

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Production of Bio-derived Humic Acid from Lignocellulosic Wastes Using *Trichoderma harzianum* and Evaluating its Structural and Antifungal Properties Effect on Wheat on Wheat Growth

Vasighi Meraji¹, H., Jalili², B. and Nazeri^{3*}, S.

1, 2 and 3. Graduate PhD and Associate Professor, Respectively, Department of Plant Production and Genetics, University of Bu-Ali-Sina, Hamedan, Iran.

*: Corresponding Author

Email: snazeri@basu.ac.ir

Received: 2025/11/12

Accepted: 2026/01/04

Introduction

Humic substances are essential organic components of soil that significantly influence nutrient availability, microbial activity, and soil aggregation. Conventional humic acids are mainly extracted from mineral sources such as leonardite, which are nonrenewable and environmentally limiting. Consequently, interest has grown in bio-derived humic substances produced from agricultural residues via microbial fermentation. Among microorganisms, *Trichoderma harzianum* is recognized for its lignocellulolytic and biocontrol capabilities, making it an ideal candidate for converting lignocellulosic wastes into biologically active humic-like substances. The present study was designed to produce bio-humic acid through solid-state fermentation of agricultural residues using *T. harzianum*, characterize its chemical and structural features, and evaluate its antifungal and growth-promoting effects on wheat under greenhouse conditions.

Materials and Methods

The fermentation was carried out in a 500-liter polyethylene solid-state bioreactor equipped with a centrifugal blower for aeration and sensors for temperature and oxygen monitoring. The lignocellulosic substrate consisted of chopped wheat straw (40–50 mm) adjusted to 60% moisture. Pasteurization was performed using steam at 80 °C for 60–90 minutes to minimize microbial contamination. The substrate was supplemented with 1% molasses (Brix 60) to provide easily available carbon. The fungal inoculum, identified as *T. harzianum* based on β -tubulin gene sequencing (accession no. PV176108), was introduced, and the fermentation proceeded at 28–30 °C for 8–10 days. After completion, humic substances were extracted using 4% potassium hydroxide, followed by multistage filtration and centrifugation. The filtrate was sterilized for further analysis. Structural and chemical characterization involved Fourier transform infrared spectroscopy, ultraviolet–visible spectrophotometry, field emission scanning electron microscopy, gas chromatography–mass spectrometry, and liquid chromatography–mass spectrometry. The antifungal effect of the bio-humic extract was tested against *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani* using the well diffusion method, while the plant growth response was evaluated in a greenhouse pot experiment under artificial infection with *Fusarium*. Enzymatic activity was determined on carboxymethyl cellulose agar to verify cellulase production by *T. harzianum*.

Results

The FTIR spectrum of the bio-humic acid exhibited characteristic absorption bands at approximately 3400 cm⁻¹ (O–H stretching), 1720 cm⁻¹ (C=O stretching of carboxylic and carbonyl groups), and 1100–600 cm⁻¹ (C–O and C–H bending). The higher intensity of the carbonyl band relative to the commercial humic acid indicated greater abundance of oxygen-containing functional groups and a more reactive molecular structure. UV–Vis analysis showed a higher E4/E6 ratio, suggesting lower aromaticity and higher biological reactivity. FE-SEM micrographs obtained at two magnifications revealed a layered, porous morphology with cellulose nanocrystals between 30 and 100 nm. The nanostructure reflected partial enzymatic degradation of lignocellulosic fibers during fermentation, increasing surface area and adsorption capacity. Such morphology implies enhanced ion exchange and improved water-holding potential in soil. Chromatographic analyses confirmed the presence of aromatic esters, phenolic compounds, and organic acids derived from fungal metabolism. The methanolic extract contained *Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester*, while the ethyl acetate extract predominantly contained *1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester*. These compounds suggested partial esterification reactions that increased structural stability of the humic matrix. LC–MS analysis identified a molecular ion at $m/z = 351.27$ corresponding to Viridin, a well-known antifungal metabolite from *T. harzianum*. The well diffusion assay demonstrated inhibition zones of 2.3 ± 0.10 mm for *F. graminearum* and 1.30 ± 0.19 mm for *R. solani* in response to the 1% bio-humic extract, confirming antifungal potential. No inhibition was observed in the control. In the greenhouse experiment, wheat grown in infected soil without fertilizer had only 71% germination, whereas bio-humic treatment restored germination to 100%, comparable to healthy control plants. Mean shoot length (31.2 ± 1.4 cm) and dry weight (2.35 ± 0.15 g) in the bio-humic treatment were not significantly different from those in uninfected controls, while plants treated with commercial humic acid showed intermediate growth responses.

Discussion

The structural features observed in FTIR and UV–Vis analyses suggest that the biological fermentation pathway generated humic substances with higher oxygenated functionality and reduced aromatic condensation compared with mineral-derived humic acids. The porous nanostructure visible in FE-SEM images is characteristic of biologically formed humic matter and supports improved ion exchange, water retention, and microbial colonization in soil. The presence of esterified and phenolic derivatives detected by GC–MS indicates biochemical modification of lignin intermediates during fermentation, while the detection of Viridin reveals integration of antifungal metabolites into the humic matrix. The bio-humic product thus acts as a multifunctional material, combining physicochemical soil amendment properties with biological control potential. The fungal secondary metabolites contribute to suppression of soilborne pathogens, whereas the oxygen-rich humic structure enhances nutrient availability and promotes root development. The positive greenhouse results demonstrate that bio-humic application mitigates disease stress and maintains plant vigor without chemical fungicides. The combination of humification and biocontrol mechanisms in a single process reflects an emerging approach to biofertilizer development. By coupling organic matter recycling with microbial metabolism, this method provides a route to renewable, environmentally friendly soil conditioners that replace costly and ecologically burdensome mineral humic acids.

