



The Effect of Phyllosphere-Derived Bacterial Biosurfactants on The Growth of Spearmint (*Mentha spicata*) and Radish (*Raphanus sativus*)

Esmail Karimi^{1*} , Negin Asl-Reyhany¹, Ali-Asghar Alilou² and Seyed Bahman Mousavi¹

1- Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh

2- Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh

* Corresponding author, Email: sm_ka80@yahoo.com, ekarimi@maragheh.ac.ir

(Received: 26 January 2025; Revised: 16 April 2025; Accepted: 20 April 2025)

Abstract

Background and Objective: Biosurfactants are amphiphilic molecules produced by living organisms, particularly bacteria. Recent studies have shown their potential to act as plant growth stimulants. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of biosurfactants on plant growth.

Methods: To achieve this, biosurfactant-producing bacteria were initially isolated from the phyllosphere of wild plants. Subsequently, biosurfactants were extracted and purified. After evaluating their quality, four superior biosurfactants were selected and addressed by S1 to S4 codes. A pot experiment was conducted in the greenhouse using a completely randomized factorial design to assess the effects of foliar spraying at concentrations of 0, 0.1, 0.2, and 0.4 g L⁻¹ on the growth stimulation of spearmint and radish plants. At the end of the experiment, the plants' growth traits were measured and evaluated.

Results: The effect of biosurfactants was strongly influenced by their applied concentrations. Among the concentrations, the highest and lowest growth stimulation were observed at 0.1 and 0.4 g L⁻¹, respectively. Additionally, the type of biosurfactant was found to play a significant role in growth stimulation. Biosurfactant S1 exhibited the most pronounced stimulatory effect, where the highest fresh weight of radish tubers was recorded under the S1 biosurfactant treatment with 0.1 g L⁻¹, showing a 333% increase compared to the control. Similarly, in spearmint, the highest fresh weight was observed in the same treatment (S1-0.1), showing a 51% increase compared to the control.

Conclusion: Therefore, biosurfactants, especially when used at optimal concentrations, appear to have a high potential for stimulating plant growth and improving plant quality. These compounds could serve as sustainable and environmentally friendly technologies for optimizing plant performance and agricultural productivity.

Keywords: Foliar spraying, Plant fresh weight, Plant dry weight, Bio-stimulant.

How to Cite: Karimi, E., Asl-Reyhany, N., Alilou, A.A., Mousavi, S.B., 2025. Isolation of biosurfactant-producing bacteria from phyllosphere of non-agricultural plants and the effects of produced biosurfactants on growth of spearmint (*Mentha spicata* L.) and radish (*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*). J. Soil Plant Interact. 16(1), 37–53 (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.47176/jspi.16.1.20532>



Copyright © 2025 Isfahan University of Technology, Published by IUT Press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.



تأثیر سورفکتانت‌های زیستی باکتری‌های فیلوسفر بر رشد نعنای سنبله‌ای (*Mentha spicata*) و تربچه (*Raphanus sativus*)

اسماعیل کریمی^{۱*}، نگین اصل‌ریحانی^۱، علی اصغر علیلو^۲ و سید بهمن موسوی^۱

۱- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

۲- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ekarimi@maragheh.ac.ir , sm_ka80@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۷؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱/۳۱)

چکیده

پیشینه پژوهش و هدف: سورفکتانت‌های زیستی، مولکول‌هایی آمفیفیل هستند که توسط جانداران، به‌ویژه باکتری‌ها، تولید می‌شوند. اخیراً مشخص شده که آنها می‌توانند به‌عنوان عامل تحریک رشد گیاهان عمل نمایند. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر سورفکتانت‌های زیستی بر رشد گیاهان بود.

روش‌ها: برای این منظور ابتدا باکتری‌های مولد سورفکتانت‌های زیستی از فیلوسفر گیاهان وحشی جداسازی شده و در مرحله بعدی سورفکتانت‌های زیستی از آنها استخراج و خالص‌سازی شدند. پس از ارزیابی کیفیت سورفکتانت‌های زیستی، چهار مورد برتر انتخاب شده و با کدهای S1 تا S4 شناخته شدند. برای ارزیابی اثر محلول‌پاشی برگ‌ی با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ گرم در لیتر، بر تحریک رشد گیاهان نعنای سنبله‌ای و تربچه، آزمایشی گلدانی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه انجام شد. در پایان آزمایش صفات رشدی گیاهان اندازه‌گیری شد.

نتایج: اثر سورفکتانت‌های زیستی بر رشد گیاهان به‌شدت تحت تأثیر غلظت آن‌ها قرار داشت. غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۱ گرم بر لیتر از سورفکتانت‌های زیستی، به‌ترتیب کمترین و بیشترین آثار را بر تحریک رشد همه گیاهان مورد بررسی داشت. همچنین نوع سورفکتانت در تحریک رشد گیاهان مهم بود. سورفکتانت زیستی با کد S1 بیشترین آثار تحریکی رشدی را به همراه داشت. بیشترین مقدار وزن تازه غده به‌عنوان عملکرد اقتصادی تربچه، در تیمار سورفکتانت زیستی S1 در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد، ۳۳۳ درصد افزایش داشت. در نعنای سنبله‌ای بیشترین مقدار وزن تازه به‌عنوان عملکرد اقتصادی نیز در همین تیمار به‌دست آمد که نسبت به شاهد ۵۱ درصد افزایش داشت.

نتیجه‌گیری کلی: بنابراین به‌نظر می‌رسد، سورفکتانت‌های زیستی، به‌ویژه در غلظت و نوع مناسب، پتانسیل زیادی برای تحریک رشد و بهبود کیفیت گیاهان دارند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان یک فناوری پایدار و سازگار با محیط زیست در بهینه‌سازی عملکرد گیاهان و کشاورزی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: محلول‌پاشی برگ‌ی، وزن تازه گیاه، وزن خشک گیاه، محرک رشد زیستی.



مقدمه

دورنمای تاریک استفاده از آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی برای افزایش تولید محصولات کشاورزی، به‌منظور تامین نیازهای غذایی روزافزون جمعیت جهان، کاربرد محرک‌های رشد گیاهی مبتنی بر فورمولاسیون زیستی را در کانون توجه متخصصان عصر حاضر قرار داده است (Shukla et al., 2019). محرک‌های رشد زیستی سازگار با محیط زیست بوده و موجب ارتقا و حفظ سلامتی و کیفیت خاک می‌گردند؛ بنابراین در راستای نیل به اهداف کشاورزی پایدار موثر بوده و پایداری تولیدهای کشاورزی را در پی خواهند داشت (Karamchandani et al., 2022). سورفکتانت‌های باکتریایی به‌دلیل آثار مثبت آنها بر تحریک رشد و احتمال افزایش تحمل گیاهان در برابر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی از این دیدگاه پتانسیل مطلوبی را به‌عنوان یک محرک رشد گیاهی زیستی دارند (Shekhar et al., 2015). سورفکتانت‌ها که ماهیت آمفیفیلیک^۱ دارند، با کاهش کشش سطحی آب موجب افزایش حلالیت ترکیبات آب‌گریز شده و در علوم کشاورزی، صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی و زمینه‌های مرتبط با دانش زیست‌پالایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kumar et al., 2021). سمیت کم، زیست‌تخریب‌پذیری، آثار ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی از ویژگی‌هایی هستند که باعث برتری سورفکتانت‌های زیستی بر شیمیایی می‌شوند (Das et al., 2020). علاوه‌براین سورفکتانت‌های میکروبی از نظر تحمل دماهای بیشتر، تحمل شوری‌های زیاد، پایداری در برابر نوسانات pH، سرعت تخریب بیشتر، سمیت کمتر و انتخاب‌پذیری بهتر نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی بهتر عمل می‌نمایند (Shekhar et al., 2015). هرچند پژوهش‌های پیشین، تنها دلیل بهبود رشد گیاهان در اثر کاربرد سورفکتانت‌های زیستی را ویژگی‌های ضد میکروبی و مبارزه با پاتوژن‌ها مطرح کرده بودند، اما یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که آنها می‌توانند در شرایط غیربیماری‌زا نیز رشد گیاهان را تحریک نمایند (Karimi et al., 2024, Marchut-Mikołajczyk et al., 2020).

