس‌های *Scenedesmus*، *Lyngbya*، *Chlorococcum*، *Chlorella* و *Cyclotella* به ترتیب حدود ۳۳، ۳۸، ۷، ۹ و ۸ درصد از جمعیت جامعه اتوتروف پریفایتون را تشکیل می‌دهند. (Su et al. (2007) گزارش کردند که شاخه *Charophyta*، *Chlorophyta* و *Diatomea* بیشترین فراوانی را در جمعیت اجزای اتوتروف پریفایتون تشکیل می‌دهند. در پژوهشی که توسط Alikhani et al. (2020) در برخی برکه‌های استان گیلان صورت گرفت نتایج نشان داد که در برکه قلعه ورسل شاخه‌های کلروفیتا، باسیلاریوفیتا و سیانوباکتیریا به ترتیب با ۲۶/۲۴، ۵۶/۰۶ و ۱۷/۶۹ درصد فراوانی، در برکه فستام شاخه‌های کلروفیتا، کاروفیتا، اکلنوزوآ، اوکروفیتا، باسیلاریوفیتا و سیانوباکتیریا به ترتیب با حدود ۳۸/۴۸، ۲۰/۵۸، ۱/۷۲، ۱/۷۴، ۱۹/۶۸ و ۱۹/۵۲ درصد فراوانی و در برکه تازه سل شاخه‌های کلروفیتا، اکلنوزوآ، باسیلاریوفیتا و سیانوباکتیریا به ترتیب حدود ۱۳/۹۳، ۰/۵۶، ۵۱/۹ و ۳۳/۶ درصد فراوانی اجزای پریفایتون را تشکیل می‌دهند.

نتایج انحلال فسفات نامحلول توسط لایه زیستی پریفایتون

نتایج انحلال فسفات در محیط BG11 اصلاح شده توسط اپی‌پلون در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به این شکل با شروع آزمایش و افزودن اپی‌پلون به محیط در بازه زمانی صفر تا ۵ روز در تمام نمونه‌ها میزان فسفر محلول به شدت افزایش پیدا کرده است. به طوری که در دو اپی‌پلون برتر LON-6 و LON-13 در روز پنجم مقدار فسفر محلول به ترتیب به ۸۲۹ و ۶۵۹ میلی‌گرم در لیتر رسیده است. پس از آن در روز دهم کاهش شدید فسفر محلول در تمام نمونه‌ها مشاهده شد به طوری که در نمونه LON-6 به ۴۲۵ و در نمونه LON-13 به ۱۵۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. این روند کاهش تا بازه‌ی زمانی ۳۰ روز ادامه پیدا کرد به طوری که در پایان آزمایش مقدار فسفر محلول در تمام نمونه‌ها به جز نمونه LON-6 به کمتر از نمونه شاهد و به طور میانگین به حدود ۳۰ میلی‌گرم در لیتر رسید. افزایش مقدار فسفر محلول در روزهای اول آزمایش می‌تواند به دلیل افزایش انحلال فسفر توسط جامعه هتروتروف مانند باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات باشد که در این زمان لایه زیستی پریفایتون به طور کامل تشکیل نشده و اجزای اتوتروف مستقر نشده‌اند. پس از روز پنجم و با