Conclusion

This study demonstrated that *Trichoderma harzianum* can effectively transform lignocellulosic wastes into a bio-humic acid with reactive functional groups, nanostructured morphology, and antifungal bioactivity. The product inhibited major soilborne pathogens and enhanced wheat growth under infected conditions, functioning simultaneously as a soil conditioner and a biocontrol agent. The integration of structural stability, biological activity, and sustainability makes bio-humic production via fungal fermentation a promising strategy for advancing environmentally compatible agriculture.

Acknowledgements

This research was conducted at the Agricultural Biotechnology Laboratory, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, with financial support from Mazo Gene Razak Kala Company.

Keywords: Humification, Nanocrystalline structure, Solid-state fermentation, Viridin, Waste valorization

Citations: Vasighi Meraji, H., Jalili, B. and Nazeri, S. (2026). Production of Bio-derived Humic Acid from Lignocellulosic Wastes Using *Trichoderma harzianum* and Evaluating its Structural and Antifungal Properties Effect on Wheat on Wheat Growth, *Plant Production Technology*, 25(2), 141-156.

<https://doi.org/10.22084/ppt.2026.31908.2173>

© 2022 The Author(s). Bu-Ali Sina University Publication. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Online ISSN: 2476-5651

Print ISSN: 2476-6321

تولید اسید هیومیک زیستی از ضایعات لیگنوسلولزی با استفاده از قارچ *تریکودرما هارزیانوم* و

ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و اثر ضدقارچی آن بر رشد گندم

Production of Bio-derived Humic Acid from Lignocellulosic Wastes Using *Trichoderma harzianum* and Evaluating its Structural and Antifungal Properties effect on Wheat on Wheat Growth

حسین وثیقی معراجی^۱، بنیامین جلیلی^۲ و سنبل ناظری^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۴

(مقاله پژوهشی)

چکیده

هیومیک‌اسید از مواد آلی خاک بوده و افزون بر تأثیر بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، در رشد و تحمل گیاه در برابر تنش‌ها مؤثرند. با وجود استفاده از منابعی مانند لئوناردیت برای استخراج، شناسایی منابع جایگزین و کم‌هزینه می‌تواند به تولید بیشتر کمک کند. در سال‌های اخیر روش‌های زیستی، به‌ویژه به‌کارگیری قارچ *تریکودرما* با توان تولید آنزیم‌هایی نظیر سلولاز، زایلاناز و بتا-گلوکوزیداز مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، تولید هیومیک‌اسید زیستی از ضایعات لیگنوسلولزی با استفاده از *تریکودرما هارزیانوم*^۲ در سامانه‌ی تخمیر حالت جامد با هدف ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی، ساختاری و زیستی و مقایسه با هیومیک‌اسید معدنی (تجاری) انجام شد. نتایج طیف‌سنجی فروسرخ و فرابنفش-مرئی نشان داد گروه‌های کربونیل و هیدروکسیل و نسبت جذب در طول موج‌های ۶۶۵ و ۴۶۵ نانومتر در نمونه زیستی نسبت به هیومیک‌اسید معدنی بیشتر است که بیانگر ساختار کمتر آروماتیک و واکنش‌پذیری بالاتر آن است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان‌گسیل ساختار لایه‌ای و متخلخل همراه با ذرات نانوکریستالی سلولز (۳۰-۱۰۰ نانومتر) را نشان داد. کروماتوگرافی گازی و مایع وجود استرهای آروماتیک، اسیدهای آلی و متابولیت ویریدین را تأیید کرد. عصاره‌ی هیومیک زیستی رشد قارچ‌های *فوزاریوم گرامینیوروم*^۳ و *رایزوکتونیا سولانی*^۴ را مهار و شاخص‌های رشد گندم را در خاک آلوده بهبود داد. فعالیت آنزیمی قارچ در تخریب مواد لیگنوسلولزی و تشکیل گروه‌های عملکردی مؤثر بود. نتایج نشان می‌دهد هیومیک‌اسید زیستی حاصل از *تریکودرما هارزیانوم* فرآورده‌ای واکنش‌پذیر و زیست‌فعال است و می‌تواند جایگزینی زیست‌سازگار برای هیومیک‌اسیدهای معدنی در کشاورزی پایدار باشد.

واژه‌های کلیدی: ارزش‌گذاری زیباله، تخمیر حالت جامد، ساختار نانوکریستالی، ویریدین، هیومیک شدن

ارجاع به مقاله: وثیقی معراجی، ح.، جلیلی، ب. و ناظری، س. (۱۴۰۴). تولید اسید هیومیک زیستی از ضایعات لیگنوسلولزی با استفاده از قارچ *تریکودرما هارزیانوم* و ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و اثر ضدقارچی آن بر رشد گندم، *مجله فناوری تولیدات گیاهی*، ۲۵(۲)، ۱۴۱-۱۵۶.