بررسی‌های علمی حکایت از تاثیر بیوسورفکتانت‌ها در فیزیولوژی گیاه دارند. نوعی از بیوسورفکتانت‌ها بنام رامنولپیدها با تحریک سیستم ایمنی گیاه، آثار محافظتی در برابر قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی دارند. یک رامنولپید خاص از باکتری *P. aeruginosa*، ژن‌های دفاعی را در گیاهان تنباکو، گندم و آرابیدوپسیس فعال می‌کند. در انگور، رامنولپیدها با افزایش یون کلسیم، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، فعال‌سازی پروتئین، کینازهای فعال‌شده با میتوژن و القای ژن‌های دفاعی متعدد (مانند ژن‌های پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی) و ژن‌های مسیرهای بیوسنتز اکسیلین و فیتوالکسین، واکنش‌های دفاعی قوی‌تری ایجاد می‌کنند (Varnier et al., 2009). به‌همین ترتیب، رامنولپیدها در گیاه آرابیدوپسیس نیز، دفاع را با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مختلف، القا می‌کنند که در این میان، اسید سالیسیلیک نقش مهمی ایفا می‌کند (Sanchez et al., 2012). این مواد باعث تولید هورمون‌های گیاهی مهم از جمله اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن می‌شوند که در شبکه‌های ایمنی گیاه نقش کلیدی دارند (Mnif and Ghribi, 2016). از این‌رو بعید نیست که در شرایط غیربیماری نیز کاربرد بیوسورفکتانت‌ها با تغییرات فیزیولوژیک سبب تحریک رشد گیاهان شوند (Chinnasamy et al., 2022). نتایج پژوهشی نشان داده است که برخی از رامنولپیدها نه تنها قادرند با ایجاد کمپلکس با فلزات، زیست-فراهمی آنها را در خاک افزایش دهند، بلکه باعث تسهیل عبور آنها از ریشه به درون گیاه با مسیرهای غیرفعال شده و شدت انتقال آنها از مسیر سیمپلاستی ریشه را افزایش می‌دهند (Stacey et al., 2008). با کاهش کشش سطحی آب، سورفکتانت‌های زیستی می‌توانند مستقیماً به عناصر کم‌مصرف جذب‌شده، متصل شوند و آنها را به سطح مشترک منطقه ریشه منتقل کنند (Singh and Cameotra., 2004). این موضوع می‌تواند در مدیریت خاک‌های آهکی به‌دلیل تثبیت عناصر در فاز نامحلول خاک بسیار کمک‌کننده باشد. (Sheng et al., 2008) گزارش کردند که کاربرد باکتری *Bacillus sp.* با توانایی تولید

1. Amphiphile

(*Zygophyllum fabago*) در تیرماه سال ۱۳۹۹ از منطقه یوسف-آباد مراغه جمع‌آوری شدند. بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه با جریان ملایم آب شهری شستشو شده و گرد و خاک آن‌ها حذف شد. شستشوی نهایی با جریان ملایم آب مقطر استریل انجام شد و نمونه‌های برگ این گیاهان به صورت مجزا به قطعات ریز خرد شدند و در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری و حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب نمک ۰/۱ درصد استریل، به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. این روش قادر است که ۶۰ تا ۸۰ درصد از تمام سلول‌های گونه‌های باکتریایی اپی‌فیتیک را از برگ‌ها جدا کند (O'Brien et al., 1989). پس از آماده‌شدن نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول رویی، بر روی محیط کشت آگار مغذی (Nutrient agar) منتقل شده، با میله شیشه‌ای در سطح آن پخش شده و در گرم‌خانه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از رشد باکتری‌ها، کلنی‌های غالب از نظر فراوانی برای آزمون اولیه مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور این کلنی‌ها ابتدا در محیط کشت آگار مغذی، خالص‌سازی شده و سپس بر روی محیط آگار مغذی خون‌دار کشت داده شدند. پس از گذشت چندین روز باکتری‌هایی که در این محیط رشد کردند و توانستند با همولیز خون هاله‌ای شفاف به وجود آورند به عنوان مولد سورفکتانت در نظر گرفته شدند. از این باکتری‌ها اسلنت تهیه شد تا در ادامه مراحل مورد استفاده قرار گیرد.

تولید و جداسازی سورفکتانت‌های زیستی

باکتری‌های منتخب در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا بریتانی (LB) با pH برابر با ۷، در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شده و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت دو روز با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. ۳۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۷۰ میلی‌لیتر محیط MSM (جدول ۱) مایه‌زنی و برای رشد به مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس در ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از سپری‌شدن این مدت، نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه

سورفکتانت‌های زیستی با افزایش جذب عناصر موجب افزایش رشد گیاه ذرت شد. در گیاه *Brassica juncea* کاربرد سورفکتانت‌های زیستی از دسته‌ی رامنولیپیدها، به صورت معنی-داری موجب افزایش صفات و شاخص‌های مربوط به رشد گیاه شد (Mishra et al., 2020). کاربرد سورفکتانت‌های زیستی در خاک‌های آلوده به کادمیوم، مانع ورود آن به گیاهان هویج، تربچه، زنجبیل و سیب‌زمینی شده است (Giri et al., 2017). همچنین در گیاه ذرت کاربرد سورفکتانت زیستی با ساختار لیپوپپتیدی، موجب افزایش معنی‌دار شاخص‌های جوانه‌زنی و همچنین افزایش صفات رشدی آن شد؛ بیشترین میزان رشد نیز در مقدار ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر سورفکتانت زیستی مشاهده گردید (Chaurasia et al., 2020).

کیفیت و کمیت سورفکتانت‌های زیستی به عوامل مختلفی مانند نوع ریزجانداز، محیط کشت، و زمان کشت بستگی دارد. لایه‌های مومی در فیلوسفر، یعنی کوتیکول‌های سطح برگ‌ها، مکان زندگی طیف وسیعی از باکتری‌های لیپولیتیک و تولیدکننده سورفکتانت زیستی هستند (Oso et al., 2021)، و بنابراین می‌توانند به عنوان منبع جداسازی این گونه باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین این پژوهش در ابتدا با هدف جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مولد سورفکتانت زیستی از فیلوسفر برگ گیاهان غیرزراعی انجام شد و در مرحله بعدی تأثیر سورفکتانت‌های زیستی خالص‌سازی شده بر رشد تربچه و نعنای سنبله‌ای در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری گیاهی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مولد سورفکتانت زیستی

برگ‌های میانی و سالم گیاهان شامل کاهوی وحشی (*Lactuca serriola*)، تاتوره (*Datura stramonium*)، درخت تبریزی (*Populus nigra*)، درخت بید (*Salix alba*)، کلم وحشی (*Brassica oleracea*)، درخت سنجد (*Elaeagnus angustifolia*)، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و گیاه قیچ لوبیایی

جدول ۱. اجزای محیط کشت نمک معدنی حداقل

Table 1. Components of minimum salt medium

Concentration غلظت (g 100mL ⁻¹)	Materials مواد	Concentration غلظت (g 100mL ⁻¹)	Materials مواد	Concentration غلظت (g 100mL ⁻¹)	Materials مواد
0.001	Na ₂ MoO ₄	0.1	Na ₂ -EDTA	5	NaCl
0.01	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.3	MnSO ₄	1.39	K ₂ HPO ₄
0.01	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001	CuSO ₄	0.1	(NH ₄) ₂ SO ₄

سانتریفیوژ دارای سورفکتانت زیستی باشد، این محلول می‌تواند لایه نفتی را کنار زده و در سطح آب لایه شفافی ایجاد کند (Chandankere et al., 2013).

آزمون پخش شدن قطره

میزان ۵۰ میکرولیتر از مایع کشت باکتری به صورت یک قطره در سطح پارافیل قرار داده شد. پخش شدن قطره روی سطح پارافیل به دلیل کاهش کشش سطحی، به مفهوم حضور بیوسورفکتانت بود. بدین صورت که اگر قطره کروی در سطح پارافین ایجاد شد به آن چاهک امتیاز منفی و در صورتی که این قطره به ته چاهک منتقل شده و یا شکل قطره مورد نظر از حالت کروی خارج شود به آن امتیاز مثبت تعلق گرفت (Maneerat and Phetrong., 2007).

آزمون فروپاشی روغن

۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون یک پتری‌دیش ریخته و ۲۵۰ میکرولیتر روغن مایع خوراکی به صورت یک لایه نازک به سطح آن افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع کشت باکتری به سطح روغن افزوده شد، کنار رفتن روغن و مشاهده ناحیه شفاف در سطح آب موید حضور بیوسورفکتانت بود (Maneerat and Phetrong., 2007).

فعالیت امولسیون‌کنندگی

برای انجام این آزمون، دو میلی‌لیتر از محلول روبی هر نمونه حاصل از سانتریفیوژ، درون لوله آزمایش جداگانه ریخته و دو

در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی که دارای سورفکتانت زیستی بود، جمع‌آوری شد. pH مایع رویی به دست آمده با اسید کلریدریک به ۲ رسانده شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال به مدت ۳ شبانه‌روز نگهداری شد، تا بیوسورفکتانت تشکیل رسوب دهد. جمع‌آوری کامل رسوب با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۵ درجه سلسیوس با دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در ادامه مایع رویی حذف شده و رسوب قهوه‌ای رنگ حاصل در پتری‌دیش‌های استریل تخلیه شد و در دمای آزمایشگاه هوا خشک شدند. برای حذف ناخالصی‌های همراه سورفکتانت، در یک لوله آزمایش بر روی این نمونه‌ها ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۴ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر افزوده شده و ورتکس شدند. سپس به این نمونه مدتی استراحت داده و پس از تشکیل فازها، فاز رویی به کمک سرنگ خارج شده و در ظروف پتری ریخته شد. این ظروف در زیر هود قرار داده شدند و پس از تصعید دی‌اتیل‌اتر، ماده جامد باقی‌مانده در کف ظروف پتری با کاردک جدا شده و به عنوان سورفکتانت زیستی خالص در ظروف مناسب قرار داده شدند (Chander et al., 2012).