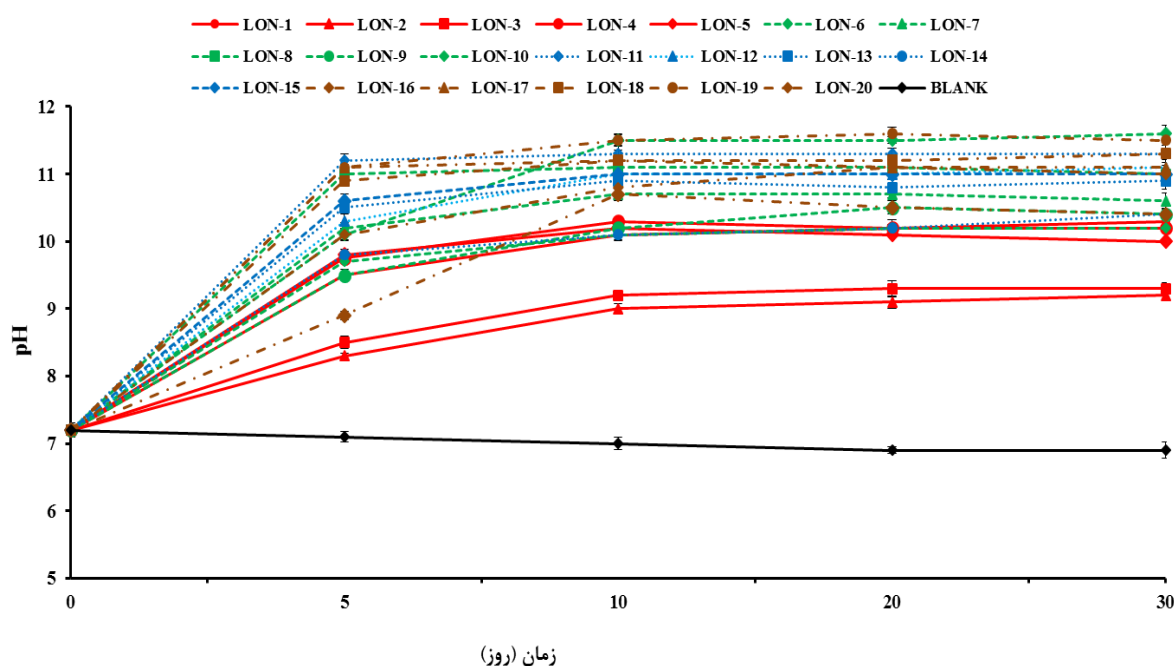
تشکیل و کامل شدن توده پریفایتون و استقرار جمعیت جلبک‌ها و دیاتوم‌ها که مصرف‌کننده و جذب‌کننده فسفر هستند مقدار فسفر محلول به شدت کاهش یافته است. دلیل توانایی بالای دو نمونه اپی‌پلون ۶ و ۱۳ احتمالاً به حضور جدایه‌های *Bacillus cereus* و *Acinetobacter calcoaceticus* و قارچ *Talaromyces minioluteu* بر می‌گردد که در این زیست‌بوم‌ها حضور داشته و توانایی بالایی در انحلال فسفر داشتند (Beheshti et al., 2021). پریفایتون دارای پتانسیل بالایی به عنوان یک ماده زیستی کارآمد برای روش‌های مختلف حذف فسفر از آب است (Lu et al., 2016). گزارش شده است که رشد پریفایتون در یک خاک شالیزاری مقدار فسفر در آب بالای سطح خاک را به طور قابل توجهی کاهش داده است (Koski-Vähälä and Hartikainen, 2001).



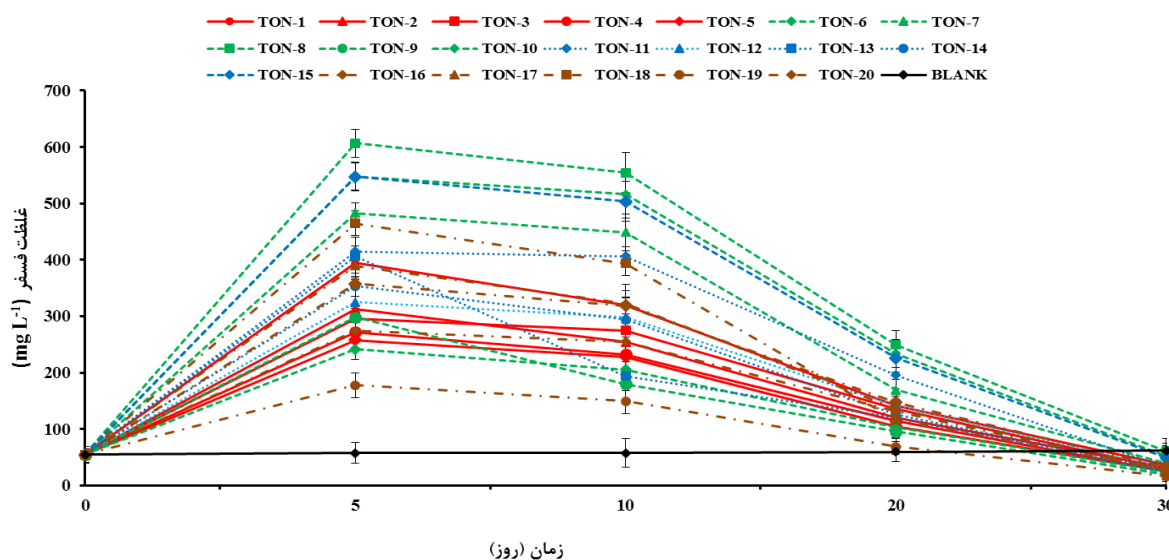
شکل ۳- نمودار انحلال فسفر توسط نمونه‌های اپی‌پلیک پریفایتون در محیط BG11 اصلاح‌شده