[https://doi.org/10.22084/ppt.2026.31908.2173/](https://doi.org/10.22084/ppt.2026.31908.2173)

حقوق نشر متعلق به نویسنده (گان) است و نویسنده تحت مجوز Commons Creative License

Attribution (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) به مجله اجازه می‌دهد مقاله‌ی چاپ شده

را در سامانه به اشتراک بگذارد، منوط بر اینکه حقوق مؤلف اثر حفظ و به انتشار اولیه مقاله در این مجله اشاره شود.



شاپا چاپی: ۶۳۲۱-۲۴۷۶

شاپا الکترونیکی: ۵۶۵۱-۲۴۷۶

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانش‌آموخته‌گان دکتری و دانشیار، گروه تولید و زنتیک گیاهی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول Email: snazeri@basu.ac.ir

2. *Trichoderma harzianum*

3. *Fusarium graminearum*

4. *Rhizoctonia solani*

۱. مقدمه

اسیدهای هیومیک از اجزای اصلی مواد آلی خاک هستند و در تعدیل ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک نقش مهمی ایفا می‌کنند. این ترکیبات از طریق افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، بهبود پایداری خاک‌دانه‌ها و تنظیم دسترسی عناصر غذایی در حاصل‌خیزی خاک مؤثرند (Ampong et al., 2022). افزایش بر این، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که اسیدهای هیومیک به‌عنوان ترکیبات شبه‌هورمونی می‌توانند بر رشد گیاه، گسترش سیستم ریشه و تحمل تنش‌های غیرزیستی اثرگذار باشند (de Souza et al., 2025).

منابع متداول استخراج هیومیک‌اسید عموماً لئوناردیت، لیگنیت و پیت هستند. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که این مواد اصلی‌ترین منبع تولید هیومیک‌اسید معدنی بوده و فرآیند استخراج آن‌ها محدودیت‌های اقتصادی و زیست‌محیطی دارد (Sarlaki et al., 2024)؛ این چالش‌ها موجب شده است که روش‌های زیستی و منابع جایگزین مورد توجه قرار گیرد. در این چارچوب، بهره‌گیری از پسماندهای کشاورزی و صنعتی به‌عنوان مواد اولیه تولید هیومیک‌اسید زیستی، رویکردی مبتنی بر اقتصاد بازیافت تلقی می‌شود (Hu et al., 2022). این پسماندها معمولاً غنی از ترکیبات لیگنوسلولزی مانند سلولز، همی سلولز و لیگنین هستند که می‌توانند در فرآیندهای زیستی به پیش‌سازهای مواد هیومیکی تبدیل شوند (Hu et al., 2022). کاربرد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده لیگنوسلولز در مقایسه با روش‌های شیمیایی، مزایایی از جمله مصرف انرژی کمتر، عدم نیاز به مواد قلیایی یا اکسیدکننده و سازگاری بیشتر با محیط‌زیست دارد (Hu et al., 2022). در میان این میکروارگانیسم‌ها، گونه‌های قارچ تریکودرما به‌دلیل توانایی تولید آنزیم‌هایی نظیر سلولاز، زایلاناز و بتا-گلوکوزیداز در تخریب مواد سلولزی و تسهیل فرآیند هومیکی شدن^۱ مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bulgari et al., 2023). افزون بر این، فعالیت هم‌زمان تریکودرما هارزیانوم و قارچ‌هایی مانند فانروکات کریسوسپوریوم^۲ تجزیه لیگنین و تشکیل مواد شبه‌هیومیکی در محیط‌های آلی را افزایش داده است (Zhai et al., 2025). گونه‌های تریکودرما علاوه بر مشارکت در تجزیه

زیستی، به‌عنوان عوامل کنترل زیستی نیز شناخته می‌شوند. این قارچ‌ها مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضدقارچی تولید می‌کنند که از جمله آن‌ها ترکیب فورانوستروئیدی ویریدین^۳ است؛ ماده‌ای که خاصیت مهار رشد بیمارگرهای خاک‌زاد متعددی را نشان داده است (Guzmán-Guzmán et al., 2023). هم‌زمانی تولید این ترکیبات زیست‌فعال با تشکیل اسیدهای هیومیک، از دیدگاه کاربردی می‌تواند به بهبود کیفیت عملکرد فرآورده‌های هیومیکی منجر شود (Guzmán-Guzmán et al., 2023).

در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران، ویژگی‌هایی چون کاهش ماده آلی خاک، شوری و وابستگی بالا به نهاده‌های شیمیایی از عوامل محدودکننده پایداری تولید کشاورزی محسوب می‌شوند (Stavi et al., 2021). استفاده از پسماندهای کشاورزی در ترکیب با میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده مانند تریکودرما هارزیانوم، رویکردی سازگار با اصول کشاورزی زیستی برای بهبود کیفیت خاک و کاهش وابستگی به منابع معدنی هیومیک محسوب می‌شود (Mbarki et al., 2017).