ارزیابی کیفیت سورفکتانت‌های زیستی تهیه شده

آزمون پراکنش نفت

برای انجام این آزمون، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون یک پلیت ریخته، ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت افزوده شده و در پایان، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه حاصل از سانتریفیوژ بر روی لایه نفتی ایجاد شده، ریخته شد. اگر محلول روبی حاصل از

گیاه به عنوان فاکتور در نظر گرفته نشد و آثار جداگانه بررسی شدند و از آب خالص به عنوان شاهد (غلظت صفر سورفکتانت زیستی) استفاده شد.

مقدار پنج کیلوگرم خاک زراعی در گلدان های ۷ لیتری ریخته شد. بذور تربچه و ریزوم های نعنای سنبله ای در عمق مناسب خاک قرار داده شدند. در طی آزمایش، رطوبت آنها در ۸۰ درصد گنجایش مزرعه ای نگهداری شد. اولین محلول پاشی تربچه ۱۵ روز و نعنای سنبله ای ۲۵ روز پس از کاشت انجام شد که با فواصل زمانی یک هفته دو بار دیگر نیز تکرار شدند. پس از رسیدن گیاهان و پیش از برداشت، میانگین شاخص اسپد (کلروفیل) توسط دستگاه کلروفیل متر (SPAD) در برگ های جوان کاملاً توسعه یافته، ارزیابی شد. در مورد گیاه تربچه ارتفاع آن با خط کش و قطر طوقه با کولیس پیش از برداشت اندازه گیری شد. پس از برداشت تربچه، وزن تازه و وزن خشک شاخساره و غده به صورت جداگانه ارزیابی شد. در مورد نعنای ارتفاع گیاه، تعداد شاخه های جانبی و وزن تازه و خشک شاخساره اندازه گیری شد. وزن تازه آنها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شده و پس از خشک کردن نمونه ها در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت وزن خشک آنها یادداشت شد.

اندازه گیری رنگی های فتوسنتزی (کلروفیل a, b و کاروتنوئید)
برای اندازه گیری رنگی های فتوسنتزی از هر کدام از گیاهان یک گرم برگ تهیه شده و با استفاده از روش آرنون (Arnon, 1949) مقدار آنها تعیین شد. ۰/۵ گرم برگ تازه به همراه ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد، درون هاون چینی سائیده شد تا نهایتاً عصاره همگنی به دست آید. میزان جذب نور توسط محلول رویی در سه طول موج ۴۷۰ (A470)، ۶۴۵ (A645) و ۶۶۳ (A663) نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1800, Shimadzu, Japan) قرائت شد. محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید با استفاده از روابط (۲)، (۳) و (۴) محاسبه شدند:

$$\text{Chlorophyll a (mg g}^{-1} \text{ FW)} = [12.7(A663) - 2.79(A645)] \quad (2)$$

میلی لیتر نفت سفید نیز به هر کدام افزوده شد. سپس، هر نمونه به مدت دو دقیقه ورتکس شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط به شکل سکون قرار گرفت. پس از طی این مدت، ارتفاع امولسیون باقی مانده، اندازه گیری شد، و نسبت ارتفاع این امولسیون به ارتفاع کل مایع درون لوله آزمایش، به عنوان معیار امولسیفیکاسیون برای هر نمونه اندازه گیری شد (Chandankere et al., 2013).

اندازه گیری کشش سطحی

برای اندازه گیری کشش سطحی، پنج میلی لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ محیط کشت نمک معدنی به لوله آزمایشی که درون حمام آب با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داشت، افزوده شد و پس از تثبیت دما، لوله موئین در لوله آزمایش قرار گرفت و کشش سطحی با اندازه گیری ارتفاع صعود مایع در لوله موئین و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Viramontes et al., 2010):

$$\gamma = rhpg/2 \quad (1)$$

در این رابطه γ کشش سطحی (dyne/cm)، ρ چگالی مایع (g/mL)، g شتاب گرانش (۹۸۰ cm/s²)، r شعاع لوله موئین (cm) و h ارتفاع مایع در لوله موئین بر حسب سانتی متر است.

آزمایش گلخانه ای برای ارزیابی تاثیر سورفکتانت های زیستی تهیه شده بر رشد گیاهان

این پژوهش در سال ۱۴۰۰ در گلخانه پژوهشی گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه مراغه، در شرایط گلخانه ای با دمای برابر 23 ± 5 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۰ درصد انجام شد. در این پژوهش اثر محلول پاشی چهار سورفکتانت زیستی خالص شده از باکتری های فیلوسفری کاهوی وحشی با کد S1، درخت تبریزی با کد S2، قیچ لوبیایی با کد S3 و درخت سنجد با کد S4 بر برخی از ویژگی های رشدی تربچه و نعنای سنبله ای، در ۴ غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ گرم بر لیتر به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام گرفت.

جدول ۲. ارزیابی ویژگی‌های معمول سورفکتانت‌های زیستی حاصل از باکتری‌های فیلوسفری گیاهان مختلف

Table 2. Evaluation of common characteristics of biosurfactants derived from phyllospheric bacteria of various plants

Surface tension (dyn/cm)	Emulsification index (%)	Drop collapse	Oil spreading index	Hemolysis (mm)	Biosurfactant-producing bacteria were isolated from the host plant's phyllosphere
کشش سطحی	شاخص امولسیون‌کنندگی (%)	پخش شدن روغن	شاخص فروپاشی روغن	همولیز (mm)	باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت جداسازی شده از فیلوسفر گیاهان
9	0.0	-	0.00	-	Control
6	11	+	0.46	0.5	Lactuca serriola (S1)
9	9	-	0.35	0.4	
4	11	+	0.20	0.3	Glycyrrhiza glabra
9	8	+	0.25	0.2	
10	18	-	0.42	0.6	Populus nigra (S2)
6	21	+	0.21	0.3	
8	16	+	0.42	0.6	Elaeagnus angustifolia (S4)
9	15	+	0.46	0.4	
7	14	+	0.35	0.3	Zygophyllum fabago (S3)

*چهار سورفکتانت زیستی خالص‌شده از باکتری‌های فیلوسفری کاهوی وحشی با کد S1، درخت تبریزی با کد S2، قیچ لوبیایی با کد S3 و درخت سنجد با کد S4 که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، به‌صورت پررنگ نشان داده شده‌اند.

*The four biosurfactants isolated from the phyllospheric bacteria of wild lettuce (coded S1), poplar tree (coded S2), bean locust (coded S3), and oleaster tree (coded S4) that were used in this study are highlighted in bold.

بید و کلم وحشی، باکتری مولد سورفکتانت زیستی یافت نشد. نتایج بررسی ویژگی‌های سورفکتانت‌های زیستی باکتری‌های فیلوسفری به‌طور خلاصه در جدول ۲ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که سورفکتانت‌های زیستی حاصل از باکتری‌های فیلوسفری در گیاهان کاهو، درخت تبریزی، درخت سنجد و گیاه قیچ لوبیایی نسبت به سایر باکتری‌های فیلوسفری مطلوب‌تر هستند. بنابراین سورفکتانت‌های زیستی حاصل از این باکتری‌ها به‌عنوان تیمارهای مرحله بعدی آزمایش انتخاب شدند.