تغییرات pH محیط BG11 اصلاح‌شده در نمونه‌های اپی‌پلون نشان داد که با شروع آزمایش تا روز پنجم در تمام نمونه‌ها افزایش شدید pH مشاهده شد. در روز پنجم بالاترین میزان pH برابر ۱۱/۲ مربوط به نمونه LON-11 بود. پس از روز پنجم تغییرات pH افزایش کمی نشان داد به جز در نمونه‌های LON-2، LON-3 و LON-20 که این افزایش شدیدتر بود، ولی در تمام نمونه‌ها مقدار pH در روز دهم ثابت شده است. در پایان بازه زمانی آزمایش مقدار pH در اکثر نمونه‌ها در بازه ۱۱/۱-۱۰/۳ ثابت شده است به جز در نمونه‌های LON-2 و LON-3 که به ترتیب بر روی ۹/۲ و ۹/۳ ثابت شده‌اند. افزایش شدید pH در بازه زمانی صفر تا ۵ روز مربوط به استقرار تدریجی لایه زیستی اپی‌پلون در محیط است که دلیل فتوسنتز شدید و مصرف دی‌اکسید کربن منجر به افزایش pH محیط شده است. پس از استقرار کامل تا روز دهم تقریباً میزان تغییرات pH ثابت شده است (شکل ۴). پریفایتون به دلیل فتوسنتز جلبک‌ها منجر به افزایش pH آب می‌شود و رسوب فسفر را افزایش می‌دهند. این موضوع به نگهداری فسفر در خاک‌های شالیزاری کمک کرده و مانع از هدر رفت آن به آب‌های سطحی اطراف می‌شود (Wu et al., 2016).

نتایج انحلال فسفات در محیط BG11 اصلاح‌شده توسط نمونه‌های اپی‌فایتیک پریفایتون در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به این شکل با شروع آزمایش و افزودن پریفایتون به محیط در بازه زمانی صفر تا ۵ روز در تمام نمونه‌ها میزان فسفر محلول به شدت افزایش پیدا کرده است. به طوری که در دو اپی‌فایتون برتر TON-6 و TON-8 در روز پنجم مقدار فسفر محلول به ترتیب به ۵۴۸ و ۶۰۶/۷ میلی‌گرم در لیتر رسیده است. پس از آن در روز دهم کاهش شدید فسفر محلول در تمام نمونه‌ها مشاهده شد به طوری که در نمونه TON-6 به ۵۱۶ و در نمونه TON-8 به ۵۵۵ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. این روند کاهشی تا بازه‌ی زمانی ۳۰ روز ادامه پیدا کرد به طوری که در پایان آزمایش مقدار فسفر محلول در تمام نمونه‌ها به کمتر از نمونه شاهد و به طور میانگین به حدود ۳۲ میلی‌گرم در لیتر رسید. توانایی بالای نمونه اپی‌پلون ۸ احتمالاً به حضور قارچ *Talaromyces stipitatus* مربوط می‌شود که توانایی بالایی در انحلال فسفات داشت (Beheshti et al., 2021).



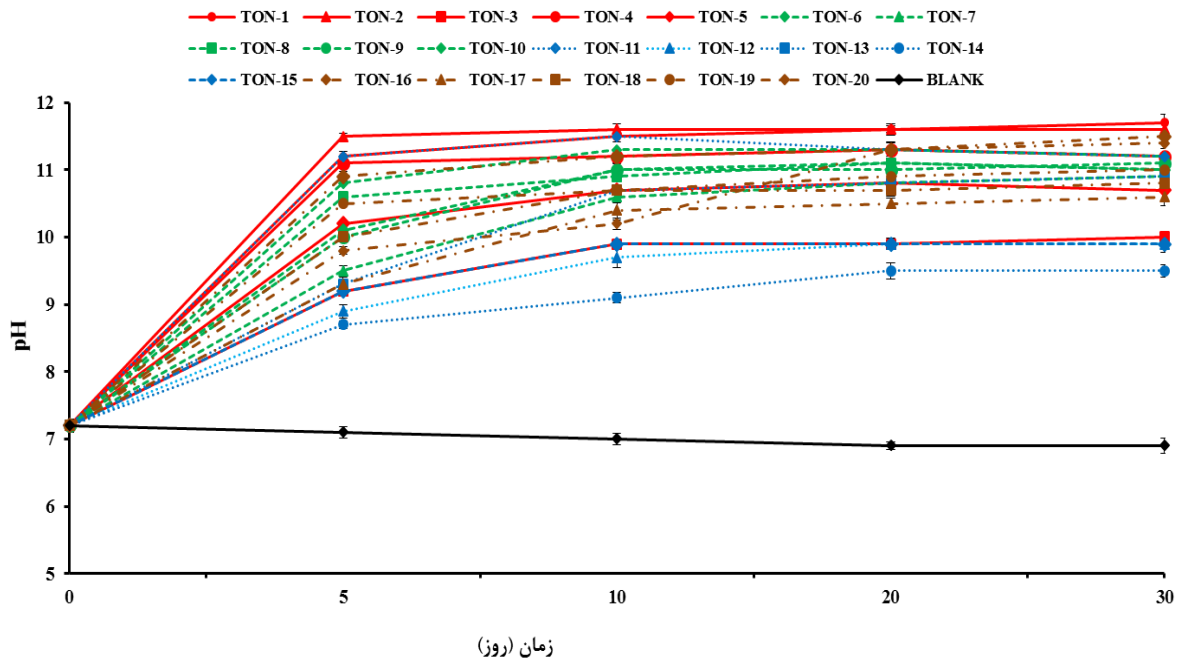
شکل ۴- تغییرات pH نمونه‌های اپی پلایک پریفایتون در محیط اصلاح‌شده BG11