با وجود مطالعات متعدد در زمینه تولید اسیدهای هیومیک و فعالیت‌های زیستی تریکودرما، پژوهش‌های اندکی هر دو جنبه تولید اسیدهای هیومیک و اثرات ضدقارچی به‌طور هم‌زمان در یک سامانه زیستی ارزیابی کرده‌اند. در مطالعه حاضر، از یک سامانه پلی‌اتیلنی برای تخمیر زیستی مواد لیگنوسلولزی با جدایه‌ی تریکودرما هارزیانوم برای ارزیابی تولید هیومیک‌اسید زیستی استفاده شد. مشخصه‌های ساختاری و شیمیایی محصول با روش‌های تبدیل فوریه فروسرخ^۴، طیف سنجی مرئی-فرابنفش^۵، میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی^۶، کروماتوگرافی گازی^۷ و مایع^۸ تحلیل شد و فعالیت‌های زیستی شامل اثرات ضدقارچی و کمک‌کننده به رشد گندم نیز مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش،

3. Viridin

4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

5. Ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis)

6. Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)

7. Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)

8. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

1. Humification

2. *phanerochaete chrysosporium*

۲-۲. مواد اولیه و آماده سازی بستر

از کاه گندم به عنوان بستر لیگنوسلولزی استفاده شد؛ ماده‌ای که به دلیل دارا بودن ساختار لیگنینی همراه با مقادیر اندکی ازت آلی، بستر مناسبی برای تخمیر حالت جامد و رشد قارچ‌های تجزیه کننده لیگنین به شمار می‌رود (Sadh et al., 2018). به منظور بهبود نفوذپذیری هوا و افزایش سطح تماس میکروارگانسیم با بستر، از کاه خردشده با اندازه ذرات ۵۰-۴۰ میلی‌متر استفاده شد (Singhania et al., 2009). رطوبت بستر به حدود ۶۰ درصد رسانده شد. برای کاهش بار میکروبی مزاحم، بستر با استفاده از بخار تا ۸۰ درجه سلسیوس پاستوریزه و مدت ۹۰-۶۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد (Soccol et al., 2003).

۲-۳. طراحی راکتور و شرایط کشت

تخمیر حالت جامد در یک راکتور پلی اتیلنی ۵۰۰ لیتری به صورت بستر ثابت انجام شد (شکل ۱). هوادهی توسط فن سانتریفیوژ و فیلتر هوا تأمین شد. الگوی هوادهی به صورت دوره‌ای و بر اساس شدت فعالیت زیستی اعمال گردید؛ این روش در مدیریت دما در فرماتوره‌های تحت کشت جامد^۳ رایج است (Mitchell et al., 2000). میزان pH اولیه بستر با اسید سولفوریک رقیق روی ۶/۰ تنظیم شد. همراه با مایع تلقیح، حدود یک درصد ملاس با بریکس ۶۰ نیز افزوده شد تا به عنوان منبع کربن در دسترس، رشد اولیه‌ی قارچ را تسهیل کند (Soccol et al., 2003). کشت در ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس به مدت هشت تا ۱۰ روز انجام گرفت.

۲-۴. فرآیند تولید و استخراج هیومیک اسید زیستی

پس از اتمام دوره کشت (۱۴ روز)، ترکیبات هیومیکی با روش‌های شیمیایی و مکانیکی استخراج شد. پس از اضافه کردن محلول پتاسیم هیدروکسید چهار درصد وزنی، فاز مایع با فیلتر کردن چندمرحله‌ای و سانتریفیوژ جدا گردید. مایع به دست آمده به عنوان کود هیومیک زیستی جمع‌آوری و برای آزمون‌های زیستی، فیلتر و استریل شد (Cheng et al., 2019).

ارزیابی کارایی سامانه تخمیری در دستیابی به بازدهی بالاتر از مقادیر معمول گزارش شده برای سامانه‌های زیستی لیگنوسلولزی و بررسی حضور هم‌زمان ترکیبات زیست‌فعال در فرآورده هیومیکی است.

۲. مواد و روش

۲-۱. ایزوله قارچی و شناسایی

ایزوله قارچی مورد استفاده، تریکودرما هارزیانوم، از گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشکاه بوعلی سینا تهیه شد. انتخاب این گونه به دلیل توانایی شناخته شده آن در تجزیه مواد لیگنوسلولزی و تولید متابولیت‌های زیستی، در گذشته بود (Druzhinina et al., 2011). شناسایی ریخت‌شناسی با بررسی ویژگی‌های کلنی و میکروسکوپی انجام شد (Gams et al., 1998). برای شناسایی مولکولی، از کشت هفت روزه قارچ تریکودرما DNA ژنومی استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی و تأیید گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱ شامل ۲۵ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در ترموسایکلر بیورد تی ۱۰۰ با برنامه مطابق جدول ۱ انجام گرفت. برای شناسایی میکروارگانسیم‌های هدف، باید از نشانگرهای ژنتیکی خاص برای ساخت مجموعه‌ای از توالی‌ها و مشخص کردن ویژگی‌های منحصر به فردی که با ویژگی‌های سایر گونه‌های نزدیک همپوشانی ندارند، استفاده شود. یکی از این نشانگرها، ژن بتا-توبولین است که پروتئین ساختاری توبولین، یکی از اجزای میکروتوبول‌ها را کدگذاری می‌کند (Ezeonuegbu et al., 2022). قطعه ژن بتا-توبولین^۲ با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و توالی‌یابی توسط شرکت ژن فناوران انجام شد؛ توالی در پایگاه داده NCBI ثبت گردید (شماره دستیابی: PV176108). توالی آغازگرها با توجه به پژوهش‌های قبلی (Hubka et al., 2012) به صورت پیشرو (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') و پسرو (3'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-5') طراحی شد.