نتایج پژوهش‌های گلخانه‌ای

تربیحه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که آثار نوع سورفکتانت زیستی و غلظت کاربرد آن‌ها بر صفات مورفولوژیک تربیحه شامل قطر طوقه، ارتفاع ساقه، وزن تازه و خشک غده، شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۱-الف) نشان داد که

Chlorophyll b (mg g⁻¹ FW)=

$$[21.50 (A645)-5.10(A663)] \quad (3)$$

Carotenoids (mg g⁻¹ FW) =

$$[1000(A470)-1.82Ca-85.02Cb]/198 \quad (4)$$

تجزیه و تحلیل داده‌های این آزمایش با استفاده از SAS ver. 9.0 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

جداسازی و ارزیابی سورفکتانت‌های زیستی تولیدشده

از ۸ نمونه گیاهی مورد استفاده مجموعاً ۱۵ باکتری به‌عنوان باکتری غالب بر روی محیط کشت آگار مغذی جداسازی شد. ارزیابی اولیه‌ی توان تولید سورفکتانت زیستی توسط باکتری‌ها بر روی محیط کشت آگار خون‌دار نشان داد که ۹ باکتری می‌توانند سورفکتانت زیستی تولید کنند. در شرایط انجام این پژوهش از باکتری‌های غالب فیلوسفری گیاهان تاتوره، درخت

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس تاثیر کاربرد سورفکتانت‌های زیستی استخراج شده از گیاهان مختلف در غلظت‌های متفاوت بر برخی از صفات مورفولوژیک گیاه تربچه

Table 3. Results of analysis of variance (ANOVA) on the effect of biosurfactants extracted from various plants at different concentrations on certain morphological traits of radish plant

Mean Squares میانگین مربعات						DF درجه آزادی	Sources of variation منابع تغییر
Aboveground dry weight وزن خشک شاخساره	Aboveground fresh weight وزن تازه شاخساره	Tuber dry weight وزن خشک غده	Tuber fresh weight وزن تازه غده	Aboveground height ارتفاع شاخساره	Diameter of collar قطر طوقه		
0.116**	29.26**	0.14**	54.40**	10.08**	1.36**	3	Biosurfactant type نوع سورفکتانت
0.139**	142.36**	2.72**	128.98**	69.47**	3.10**	3	Biosurfactant concentration غلظت سورفکتانت
0.228**	19.01**	0.34**	47.51**	13.32**	0.58**	9	Biosurfactant type × Concentration نوع سورفکتانت × غلظت آن
0.022	2.77	0.02	2.25	2.29	0.05	47	Error خطا
10.84	16.45	12.18	14.89	10.82	6.34		CV (%) ضریب تغییرات (%)

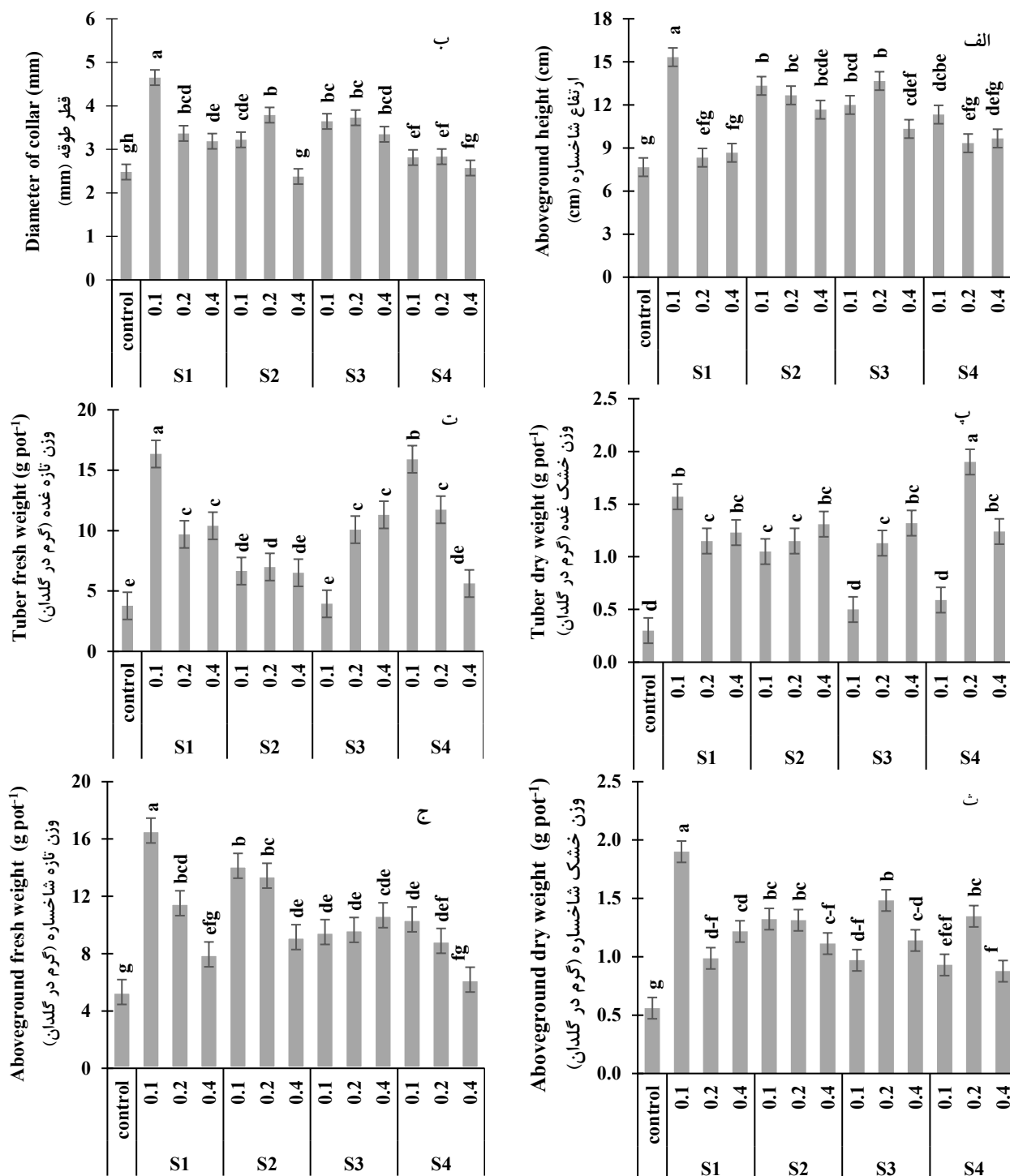
** stands for significant effects at 1% probability level.

** بیانگر معنی داری در سطح احتمال یک درصد است.

گردید. بیشترین مقدار وزن تازه غده (شکل ۱-ت) در تیمار S1-0.1 به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۳۳۳ درصد افزایش داشت. کمترین مقدار وزن تازه غده در تیمار شاهد مشاهده شد و تیمارهای S3-0.1 و S4-0.4 نیز در مرتبه بعدی قرار داشتند. بیشترین مقدار وزن خشک شاخساره در تربچه (شکل ۱-ث) در تیمار S1-0.1 مشاهده شد که باعث افزایش ۲۳۹ درصد وزن خشک شاخساره نسبت به گیاهان شاهد شده بود. کمترین مقدار وزن خشک شاخساره به ترتیب در تیمارهای S4-0.1، S4-0.4، S3-0.1، S2-0.4 و S1-0.2 تیمار شاهد مشاهده گردید. بیشترین مقدار وزن تازه شاخساره (شکل ۱-ج) در گیاهان تیمار شده با S1-0.1 مشاهده گردید که باعث افزایش ۲۱۱ درصدی وزن تازه شاخساره نسبت به گیاهان تیمار شاهد شده بود. کمترین مقدار آن در تیمارهای شاهد، S1-0.04 و S4-0.04 مشاهده شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف سورفکتانت‌های زیستی استخراج شده از منابع مختلف

بیشترین ارتفاع ساقه به ترتیب در تیمارهای S1-0.1 و S3-0.2 مشاهده شد. استفاده از سورفکتانت در این دو تیمار به ترتیب باعث افزایش ۱۱۳/۸ و ۱۰۸/۸ درصدی ارتفاع ساقه نسبت به گیاهان تیمار شاهد شد. کمترین ارتفاع به ترتیب در تیمارهای شاهد، S2-0.2، S2-0.4، S4-0.2 و S4-0.4 ثبت شد. قطر طوقه در گیاه تربچه (شکل ۱-ب) در اثر محلول پاشی سورفکتانت زیستی نسبت به گیاهان تیمار شاهد افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار قطر طوقه در تیمار S1-0.1 مشاهده شد و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای S4-0.4، S2-0.4 و شاهد قرار داشت. غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر سورفکتانت زیستی S1 باعث افزایش ۸۷/۵ درصدی قطر طوقه در مقایسه با تیمار شاهد شد. بیشترین مقدار وزن خشک غده تربچه (شکل ۱-پ) در تیمار S4-0.2 به دست آمد که باعث افزایش ۵ برابری وزن خشک غده در مقایسه با تیمار شاهد شد. درحالی که کمترین مقدار آن در تیمار شاهد بود و پس از آن در تیمارهای S3-0.1 و S4-0.1 مشاهده



شکل ۱. مقایسه میانگین ارتفاع (الف)، قطر طوقه (ب)، وزن خشک غده (پ)، وزن تازه غده (ت)، وزن خشک شاخساره (ث) و وزن تازه

شاخساره تربچه در اثر محلول‌پاشی با غظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر انواع سورفکتانت‌های زیستی.