شکل ۵- نمودار انحلال فسفر توسط نمونه‌های اپی فایتون در محیط اصلاح‌شده BG11

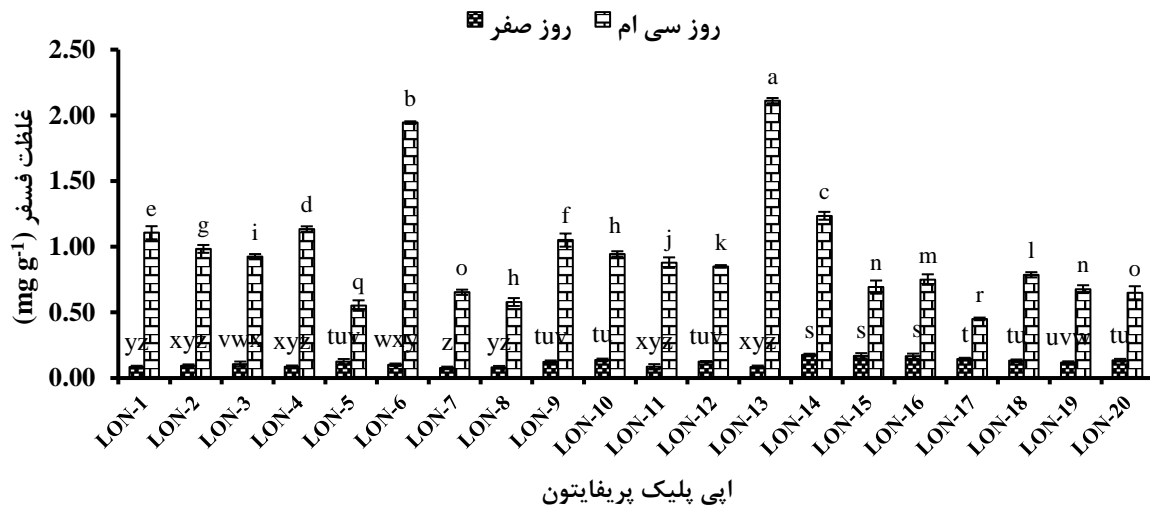
تغییرات pH محیط BG11 اصلاح‌شده در نمونه‌های اپی فایتیک پریفایتون در شکل ۶ نشان داده شده است. با توجه به این شکل از شروع آزمایش تا روز پنجم در تمام نمونه‌ها pH محیط افزایش نشان داده است. به طور میانگین میزان pH از ۷/۲ در روز صفر به ۱۱/۶ در روز پنجم رسیده است که بالاترین مقدار در بین تمام نمونه‌ها بود که مربوط به نمونه TON-2 است. پس از روز پنجم تا روز دهم افزایش کمی در اکثر نمونه‌ها مشاهده و در روز دهم ثابت شده است. در نمونه TON-8 که توانایی بالایی در انحلال فسفات نامحلول از خود نشان داد، مقدار pH در روز پنجم به ترتیب به ۱۰/۸ و ۱۰/۶ افزایش یافت و در پایان روز سی‌ام نیز به ترتیب بر روی ۱۱/۲ و ۱۱ ثابت شده است. تغییرات شدید pH مربوط به مرحله استقرار لایه زیستی و رشد جلبک‌ها و دیاتوم‌ها در محیط هستند که فتوسنتز آن‌ها منجر به افزایش pH می‌شود. در یک آزمایش میکروکاسیم^۱ مشخص شد pH محیط در تیمار پریفایتون بعد از ۴۲ روز از ۷/۵ به ۹/۹

افزایش پیدا کرده است (Su et al., 2017).