1. The polymerase chain reaction (PCR)

2. B-tubulin

3. Solid-state fermentation (SSF)

Table 1: Thermocycler settings

Reaction step	Temperature (°C)	Time (s)
Initial denaturation	95	300
Denaturation	95	60
Annealing	58	45
Extension	72	40
Final extension	72	420

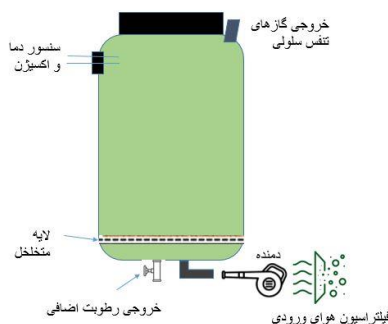


Fig.1: Schematic representation of the polyethylene solid-state fermentation (SSF) bioreactor. Aeration was supplied through an air blower equipped with a filter, while excess moisture was discharged from the bottom outlet. Temperature and oxygen sensors were installed for process monitoring, and the upper vent allowed the release of gases generated during microbial respiration

۲-۵. روش‌های تجزیه

۲-۵-۱. تبدیل فوریه فروسرخ: نمونه کود زیستی تخلیص شده در آون با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت هشت ساعت خشک و به صورت پودر با پتاسیم بروماید مخلوط شد. طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ با دستگاه PerkinElmer انجام شد (Zhang et al., 2021). از نمونه هیومیک معدنی پودری به عنوان شاهد استفاده شد.

۲-۵-۲. طیف سنجی مرئی-فرا بنفش: نسبت جذب در طول موج‌های ۴۶۵ و ۶۶۵ نانومتر (شاخص E4/E6) با استفاده از طیف‌سنجی، برای ارزیابی درجه‌ی آروماتیسیته و میزان پلیمریزاسیون مواد هیومیکی در مقایسه با هیومیک‌اسید معدنی اندازه‌گیری شد (Chen et al., 1977).

۲-۵-۳. عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی: عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از پودر خشک‌شده در آون توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل

میدانی به منظور بررسی ریخت‌شناسی میکرو و نانوکریستال‌های سلولزی تهیه گردید (Rani et al., 2024).

۲-۵-۳. تجزیه‌های کروماتوگرافی گازی و مایع: عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی (با نسبت یک به ۱۰، حلال به پودر هیومیک زیستی) از پودر خشک‌شده استخراج و با دستگاه کروماتوگرافی گاز-طیف‌سنجی جرمی مورد تجزیه قرار گرفتند (Piccolo et al., 2003). همچنین، نمونه‌ی کود هیومیک مایع پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و فیلتراسیون با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون، برای انجام تجزیه کروماتوگرافی مایع به شرکت دی‌پرتونگار (تهران) ارسال شد.

۲-۵-۴. آزمون ضدقارچی (روش انتشار چاهک): به منظور ارزیابی خاصیت ضدقارچی عصاره‌ی هیومیک زیستی، از روش انتشار چاهک در محیط کشت PDA¹ علیه قارچ‌های فوزاریوم گرامینیوروم و رایزوکتونیا سلوانی استفاده شد

1. Potato dextrose agar (PDA)

سدیم-کربوکسی متیل سلولز^۳ (۱۰ گرم در لیتر)، مونوپتاسیم فسفات (یک گرم در لیتر)، سولفات منیزیم هفت آب (۰/۵ گرم در لیتر)، کلراید سدیم (۰/۵ گرم در لیتر) و آگار (۱۵ گرم در لیتر) بود. پیش از اتوکلاو، pH محیط کشت روی عدد ۷/۰ تنظیم گردید. پلیت‌ها در دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس به مدت سه تا پنج روز انکوبه شدند. پس از رشد قارچ، پلیت‌ها با محلول ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) رنگ قرمز کنگو^۴ به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با محلول کلراید سدیم یک مولار به مدت ۱۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند. ظهور هاله‌ی شفاف در اطراف قارچ تریکودرما بیانگر فعالیت سلولازی بود (Teather et al., 1982).

۲-۵-۸. تحلیل آماری: طرح آزمایش‌ها اجرا شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ تحلیل شدند. تجزیه واریانس (ANOVA) یک‌طرفه انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد صورت گرفت.