S1، S2، S3 و S4 به ترتیب انواع مختلف سورفکتانت زیستی می‌باشند. شاهد (کنترل) نمایان‌گر غلظت صفر سورفکتانت‌های زیستی (تیمار با آب مقطر) است. ستون‌های دارای حروف یکسان با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

Fig. 1. Mean comparisons of height of radish, diameter of collar, tuber dry weight, tuber fresh weight, aboveground dry weight and, aboveground fresh weight at with concentrations of zero (control), 0.1, 0.2, and 0.4 mg/L of different types of biosurfactants. S1, S2, S3, and S4 represent different types of biosurfactants, respectively. The control for biosurfactants is distilled water as zero concentration. Columns with the same letters are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس تاثیر کاربرد سورفکتانت‌های زیستی استخراج شده از گیاهان مختلف در غلظت‌های متفاوت بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و شاخص اسپد (کلروفیل) گیاه تربچه

Table 4. Results of analysis of variance (ANOVA) on the effect of application of biosurfactants extracted from various plants at different concentrations on photosynthetic pigments and SPAD chlorophyll index of radish plants

Mean squares میانگین مربعات				DF درجه آزادی	Sources of variation منابع تغییر
SPAD Chlorophyll index شاخص اسپد کلروفیل	Carotenoid کارتنوئید	Chlorophyll b کلروفیل ب	Chlorophyll a کلروفیل آ		
47.90**	7.62**	12.39**	149.61**	3	Biosurfactant type نوع سورفکتانت
270.54**	6.75**	14.32**	34.38**	3	Biosurfactant concentration غلظت سورفکتانت
26.99**	14.99**	11.60**	53.89**	9	Biosurfactant type × Concentration نوع سورفکتانت × غلظت آن
3.54	0.68	1.77	1.26	47	Error خطا
7.34	1.65	6.8	6.56		CV (%) ضریب تغییرات (%)

** stands for significant effects at 1% probability level.

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد است.

شاخص اسپد (کلروفیل) در گیاه تربچه شدند و کمترین شاخص اسپد (کلروفیل) در تیمار شاهد مشاهده شد که با شاخص اسپد (کلروفیل) در گیاهان تیمار شده با S4-0.2 تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین مقدار شاخص اسپد (کلروفیل) برگ تربچه در تیمار S1-0.1 به‌دست آمد که باعث افزایش ۸۳ درصد این صفت در مقایسه با شاهد شد (شکل ۲-ث).

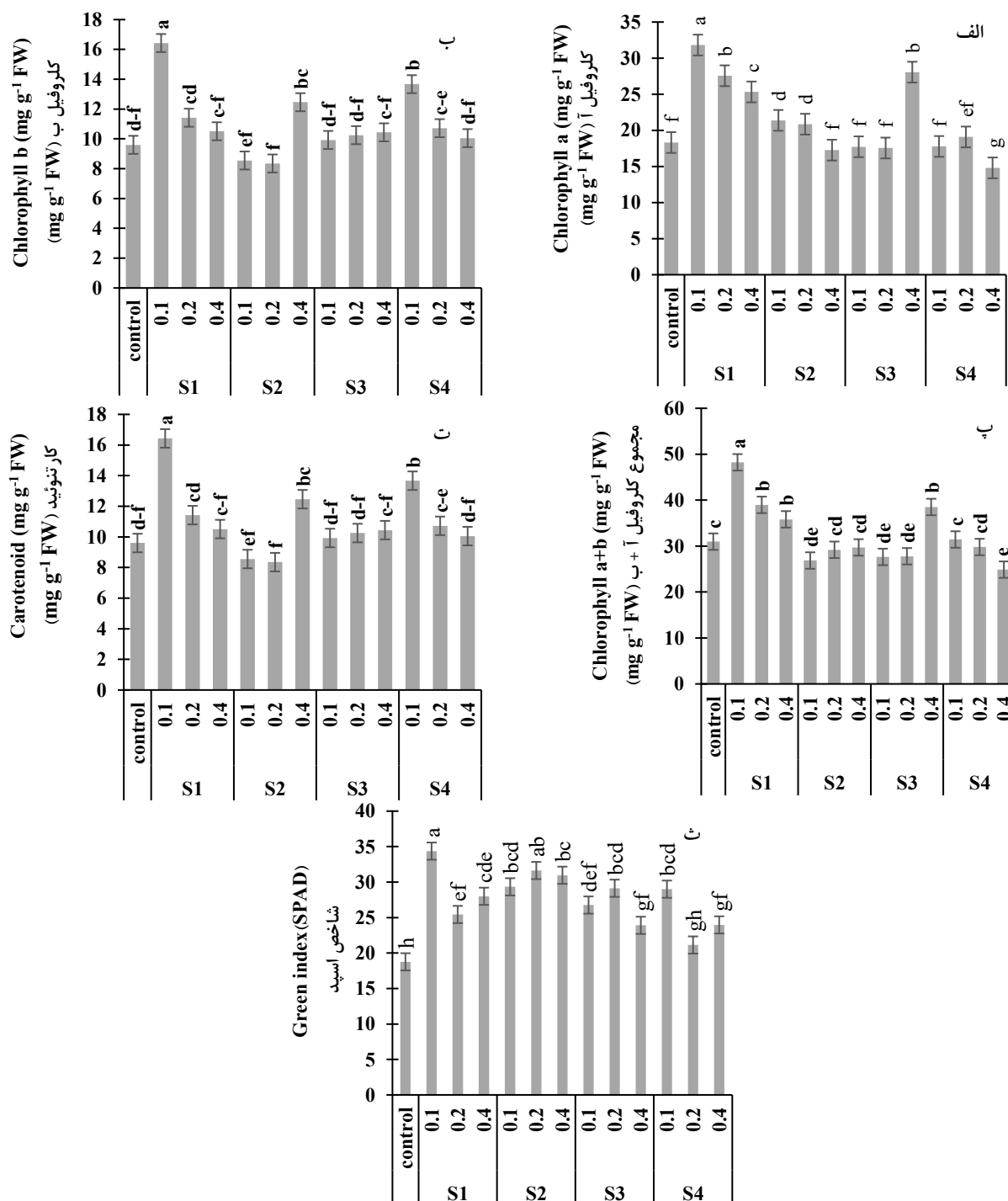
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع و غلظت سورفکتانت در سطح احتمال یک درصد بر ارتفاع ساقه، وزن تازه، وزن خشک شاخساره و تعداد شاخه جانبی معنی‌دار بود (جدول ۵).

صفات مورفولوژیک نعنای سنبله‌ای

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که سورفکتانت‌های زیستی استخراج شده سبب بهبود صفات مورفولوژیک در گیاه نعنای سنبله‌ای می‌شوند. بیشترین مقدار وزن تازه در تیمار S1-0.1 به‌دست آمد که نسبت به شاهد ۵۱ درصد افزایش داشت، و

باکتریایی بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بر گیاه تربچه از جمله کلروفیل a، b و کاروتنوئید و همچنین شاخص اسپد (کلروفیل) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با اعمال تیمارهای آزمایشی، بیشترین مقدار کلروفیل a (شکل ۲-الف) در گیاهان تیمار شده با S1-0.1 و کمترین آن در تیمار S4-0.4 مشاهده شد و تیمارهای شاهد و S2-0.4، S3-0.1، S3-0.2، S4-0.1 در مرحله بعدی قرار داشتند. تیمارهای S1-0.1، S2-0.4 و S4-0.1 باعث افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل b در تربچه شدند اما میزان آن در بقیه تیمارها با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین مقدار کلروفیل b در تیمار S1-0.1 مشاهده شد و ۷۱ درصد مقدار کلروفیل b را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۲-ب). مقدار کاروتنوئید در گیاهان تربچه در تیمار S1-0.1، ۷۴ درصد در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت در حالی که سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند (شکل ۲-ت). سورفکتانت‌های زیستی در اکثر غلظت‌های مورد بررسی باعث افزایش



شکل ۲. مقایسه میانگین کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، مجموع کلروفیل های a+b (پ)، کارتنوئید (ت) و شاخص اسپد (کلروفیل) (ث) در برگ‌های تربچه در اثر محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر انواع مختلف سورفکتانت‌های زیستی. S1، S2، S3 و S4 به ترتیب انواع مختلف سورفکتانت زیستی می‌باشند. شاهد (کنترل) نمایان‌گر غلظت صفر سورفکتانت‌های زیستی (تیمار با آب مقطر) است. ستون‌های دارای حروف یکسان با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

Fig. 2. Mean comparisons of SPAD chlorophyll index, carotenoid, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll (a + b) in radish leaves at concentrations of zero (control), 0.1, 0.2, and 0.4 mg/l of different types of biosurfactants. S1, S2, S3, and S4 represent different types of biosurfactants, respectively. The control for biosurfactants is distilled water as zero concentration. Columns with the same letters are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس تاثیر کاربرد سورفکتانت های زیستی استخراج شده از گیاهان مختلف در غلظت های متفاوت بر برخی از صفات مورفولوژیک گیاه نعنای سنبله ای

Table 5. Results of analysis of variance (ANOVA) on the effect of application of biosurfactants extracted from various plants at different concentrations on some morphological traits of spearmint plants