شکل ۶- تغییرات pH نمونه‌های اپی‌فایتون در محیط BG11 اصلاح‌شده

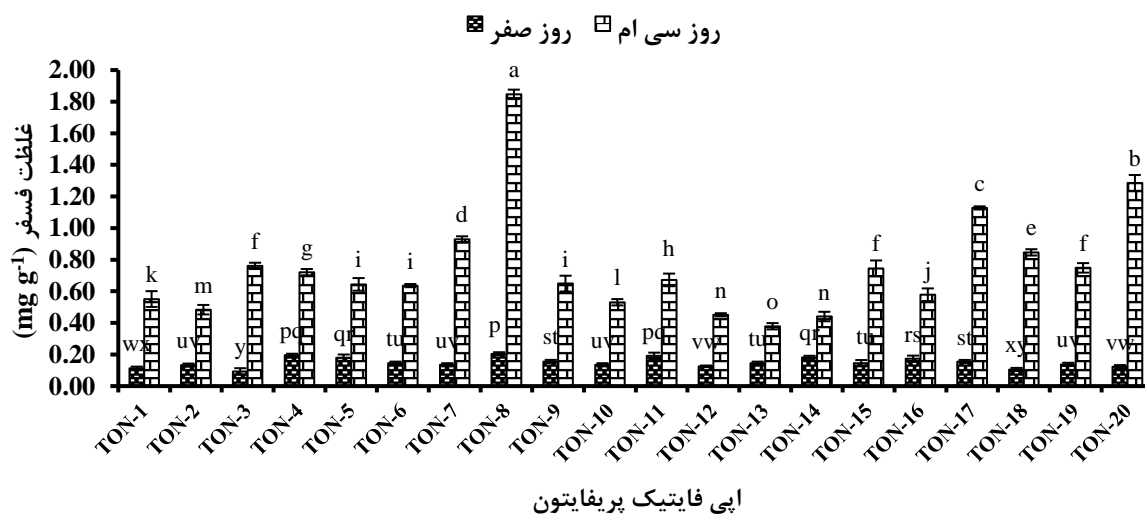
تغییرات میزان فسفر در توده پریفایتون اپی‌پلون در شروع و پایان آزمایش در محیط BG11 اصلاح‌شده با منبع فسفات نامحلول نشان داد که در پایان آزمایش مقدار فسفر در توده تمام نمونه‌ها افزایش قابل توجه و معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$). بالاترین میزان افزایش مربوط به نمونه LON-13 بود که مقدار آن از ۰/۰۹ به ۲/۱۱ میلی‌گرم در گرم توده پریفایتون رسیده است. در نمونه LON-6 نیز این افزایش از ۰/۱ به ۱/۹۴ میلی‌گرم در گرم توده پریفایتون بود. مقدار افزایش در نمونه LON-13 برابر ۲۰۰ درصد و در نمونه LON-6 برابر ۱۸۴۰ درصد بود. به طور میانگین در تمام نمونه‌ها میزان افزایش فسفر نسبت به زمان صفر در توده پریفایتون برابر ۶۹۲ درصد بود. این موضوع نشان از ظرفیت بالای جذب و نگهداری فسفر توسط توده پریفایتون دارد (شکل ۷).



شکل ۷- مقدار فسفر در توده اپی‌پلون در زمان صفر و سی روز بعد در محیط BG11 حاوی تری‌کلسیم فسفات (حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌داری می‌باشد)

تغییرات میزان فسفر در توده اپی‌فایتون‌های رشد داده‌شده در محیط BG11 اصلاح‌شده نشان داد که در تمام نمونه‌های پریفایتون در پایان رزو سی‌ام مقدار فسفر افزایش قابل توجه و معنی‌داری را نشان داده است. در نمونه پریفایتون برتر TON-8 میزان فسفر از ۰/۲ در

روز صفر به ۱/۸۵ میلی گرم در گرم توده پریفایتون رسیده است که افزایش ۸۲۵ درصدی نشان داده است. در نمونه TON-6 نیز مقدار افزایش از ۰/۱۵ به ۰/۶۴ میلی گرم در گرم توده پریفایتون بود که برابر ۳۵۳ درصد افزایش است. به طور میانگین در تمام نمونه‌های پریفایتون مقدار فسفر در توده پریفایتون ۴۰۰ درصد افزایش نشان داد که این امر مؤید این مهم است که توده پریفایتون ظرفیت بالایی برای جذب و نگهداری فسفر در محیط‌های آبی دارد (شکل ۸). مقدار کل فسفر ذخیره‌شده در توده پریفایتون در ۱۰۰ روز بعد از شروع ۱/۴ میلی گرم در گرم وزن تر زیست‌توده اندازه‌گیری شد، که فسفر ذخیره‌شده به فرم Ca-P به مقدار ۰/۶۹ میلی گرم در گرم بیشترین شکل نگهداری فسفر توسط پریفایتون بود (Wu et al., 2016). (Vyverman and Liu (2015). گزارش کردند که جلبک‌های رشته‌ای *Cladophora* sp.، *Klebsormidium* sp. و *Pseudanabaena* sp. می‌توانند فسفر را به مقدار ۲۷/۵-۱۲/۷ میلی گرم در گرم وزن خشک زیست‌توده جذب کنند. فسفر برای رشد جلبک‌ها ضروری است و این موجودات می‌توانند فسفر را تجمع دهند مانند *Cladophora*، همچنین بعضی از باکتری مانند *Acinetobacter* می‌توانند مقدار زیادی فسفر به صورت پلی فسفات درون سلولی نگهداری کنند (Higgins et al., 2016; Oehmen et al., 2007; et al., 2008). علاوه بر این فسفر می‌تواند از آب با تشکیل رسوب با کلسیم و منیزیم در pH بالا به شکل هیدروکسی آپاتیت رسوب و خارج شود (Lu et al., 2016)، و یا با تشکیل پیوند هیدروژنی با پلی سارکاریدهای خارج سلولی ترشح‌شده به وسیله جلبک‌ها و باکتری‌ها جذب سطحی شود (Li et al., 2013). لایه زیستی پریفایتون توانایی بالایی در نگهداری فسفر در ساختار خود را دارد (Su et al., 2017). در مطالعه‌ای دیگر مقدار فسفر کل در توده پریفایتون از ۰/۴ به ۰/۸ میلی گرم در گرم بعد از ۶۰ روز افزایش پیدا کرده است که نشان‌دهنده توانایی پریفایتون برای حذف فسفر از آب و نگهداری آن است، که ۷۲ درصد آن به شکل Ca-P نگهداری شده بود (Lu et al., 2016). مهمترین مکانسیم برای حذف فسفر از آب توسط پریفایتون سازوکار جذب است (Lu et al., 2014a). پریفایتون می‌تواند مقدار زیادی از فسفر را از آب جذب کند، که عمدتاً در واکوئل اجزای فتوتروفیک خود ذخیره می‌کند (Guzzon et al., 2008). جامعه زیستی پریفایتون در مراحل اولیه رشد برنج تحت نور کافی رشد می‌کنند و به طور بالقوه می‌توانند فسفر را تجمع دهند، که منجر به کاهش تثبیت فسفر توسط خاک و تخلیه آن به آب زیرزمینی و زهاب‌ها می‌شود. در مراحل آخر رشد برنج، اجزای اتوتروف، مانند جلبک‌های ریز در توده پریفایتون، با کامل شدن پوشش کانوپی برنج و کاهش نور، تجزیه شده و به طور بالقوه فسفر را آزاد می‌کنند (Drake et al., 2012; Zhao et al., 2019).