۳. نتایج

۳-۱. نتایج شیمیایی و ساختاری

۳-۱-۱. تبدیل فوریه فروسرخ: طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ نشان داد که هیومیک‌اسید زیستی تولیدشده دارای باندهای جذبی شاخص در محدوده‌ی ۳۴۰۰-۳۰۰۰ برسانتی‌متر (ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل و پیوندهای هیدروژنی)، ۱۷۲۰-۱۶۵۰ برسانتی‌متر (ارتعاش کششی گروه‌های کربونیل و کربوکسیلات)، و ۱۱۰۰-۶۰۰ برسانتی‌متر (ارتعاشات خمشی پیوندهای کربن-اکسیژن و کربن-هیدروژن) بود (شکل ۲). شدت پیک مربوط به گروه‌های کربونیل در محدوده‌ی ۱۷۲۰ برسانتی‌متر در نمونه‌ی زیستی تقریباً ۱/۵ برابر نمونه‌ی معدنی بود ($p < 0.05$) که نشان‌دهنده‌ی غنای بیشتر گروه‌های کربوکسیلیک و استری در فرآورده‌ی زیستی است (Rani et al., 2024). این نتایج با یافته‌های (Rani et al., 2024) در مورد کودهای هیومیکی مشتق از کمپوست هم‌خوانی دارد، با این تفاوت که شدت باند در نمونه‌ی حاضر قوی‌تر مشاهده شد.

(Balouiri et al., 2016). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی^۱ و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. در هر ظرف آزمایش، چاهک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر به صورت استریل در محیط کشت ایجاد گردید. سپس در هر چاهک، ۴۰ میکرولیتر از عصاره‌ی فیلترشده‌ی هیومیک زیستی با غلظت یک درصد (وزنی/حجمی) تزریق شد. برای هر قارچ، دیسکی به قطر پنج میلی‌متر از کشت پنج‌روزه‌ی آن، در مقابل چاهک و در فاصله‌ی ۱۰ میلی‌متری از دیواره‌ی ظرف آزمایش قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پایان دوره‌ی نگهداری، قطر هاله‌ی بازدارندگی رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری گردید.

۲-۵-۵. آزمون گلدانی: برای ایجاد آلودگی، خاک گلدان‌ها با نسبت ۱۵ گرم بذر آلوده به فوزاریوم در هر کیلوگرم خاک مخلوط شد. در هر گلدان ۱۰ بذر گندم کاشته شد (در مجموع ۱۲ گلدان). این آزمایش با چهار تیمار و سه تکرار شامل: آبیاری با محلول یک درصد کود هیومیک‌اسید زیستی در دو نوبت (روز صفر و روز دوازدهم)، انجام شد. تیمار دوم شامل: آبیاری در دو نوبت با غلظت یک درصد هیومیک‌اسید معدنی، تیمار سوم شامل بذور کاشته شده در خاک آلوده بدون استفاده از کود و تیمار شاهد بدون استفاده از کود زیستی و بدون آلودگی قارچی، در نظر گرفته شد. شرایط گلخانه شامل دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۰ درصد بود. درصد جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد رویشی ثبت شدند (Rathor et al., 2024).

۲-۵-۶. تجزیه شیمیایی کود زیستی: تجزیه توسط شرکت سامانه پایش بهار واقع در شهرستان ساوه انجام شد. درصد هیومیک‌اسید به روش گراوی‌متری تعیین گردید (Klavins et al., 2013). نیتروژن، فسفر و پتاسیم کل به روش‌های استاندارد خاک و کود اندازه‌گیری شد.

۲-۵-۷. بررسی فعالیت آنزیمی: به منظور بررسی توان تولید آنزیم سلولاز، ایزوله‌ی قارچی بر روی محیط آگار حاوی کربوکسی متیل سلولز^۲ کشت داده شد. ترکیب محیط شامل:

3. Sodium-Carboxymethylcellulose (CMC)
4. Congo red

1. Completely Randomized Design (CRD)
2. Carboxymethylcellulose (CMC)

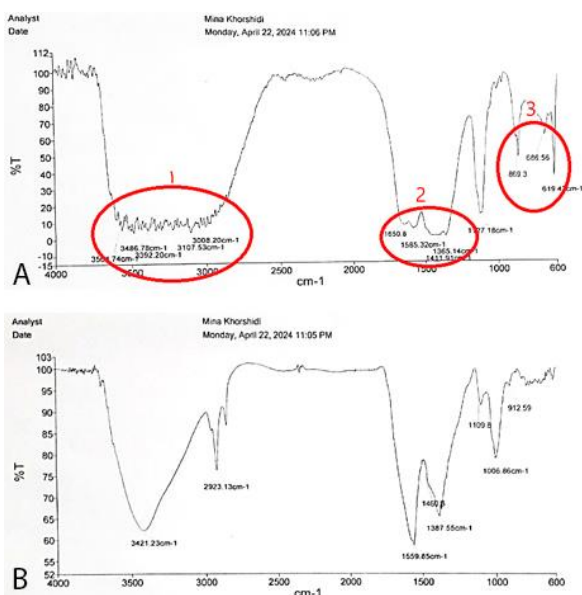


Fig. 2: FTIR spectra of (A) bio-derived humic acid and (B) commercial humic acid. Major absorption bands at approximately 3400, 1720, and 1100 cm^{-1} correspond to hydroxyl, carbonyl, and C–O/C–H functional groups, respectively. The higher intensity of the carbonyl band in the bio-derived sample indicates a greater abundance of oxygen-containing functional groups and a more reactive molecular structure

هیومیک زیستی در قطر ۱۰۰-۳۰ نانومتر (شکل ۳-۱)، و ساختارهایی در اندازه نانو و میکرو (شکل ۳-۲) را نشان دادند. این ساختار متخلخل در مقایسه با سطح یکنواخت تر هیومیک معدنی، به طور بالقوه سطح تماس بیشتری برای تعامل با ریزوسفر گیاه فراهم می کند (Meryemoglu *et al.*, 2022; Motta *et al.*, 2013).