Mean Squares میانگین مربعات				DF درجه آزادی	Sources of variation منابع تغییر
Number of side branches تعداد شاخه های جانبی	Aboveground dry weight وزن خشک شاخساره	Aboveground wet weight وزن تر شاخساره	Stem height ارتفاع ساقه		
661**	1.51**	2.09**	2.18 ^{ns}	3	Biosurfactant type نوع سورفکتانت
519 ^{ns}	3.98**	12.81**	48.91**	3	Biosurfactant concentration غلظت سورفکتانت
194**	0.58**	3.24**	9.72**	9	Biosurfactant type × Concentration نوع سورفکتانت × غلظت آن
20.62	0.04	0.32	1.27	48	Error خطا
12.01	12.66	8.64	7.8		CV (%) ضریب تغییرات (%)

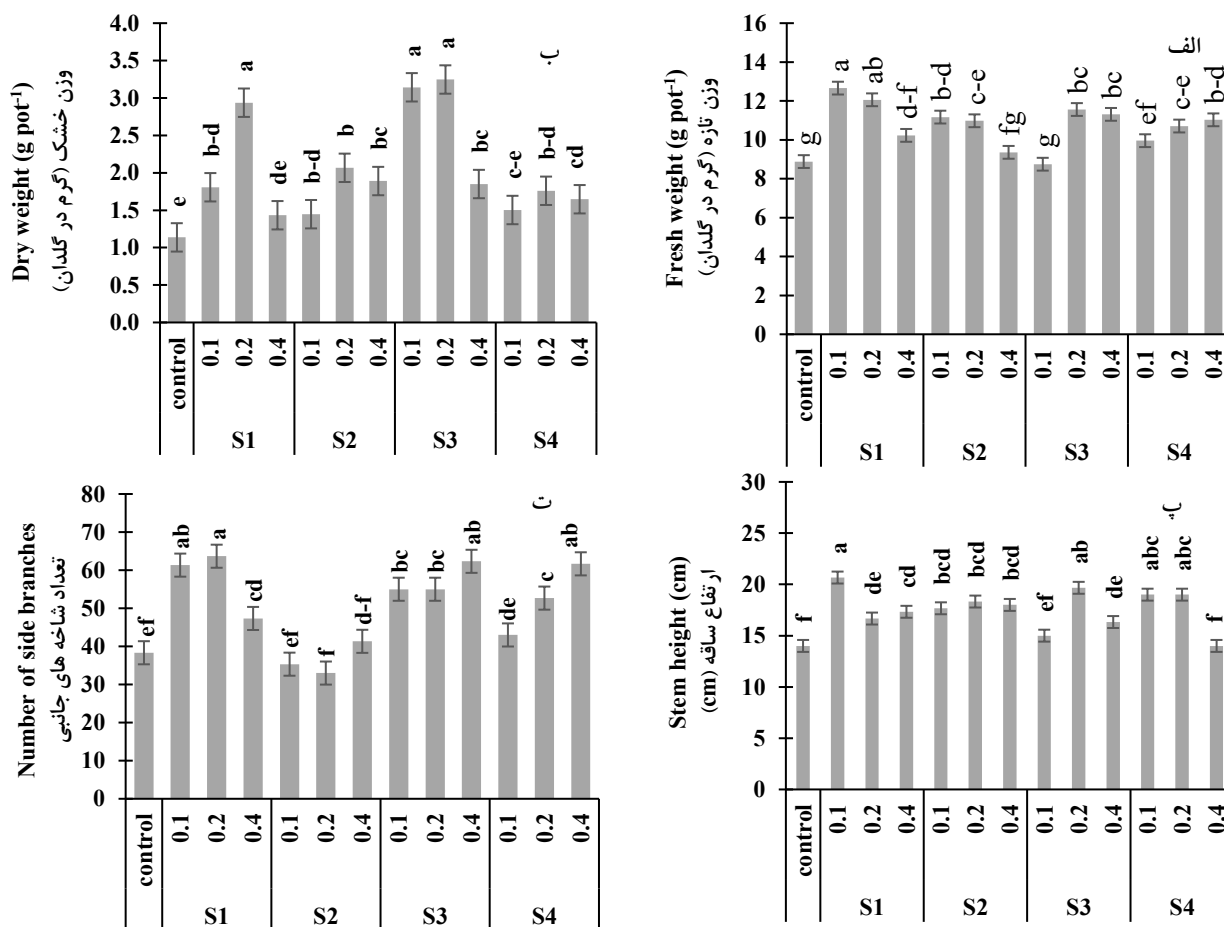
** stands for significant effect at the 1% probability level and ^{ns} shows non-significant effect.

** بیانگر معنی داری در سطح احتمال یک درصد و ^{ns} بیانگر غیرمعنی دار بودن است.

در تیمارهای S2-0.1، S2-0.2، S2-0.4 مشاهده شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳-ت). نتایج تجزیه واریانس داده های به دست آمده در مورد رنگریزه های فتوسنتزی نعنای سنبله ای نشان داد که آثار اصلی غلظت و نوع سورفکتانت زیستی و همچنین اثر برهمکنش آن ها بر تمامی این صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۶).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین ها بیشترین مقدار کلروفیل a در S1-0.1، S1-0.2 و S3-0.4 مشاهده شد که به ترتیب باعث افزایش ۴۰/۹، ۳۴/۶ و ۳۷/۴ درصدی در مقدار این صفت در نعنای سنبله ای شدند (شکل ۴-الف). تیمارهای S1-0.1، S2-0.4 و S4-0.1 سبب تولید بیشترین میزان کلروفیل b شدند و کمترین مقدار آن در تیمارهای S2-0.1 و S-0.2 مشاهده شد که تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشت (شکل ۴-ب). بیشترین میزان مجموع کلروفیل های a+b در تیمار S1-0.2 مشاهده شد که تفاوت معنی داری با تیمارهای S1-0.1 و S3-0.4 نداشت. کمترین

کمترین مقدار آن در تیمارهای S3-0.1 و شاهد و در مرتبه بعدی در تیمار S2-0.4 مشاهده شد (شکل ۳-الف). بیشترین مقدار وزن خشک شاخساره در تیمارهای S1-0.2، S3-0.1 و S3-0.2 به دست آمد، که به ترتیب باعث افزایش ۱۷۶/۴، ۱۸۵/۵ و ۱۶۱/۴ درصدی این صفت در مقایسه با تیمار شاهد شد. کمترین مقدار وزن خشک در گیاهان شاهد مشاهده گردید که با S4-0.1 تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳-ب). بیشترین مقدار ارتفاع در گیاهان تیمار شده با S1-0.1 به دست آمد، که باعث افزایش ۴۷ درصدی ارتفاع نسبت به شاهد شد و با ارتفاع گیاهان تیمار شده با S3-0.2، S4-0.1 و S4-0.2 تفاوت معنی داری نداشت. از سوی دیگر کمترین مقدار ارتفاع ساقه در گیاهان شاهد مشاهده شد که با ارتفاع گیاهان تیمار شده S3-0.1 و S4-0.4 تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳-پ). بیشترین تعداد شاخه جانبی در تیمارهای S1-0.1، S1-0.2، B3-0.4 و S4-0.4 مشاهده شد، که به ترتیب باعث افزایش ۶۰/۷، ۶۶/۱، ۶۲/۶ و ۶۰/۸ درصدی تعداد شاخه جانبی نسبت به گیاهان شاهد شدند. کمترین تعداد شاخه جانبی



شکل ۳. مقایسه میانگین وزن تازه (الف)، وزن خشک (ب)، ارتفاع (پ) و تعداد شاخه‌های جانبی نعنای سنبله‌ای (ت) در اثر محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر انواع مختلف سورفکتانت‌های زیستی.

S1، S2، S3 و S4 به ترتیب انواع مختلف سورفکتانت زیستی می‌باشند. شاهد (کنترل) نمایان‌گر غلظت صفر سورفکتانت‌های زیستی بوده و تیمار با آب مقطر می‌باشد. ستون‌های دارای حروف یکسان با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

Fig. 3. Mean comparisons of fresh weight, dry weight, height, and number of lateral branches of spearmint due to foliar application with concentrations of zero (control), 0.1, 0.2, and 0.4 mg/L of different types of biosurfactants. S1, S2, S3, and S4 represent different types of biosurfactants, respectively. The control for biosurfactants is distilled water as zero concentration. Columns with the same letters are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

مقایسه با گیاهان شاهد تجربه نمایند (et al., 2021 Marchut). اگرچه تاکنون هنوز اظهار نظر شفافی در مورد سازوکار اثر سورفکتانت‌ها مبنی بر چگونگی تحریک رشد گیاهان ارائه نشده است اما با توجه به ماهیت کارکرد آنها این عمل ممکن است به دلیل افزایش فراهمی ترکیبات آب‌گریز در سازوکار گیاهان باشد (Marchut-Mikolajczyk et al., 2018). این امر می‌تواند یکی از دلایل آثار منفی سورفکتانت‌ها بر رشد گیاهان در کاربرد غلظت‌های بیشتر باشد که سبب افزایش بیش از حد فراهمی زیستی ترکیبات آب‌گریز می‌شود. بنابراین گیاه قادر به انجام متابولیسم

میزان آن در تیمار S4-0.4 مشاهده شد که پس از آن تیمار شاهد قرار داشت (شکل ۴-پ). در بین تیمارهای مورد بررسی، تنها تیمار S1-0.1 منجر به افزایش معنی‌دار ۵۷ درصدی محتوای کاروتنوئید برگ در مقایسه با تیمار شاهد شد. سایر محلول‌پاشی‌ها باعث کاهش تغییر یا نبود تغییر معنی‌دار در میزان کاروتنوئید شدند (شکل ۴-ت).