شکل ۸- مقدار فسفر در توده اپی‌فایتون در زمان صفر و سی روز بعد در محیط BG11 حاوی تری کلسیم فسفات (حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌داری است)

نقش مثبت و مؤثر پریفایتون در چرخه فسفر بین آب و سطح خاک به دلیل تمایل بالا به فسفر غیرقابل انکار است (Drake et al., 2006; McCormick et al., 2012). پریفایتون سهم قابل توجهی (۹۷-۴۲ درصد) از کل بهره‌وری سالانه زیست‌بوم‌ها به ویژه از آب‌های کم عمق دارد (Azim, 2009; Pratiwi et al., 2011). ارزیابی مهاجرت و انتقالات فسفر در سیستم خاک- لایه زیستی پریفایتون- آب باعث درک بهتر چرخه فسفر در زیست‌بوم‌های آبی می‌شود که حاوی لایه زیستی پریفایتون هستند (Lu et al., 2016). بنابراین پریفایتون می‌تواند به عنوان یک بافر زیستی برای تنظیم غلظت فسفر در مراحل اولیه رشد گیاه برنج عمل کند (Koski-Vähälä and Hartikainen, 2016).

۲۰۰۱). برخی از اجزای میکروبی پریفایتون می‌توانند مواد موکوتیدی^۱ ترشح کنند که به جذب کلسیت و تشکیل کریستال در سطح پریفایتون کمک می‌کند و در نتیجه توانایی جذب فسفر را افزایش می‌دهد (Karageorgiou et al., 2007). پریفایتون با فسفر تجمع یافته می‌تواند به عنوان یک کود زیستی عمل کند (Wu et al., 2016). کود زیستی با مخلوط کردن مواد مغذی و تجمعات میکروبی که توانایی به دام انداختن مواد غذایی یا ایجاد تغییر و تحولات شیمیایی مفید را دارند، تولید می‌شود. ولی باید احتیاطات لازم به دلیل پیچیده بودن شرایط در خاک غرقاب شالیزار و جذب فلزات سنگین و سمی در نظر گرفته شود. خوشبختانه، پریفایتون رشد کرده در مزارع شالیزاری نسبتاً ایمن بوده و از آن می‌توان به عنوان کود زیستی استفاده کرد زیرا معمولاً خاک و آب شالیزار غیر سمی هستند (Wu et al., 2016).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد جمعیت غالب اجزای اتوتروف در لایه زیستی پریفایتون در شالیزارهای موردبررسی استان گیلان بیشتر از جنس *Chlorella* و *Chlorococcum* بود که در زیست‌بوم ای‌پلون ۶۹ درصد جمعیت و در زیست‌بوم ای‌فایتون ۶۷/۹ درصد جمعیت را این دو جنس تشکیل می‌دادند. جنس‌های *Navicula* و *Nostoc*، *Scenedesmus*، *Lynbya* در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. نتایج انحلال فسفات در محیط BG11 اصلاح‌شده نشان داد که لایه زیستی پریفایتون توانایی بالایی در جذب و نگهداری (مخزن) فسفر در محیط مایع دارد که این موضوع به کاهش هدر رفت فسفر از شالیزارها کمک شایانی می‌نماید. لایه زیستی پریفایتون به عنوان منبع غنی از ریزسازواری‌های حل‌کننده فسفات مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها بوده و می‌توان از این پتانسیل در آینده و پس از مطالعات تکمیلی برای تهیه کود زیستی مناسب شالیزارها استفاده کرد. علاوه بر این پریفایتون خود می‌تواند به عنوان یک کود زیستی کندرها و بافر زیستی برای فسفر در شالیزارها عمل کرده و این عنصر را در زمان نیاز بالای گیاه که مرحله پر شدن دانه است با تجزیه زیست‌توده اختیار گیاه برنج قرار دارد.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