۳-۱-۴. کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی: کروماتوگرافی گازی عصاره متانولی و اتیل استاتی ترکیبات غالب شامل فنولها، اسیدهای آلی کوچک و استرهای آروماتیک، مانند او۴-بنزن دی کربوکسیلیک اسید و بنزن پروپانوئیک اسید، را آشکار کرد (شکل های ۴ و ۵). حضور این ترکیبات نشان می دهد که فرآیند تخمیری علاوه بر تولید گروه های هیومیکی، مسیر تولید متابولیت های ساده تر را نیز فعال کرده است (Spaccini *et al.*, 2024).

۳-۱-۲. طیف سنجی مرئی-فرابنفش: طیف سنجی مرئی-فرابنفش در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان داد که نسبت های جذب نوری E4/E6 برای هیومیک اسید معدنی در محدوده ۳/۲ تا ۳/۴ و برای هیومیک اسید زیستی حدود ۴/۷ است. این اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) بیانگر آروماتیسیتی کمتر و ساختار احیایی تر در نمونه ی زیستی است (Chen *et al.*, 2002, Fuentes *et al.*, 2006). نسبت جذب نوری بالاتر E4/E6 معمولاً با فعالیت زیستی بیشتر در خاک مرتبط است (Canellas *et al.*, 2014). براساس گزارش های پیشین، کودهای هیومیکی معدنی بسته به منبع (مانند لئوناردیت یا کمپوست) معمولاً نسبت هایی بین سه تا پنج نشان داده اند (Stevenson, 1994).

۳-۱-۳. میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی: تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی نیز در مقیاس میکرو و نانو ساختار ورقه ای و حضور ذرات نانوکریستالی سلولز را در

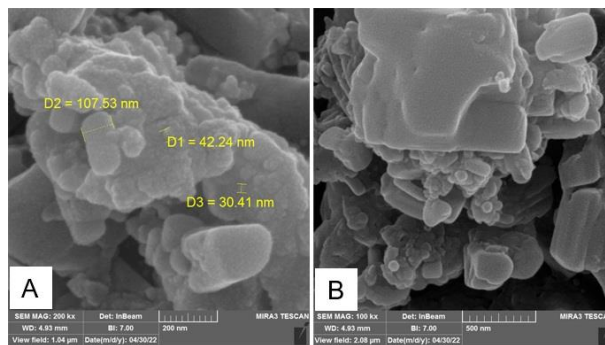


Fig. 3: FE-SEM images of bio-derived humic acid. A) a layered morphology and the presence of cellulose nanocrystals (approximately 30–100 nm in size) are observed. B) aggregated nano- and micro-scale structures. The porous and heterogeneous morphology of the bio-humic sample indicates a higher surface area and potentially greater activity in the rhizosphere

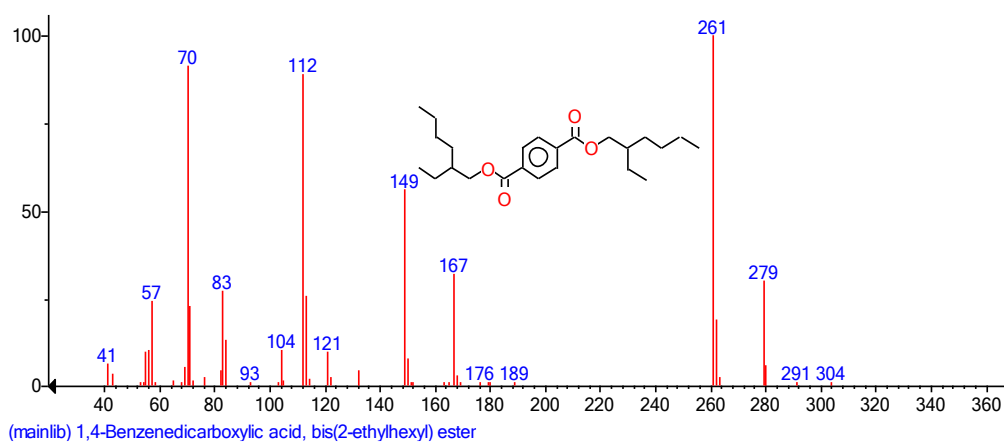


Fig. 4: GC-MS chromatogram of the ethyl acetate extract of bio-derived humic acid. The dominant compound identified was 1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester, an aromatic ester of biogenic origin. The occurrence of such esters suggests that the biological fermentation process promoted the esterification of organic intermediates, enhancing the structural stability of the resulting humic matrix