گزارش شده است که کاربرد سورفکتانت زیستی استخراج‌شده از نوعی باکتری باسیلوس در غلظت ۰/۲ درصد سبب شد تا گیاهچه‌های لوبیا، تربچه و چغندر رشدی چند برابر را در

Table 6. Results of analysis of variance (ANOVA) on the effect of application of biosurfactants extracted from various plants at different concentrations on the photosynthetic pigments of spearmint plants

Table 6. Results of analysis of variance (ANOVA) on the effect of application of biosurfactants extracted from various plants at different concentrations on the photosynthetic pigments of spearmint plants

Mean squares میانگین مربعات				DF درجه آزادی	Source of variation منابع تغییر
Carotenoid کارتنوئید	Chlorophyll a+b مجموع کلروفیل آ + ب	Chlorophyll b کلروفیل ب	Chlorophyll a کلروفیل آ		
7.61**	102.65**	5.58**	129.16**	3	Biosurfactant type نوع سورفکتانت
7.68**	84.45**	11.25**	1.53 ^{ns}	3	Biosurfactant concentration غلظت سورفکتانت
14.99**	50.35**	6.74**	45.52**	9	Biosurfactant type × Concentration نوع سورفکتانت × غلظت آن
0.74	2.93	0.82	1.16	47	Error خطا
17.45	12.13	13.65	7.87		CV (%) ضریب تغییرات (%)

** stands for significant effect at the 1% probability level and ^{ns} shows non-significant effect.

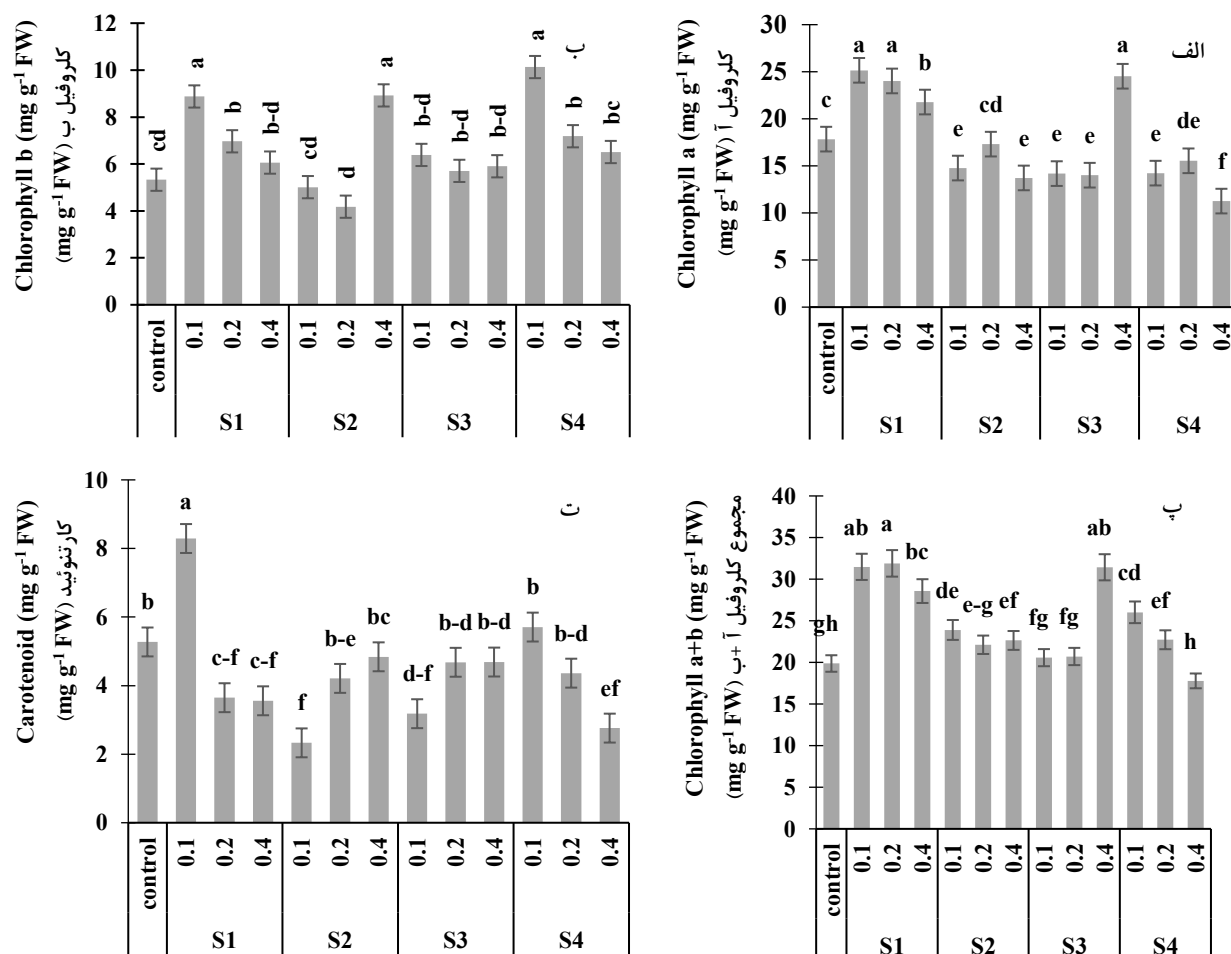
*** بیانگر معنی داری در سطح احتمال یک درصد و ns بیانگر غیر معنی دار بودن است.

زیستی ۱۰ میلی گرم بر گرم در گیاهان سورگوم و شاهی را تایید کرد (Marchut-Mikolajczyk et al., 2018). گزارش شده است که سورفکتانت زیستی جداشده از سویه *P. guariconensis* دارای صفاتی مانند انحلال فسفات و تولید سیدروفورها، تحریک سنتز هورمون ایندول استیک اسید و ۱-aminocyclopropane-carboxylate deaminase (ACCD) باعث بهبود رشد و افزایش ۸۸ درصدی عملکرد گیاهان آفتابگردان می شوند. بنابراین، فرمولاسیون های مبتنی بر سورفکتانت زیستی در بهبود وضعیت کلی سلامت گیاه، رشد نهال، جوانه زنی بذر و عملکرد محصول بسیار مفید هستند (Khare and Arora, 2021). Karthika et al. (2020) نشان دادند با کاربرد بیوسوفکتانت در گوجه فرنگی جوانه زنی و شاخص رشد آن افزایش یافت و دلیل آن را کاهش عوامل بیماری زا بیان نمودند.

نتیجہ گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سورفکتانت‌های زیستی استخراج‌شده از باکتری‌های فیلوسفری می‌توانند سبب تحریک

این ترکیبات نبوده و ممکن است، موجب آسیب به گیاه شوند (Sachdev and Cameotra, 2013). (Karimi et al. 2024) نیز در پژوهشی گزارش کردند که سورفکتانت زیستی استخراج شده از باکتری‌های موجود در کمپوست، ضمن اینکه توانست موجب افزایش جذب آهن در گیاه لوبیا شود، رشد آن را به‌طور قابل توجهی افزایش داد. اگرچه در پژوهش حاضر، می‌توان یکی از عوامل موثر در ترغیب رشد گیاهان را افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه افزایش میزان کربوهیدرات‌ها و سایر ترکیبات مورد نیاز را عنوان نمود، اما رابطه خطی بین آنها و ویژگی‌های گیاهی مورد بررسی وجود ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد که انجام پژوهش‌های تکمیلی برای اطلاع از سازوکارهای احتمالی مورد نیاز باشد. در پژوهشی (Liu et al. 2010) نشان دادند که سورفکتانت زیستی رامنولپید، موجب بهبود کارایی علف‌کش گلیفوزیت با ساختار آلی شد، و عبور آن را از کوتیکول آب‌گریز گیاه تسهیل نمود. تحریک رشد گیاه ناشی از سورفکتانت زیستی به‌دست‌آمده از *B. pumilus* که یک سویه اندوفیت بود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج افزایش جوانه‌زنی در غلظت سورفکتانت



شکل ۴. مقایسه میانگین شاخص اسپد (کلروفیل)، کارتنوئید، کلروفیل a، کلروفیل b و مجموع کلروفیل های a+b در برگ‌های تربچه در اثر محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر انواع سورفکتانت‌های زیستی.

S1، S2، S3 و S4 به ترتیب انواع مختلف سورفکتانت زیستی می‌باشند. شاهد (کنترل) نمایان‌گر غلظت صفر سورفکتانت‌های زیستی بوده و تیمار با آب مقطر می‌باشد. ستون‌های دارای حروف یکسان با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

Fig. 4. Mean comparisons of SPAD chlorophyll index, carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll a+b in radish leaves at concentrations of zero (control), 0.1, 0.2, and 0.4 mg/L of different types of biosurfactants.