- Adhikari, P., Pandey, A., (2019). Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere* 9, 2-9.
- Alikhani, H., Ahmadi, H., Etesami, H., Noroozi, M., Asadi-Rahmani, H., Emami, S., (2020). A study of the algae flora of the periphyton community in aquatic ecosystems of Guilan province. *Soil Biology*. Farsi.
- Arai, Y., Sparks, D., (2007). Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: A multiscale approach. *Advances in agronomy* 94, 135-179.
- Ayaga, G., Todd, A., Brookes, P.C., (2006). Enhanced biological cycling of phosphorus increases its availability to crops in low-input sub-Saharan farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 81-90.
- Azim, M., (2009). Photosynthetic periphyton and surfaces.
- Beheshti, M., Alikhani, H.A., Pourbabaee, A.A., Etesami, H., Rahmani, H.A., 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.
- Borovec, J., Sirová, D., Mošnerová, P., Rejmánková, E., Vrba, J., (2010). Spatial and temporal changes in phosphorus partitioning within a freshwater cyanobacterial mat community. *Biogeochemistry* 101, 323-333.
- Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Eusébio, M., Reis, M.A., (2014). The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water research* 66, 296-307.
- Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Munoz, J., González, F., Blázquez, M., Igual, J., García-Balboa, C., (2008). Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy* 92, 124-129.
- Dodds, W.K., (2003). The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *Journal of Phycology* 39, 840-849.
- Drake, W., Scott, J.T., Evans-White, M., Haggard, B., Sharpley, A., Rogers, C.W., Grantz, E.M., (2012). The effect of periphyton stoichiometry and light on biological phosphorus immobilization and release in streams. *Limnology* 13, 97-106.

- Ellwood, N.T., Di Pippo, F., Albertano, P., (2012). Phosphatase activities of cultured phototrophic biofilms. *Water research* 46, 378-386.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., Etoa, F.X., (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology* 5.
- Gronewold, A.D., Wolpert, R.L., (2008). Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. *Water research* 42, 3327-3334.
- Guzzon, A., Bohn, A., Diociaiuti, M., Albertano, P., (2008). Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment. *Water research* 42, 4357-4367.
- Hayashi, M., Vogt, T., Mächler, L., Schirmer, M., (2012). Diurnal fluctuations of electrical conductivity in a pre-alpine river: Effects of photosynthesis and groundwater exchange. *Journal of Hydrology* 450, 93-104.
- Higgins, S.N., Malkin, S.Y., Todd Howell, E., Guildford, S.J., Campbell, L., Hiriart-Baer, V., Hecky, R.E., (2008). An ecological review of *Cladophora glomerata* (*Chlorophyta*) in the Laurentian Great Lakes I. *Journal of Phycology* 44, 839-854.
- Igwe, C.A., Zarei, M., Stahr, K., (2010). Fe and Al oxides distribution in some ultisols and inceptisols of southeastern Nigeria in relation to soil total phosphorus. *Environmental Earth Sciences* 60, 1103-1111.
- 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, 447-452.
- Koski-Vähälä, J., Hartikainen, H., (2001). Assessment of the risk of phosphorus loading due to resuspended sediment. *Journal of Environmental Quality* 30, 960-966.
- Lan, Z., Lin, X., Wang, F., Zhang, H., Chen, C., (2012). Phosphorus availability and rice grain yield in a paddy soil in response to long-term fertilization. *Biology and Fertility of Soils* 48, 579-588.
- Li, J.-y., Deng, K.y., Hesterberg, D., Xia, Y.q., Wu, C.-x., Xu, R.k., (2017). Mechanisms of enhanced inorganic phosphorus accumulation by periphyton in paddy fields as affected by calcium and ferrous ions. *Science of the Total Environment* 609, 466-475.
- Li, S.-S., Li, J.-H., Xia, M.-S., Meng, Y.-Y., Zhang, H., (2013). Adsorption of nitrogen and phosphorus by intact cells and cell wall polysaccharides of *Microcystis*. *Journal of applied phycology* 25, 1539-1544.
- Liu, J., Danneels, B., Vanormelingen, P., Vyverman, W., (2016). Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: from laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water research* 92, 61-68.
- Liu, J., Vyverman, W., (2015). Differences in nutrient uptake capacity of the benthic filamentous algae *Cladophora* sp., *Klebsormidium* sp. and *Pseudanabaena* sp. under varying N/P conditions. *Bioresource technology* 179, 234-242.
- 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.
- Lu, H., Wan, J., Li, J., Shao, H., 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., Wu, Y., (2014a). The adsorption process during inorganic phosphorus removal by cultured periphyton. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 8782-8791.
- Lu, H., Yang, L., Zhang, S., Wu, Y., (2014b). The behavior of organic phosphorus under non-point source wastewater in the presence of phototrophic periphyton. *Plos one* 9, e85910.
- MacDonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A., Ramankutty, N., (2011). Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3086-3091.
- Maitra, N., Manna, S.K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C., Sahu, S.K., Sharma, A.P., (2015). Ecological significance and phosphorus release potential of phosphate solubilizing bacteria in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia* 745, 69-83.
- Martin, J.L., (2019). Hydro-environmental analysis: freshwater environments. *CRC Press*.
- McCormick, P.V., Shuford III, R.B., Chimney, M.J., (2006). Periphyton as a potential phosphorus sink in the Everglades Nutrient Removal Project. *Ecological Engineering* 27, 279-289.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A., (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water research* 41, 2271-2300.
- Pei, G., Wang, Q., Liu, G., (2015). The role of periphyton in phosphorus retention in shallow lakes with different trophic status, China. *Aquatic Botany* 125, 17-22.



- PRATIWI, N.T.M., HARIYADI, S., TAJUDIN, R., (2011). Photosynthesis of periphyton and diffusion process as source of oxygen in rich-riffle upstream waters. *Microbiology Indonesia* 5, 5-5.
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M.C., Muyzer, G., (2007). Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecology* 54, 578-585.
- Schmidt, J.J., Gagnon, G.A., Jamieson, R.C., (2016). Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. *Ecological Engineering* 95, 588-593.
- Scinto, L., Reddy, K., (2003). Biotic and abiotic uptake of phosphorus by periphyton in a subtropical freshwater wetland. *Aquatic Botany* 77, 203-222.
- Shafqat, M.N., Pierzynski, G.M., (2014). The Freundlich adsorption isotherm constants and prediction of phosphorus bioavailability as affected by different phosphorus sources in two Kansas soils. *Chemosphere* 99, 72-80.
- Shen, J., Li, R., Zhang, F., Fan, J., Tang, C., Rengel, Z., (2004). Crop yields, soil fertility and phosphorus fractions in response to long-term fertilization under the rice monoculture system on a calcareous soil. *Field Crops Research* 86, 225-238.
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A., Skulberg, R., (1993). Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). Algal toxins in seafood and drinking water, 4.145-16.
- Smith, V.H., Schindler, D.W., (2009). Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in ecology & evolution* 24, 201-207.
- Song, T., Xu, F., Yuan, W., Chen, M., Hu, Q., Tian, Y., Zhang, J., Xu, W., (2019). Combining alternate wetting and drying irrigation with reduced phosphorus fertilizer application reduces water use and promotes phosphorus use efficiency without yield loss in rice plants. *Agricultural water management* 223, 105686.
- 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.
- Wang, H., Holden, J., Spera, K., Xu, X., Wang, Z., Luan, J., Xu, X., Zhang, Z., (2013). Phosphorus fluxes at the sediment-water interface in subtropical wetlands subjected to experimental warming: a microcosm study. *Chemosphere* 90, 1794-1804.
- Wang, Y., Zhao, X., Wang, L., Zhao, P.-H., Zhu, W.-B., Wang, S.-Q., (2016). Phosphorus fertilization to the wheat-growing season only in a rice-wheat rotation in the Taihu Lake region of China. *Field Crops Research* 198, 32-39.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, J.P., (2015). Freshwater algae of North America: *ecology and classification*. Elsevier.
- Wu, Y., Liu, J., Lu, H., Wu, C., 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., Rene, E.R., (2018). Periphytic biofilms: a promising nutrient utilization regulator in wetlands. *Bioresource technology* 248, 44-48.
- Yamamoto, M., Horie, M., Fukushima, M., Toyotome, T., (2019). Culture-based analysis of fungi in leaves after the primary and secondary fermentation processes during Ishizuchi-kurocha production and lactate assimilation of *P. kudriavzevii*. *International journal of food microbiology* 306, 108263.
- Yang, J., Tang, C., Wang, F., 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.
- Yang, X., Lu, X., 2014. Drastic change in China's lakes and reservoirs over the past decades. *Scientific reports* 4, 1-10.
- Zhang, W., Ma, W., Ji, Y., Fan, M., Oenema, O., 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.
- Zhang, X., Liu, Z., Gulati, R.D., Jeppesen, E., (2013). The effect of benthic algae on phosphorus exchange between sediment and overlying water in shallow lakes: a microcosm study using ^{32}P as a tracer. *Hydrobiologia* 710, 109-116.
- Zhao, Y., Chen, X., Xiong, X., Wu, C., (2019). Capture and release of phosphorus by periphyton in closed water systems influenced by illumination and temperature. *Water* 11, 1021.
- Zhou, Q., Zhu, Y., (2003). Potential pollution and recommended critical levels of phosphorus in paddy soils of the southern Lake Tai area, China. *Geoderma* 115, 45-54.