S1, S2, S3, and S4 represent different types of biosurfactants, respectively. The control for biosurfactants is distilled water as zero concentration. Columns with the same letters are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

بیوسورفکتانت‌ها باشد. با توجه به این نتایج، می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب مناسب مقدار و نوع سورفکتانت می‌تواند آثار مثبتی بر رشد و توسعه گیاهان داشته باشد. این یافته‌ها می‌توانند به بهینه‌سازی کاربرد سورفکتانت‌های زیستی در کشاورزی و بهبود عملکرد گیاهان در شرایط مختلف کمک کنند. سورفکتانت‌های زیستی، به عنوان جایگزینی پایدار و دوست‌دار محیط‌زیست، پتانسیل زیادی در بهبود رشد گیاهان، جوانه‌زنی بذر و کیفیت

قابل توجهی در رشد نعنای سنبله‌ای و تربچه شوند. تیمار سورفکتانت زیستی S1 با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر لیتر به نظر بهترین نتیجه را در تمام صفات مورد بررسی گیاهان نعنای سنبله‌ای و تربچه به دست آورد و موجب بهبود قابل توجه رشد گیاه شد. در مقابل، برخی تیمارها مانند سورفکتانت زیستی S2 با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم نتایج ضعیفی داشتند که ممکن است به دلیل غلظت یا نامناسب بودن ساختار

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه مراغه و آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک این دانشگاه به لحاظ فراهم آوردن شرایط انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می- نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ گونه تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

محصولات کشاورزی دارند. با این وجود، چالش‌هایی مانند هزینه‌های زیاد تولید، محدودیت منابع خام و نیاز به بهینه‌سازی دستورالعمل خالص‌سازی، مانع از تولید گسترده و تجاری‌سازی آن‌ها شده‌اند. پژوهش‌های آینده باید بر درک بهتر مکانیسم‌های اثر این ترکیبات، طراحی روش‌های اقتصادی برای تولید در مقیاس بزرگ و بهبود فرمولاسیون‌های موجود به‌منظور کاربرد مؤثر در کشاورزی متمرکز شود. از این‌رو، بهره‌برداری درست از قابلیت‌های سورفکتانت‌های زیستی می‌تواند به توسعه کشاورزی پایدار و حفاظت از محیط زیست کمک کند.

References

منابع مورد استفاده

- Chandankere, R., Yao, J., Choi, M.M., Masakorala, K., Chan, Y., 2013. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem. Eng. J.* 74, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.018>.
- Chander, C.S., Lohitnath, T., Kumar, D.M., Kalaichelvan, P.T., 2012. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative. *Adv. Appl. Sci. Res.* 3(3), 1827–31.
- Chaurasia, L.K., Tamang, B., Tirwa, R.K., Lepcha, P.L., 2020. Influence of biosurfactant producing *Bacillus tequilensis* LK5. 4 isolates of kinema, a fermented soybean, on seed germination and growth of maize (*Zea mays* L.). *Biotechnol.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01402.x>.
- Chinnasamy, M., Rathanasamy, R., Selvam, S., Mohankumar, H. K., Anandraj, M., Pal, S.K., 2022. Biosurfactant as biostimulant: Factors responsible for plant growth promotions. In: Inamuddin, Altalhi, T. (Eds.), *Applications of Biosurfactant in Agriculture* (pp. 45–68). Academic Press.
- Das, P., Mukherjee, S., Sivapathasekaran, C., Sen, R., 2010. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. In: Sen, R. (Ed.), *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 672. Springer, New York, NY. pp. 49–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_7.
- De Vasconcelos, G.M.D., Mulinari, J., de Oliveira Schmidt, V.K., Matosinhos, R.D., De Oliveira, J.V., de Oliveira, D., De Andrade, C.J., 2020. Biosurfactants as green biostimulants for seed germination and growth. *IJAMBR.* 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.20431/2454-9428.0601001>.
- Giri, S.S., Sen, S.S., Jun, J.W., Sukumaran, V., Park, S.C., 2017. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-derived biosurfactant in mediating immune responses in Carp Rohu and its application to the food industry. *Front. Microbiol.* 8, 514. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00514>.
- Karamchandani, B.M., Pawar, A.A., Pawar, S.S., Syed, S., Mone, N.S., Dalvi, S.G., Satpute, S.K., 2022. Biosurfactants' multifarious functional potential for sustainable agricultural practices. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 1047279. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1047279>.
- Karimi, E., Derogarian, M., Hassanpouragdam, M.B., Alilo, A., Amini, M., 2024. Bacterial biosurfactants stimulate the growth of beans and improve foliar-treated Fe absorption. *Plant Proc. Func.* 12(58), 67–76. <https://doi.org/10.22034/12.58.67>.
- Karthika, S., Midhun, S.J., Jisha, M.S., 2020. A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus sp.* KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microb. Pathog.* 142, 104049. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104049>.
- Khare, E., Arora, N.K., 2021. Biosurfactant based formulation of *Pseudomonas guariconensis* LE3 with multifarious plant growth promoting traits controls charcoal rot disease in *Helianthus annuus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03015-4>.
- Kumar, A., Singh, S.K., Kant, C., Verma, H., Kumar, D., Singh, P.P., Kumar, M., 2021. Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants* 10(9), 1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>.
- Liu, W.W., Yin, R., Lin, X.G., Zhang, J., Chen, X.M., Li, X.Z., Yang, T., 2010. Interaction of biosurfactant-microorganism to enhance phytoremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) contaminated soils with

alfalfa (*Medicago sativa* L.). Huan Jing Ke Xue 31(4), 1079–1084.

14. Maneerat, S., Phetrong, K., 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 29(3), 781–791. <https://doi.org/10.5897/AJEST12.068>.

15. Marchut-Mikolajczyk, O., Drożdżyński, P., Pietrzyk, D., Antczak, T., 2018. Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic bacteria isolated from *Chelidonium majus* L. Microb. Cell. fact. 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1017-5>.

16. Marchut-Mikolajczyk, O., Drożdżyński, P., Polewczyk, A., Smulek, W., Antczak, T., 2021. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. Microb. Cell. fact. 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01533-2>.

17. Mishra, I., Fatima, T., Egamberdieva, D., Arora, N.K., 2020. Novel bioformulations developed from *Pseudomonas putida* BSP9 and its biosurfactant for growth promotion of *Brassica juncea* (L.). Plants 9(10), 1349. <https://doi.org/10.3390/plants9101349>.

18. Mnif, I., Ghribi, D., 2016. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. J. Sci. Food. Agric. 96(13), 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>.

19. Oso, S., Fuchs, F., Übermuth, C., Zander, L., Daunaraviciute, S., Remus, D.M., Remus-Emsermann, M.N.P., 2021. Biosurfactants produced by phyllosphere-colonizing pseudomonads impact diesel degradation but not colonization of leaves of gnotobiotic *Arabidopsis thaliana*. Appl. Environ. Microbiol. 87(9), e00091–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00091-21>.

20. Özyilmaz, Ü., Benlioglu, K., 2013. Enhanced biological control of phytophthora blight of pepper by biosurfactant-producing *Pseudomonas*. Plant Pathol. J. 29(4), 418. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2012.0176>.

21. Sachdev, D. P., Cameotra, S. S., 2013. Biosurfactants in agriculture. AMBB. 97, 1005–1016. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>.

22. Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.H., Clément, C., Dorey, S. 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. Plant Physiol. 160(3), 1630–1641. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>.

23. Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T., 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 45(14), 1522–1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>.

24. Sheng, X., He, L., Wang, Q., Ye, H., Jiang, C., 2008. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus sp.* J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. J. Hazard. Mater. 155(1-2), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.107>.

25. Shukla, P.S., Mantin, E.G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A.T., Prithiviraj, B., 2019. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. Front. Plant Sci. 10, 655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655>.

26. Singh, P., Cameotra, S.S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trend. Biotechnol. 22(3), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>.

27. Stacey, S.P., McLaughlin, M.J., Çakmak, I., Hettiarachchi, G.M., Scheckel, K.G., Karkkainen, M., 2008. Root uptake of lipophilic zinc–rhamnolipid complexes. J. Agric. Food. Chem. 56(6), 2112–2117. <https://doi.org/10.1021/jf0729311>.

28. Varnier, A.L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A.N.G.E.L.A., Rabenoelina, F., Dorey, S., 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. Plant Cell. Environ. 32(2), 178–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x>.

29. Viramontes-Ramos, S., Portillo-Ruiz, M.C., Ballinas-Casarrubias, M.D.L., Torres-Muñoz, J.V., Rivera-Chavira, B.E., Nevárez-Moorillón, G.V., 2010. Selection of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. Braz. J. Microbiol. 41, 668–675. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300017>.