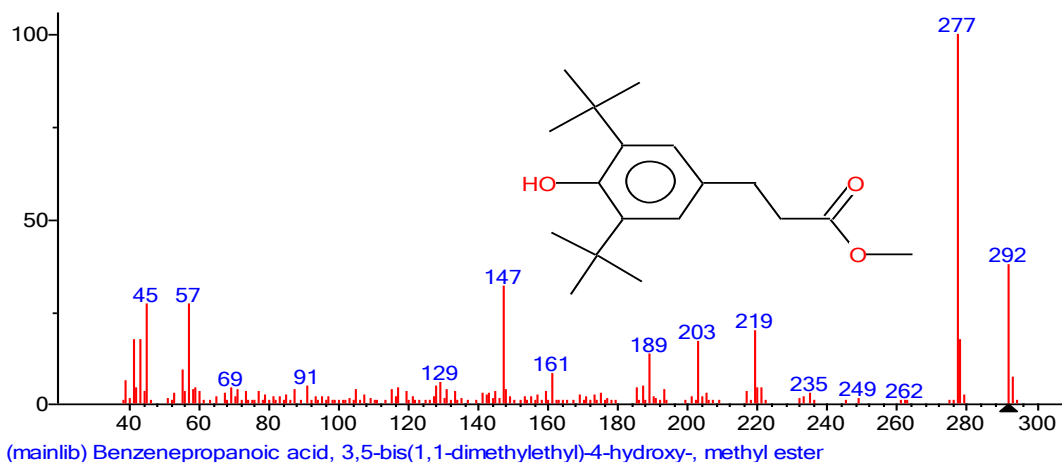


Fig. 5: GC-MS chromatogram of the methanolic extract of bio-derived humic acid. The major identified compound was Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester, a methylated phenolic derivative with antioxidant and bioactive properties. The presence of this compound indicates an active fermentation pathway leading to the production of aromatic biogenic derivatives

وثیقی معراجی و همکاران: تولید اسید هیومیک زیستی از ضایعات...

ضدقارچی ویریدین با پیک m/z ۳۵۱/۲ در این بررسی شناسایی شد (Zhang et al., 2025) (شکل ۶).

۱-۳-۵. کروماتوگرافی مایع: تجزیه کروماتوگرافی مایع وجود متابولیت‌های ثانویه زیستی را تأیید کرد. از میان آن‌ها، ترکیب

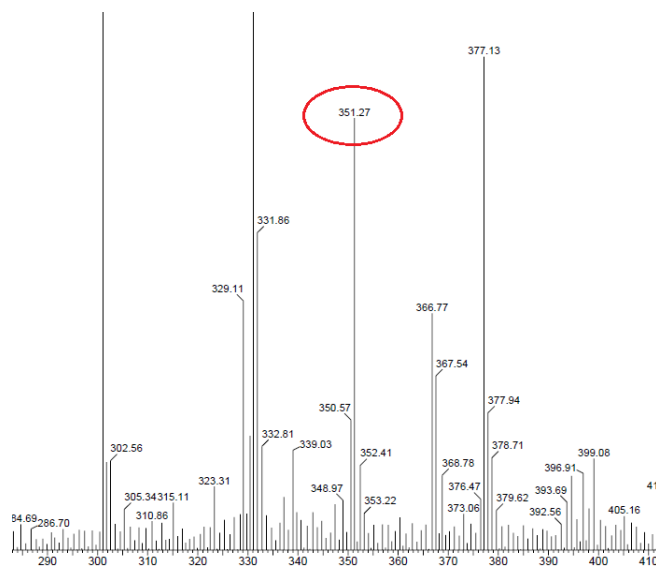


Fig. 6: LC-MS mass spectrum of the bio-derived humic fertilizer. The predominant peak at $m/z = 351.27$ corresponds to the molecular ion of Viridin

را تأیید کرد (Bischof et al., 2016). در گزارش‌های قبلی سویه‌های مختلف تریکودرما، با تولید آنزیم‌های سلولازی و تجزیه سلولز، هاله هیدرولیزی در محدوده پنج تا ۱۵ میلی‌متر ایجاد کردند. این نتایج نشان می‌دهد فعالیت آنزیم سلولازی یا میزان آنزیم آزاد شده در محیط، بسته به سویه تریکودرما تفاوت دارد (Florencio et al., 2016).

۱-۳-۶. فعالیت آنزیمی ایزوله قارچی: برای تأیید فعالیت آنزیم سلولاز، ایزوله‌ی تریکودرما هارزیانوم بر روی محیط کشت پایه حاوی یک درصد کربوکسی‌متیل سلولز مورد بررسی قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی با رنگ قرمز کنگو، هاله شفاف مشخصی در اطراف کشت قارچ مشاهده شدند (شکل ۷). میانگین قطر هاله $1/5 \pm 5/7$ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این نتیجه توانایی ایزوله‌ی قارچی در تولید و ترشح آنزیم سلولاز



Fig. 7: Cellulase activity of the isolated *Trichoderma harzianum* on carboxymethyl cellulose (CMC) agar medium after staining with Congo red. The clear halo surrounding the fungal colony indicates enzymatic degradation of cellulose in the growth medium

قارچ‌های بیماریزای فوزاریوم گرامینیوروم و رایزوکتونیا سلولانی انجام شد. پس از گذشت ۱۴ روز انکوباسیون، در اطراف چاهک‌های حاوی عصاره‌ی زیستی، هاله‌های

۲-۳. آزمون انتشار چاهک: آزمون انتشار چاهک به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدقارچی عصاره‌ی هیومیک زیستی (حاصل از فعالیت تریکودرما هارزیانوم)، در محیط کشت PDA علیه

داد که اثر تیمار عصاره‌ی هیومیک‌اسید زیستی بر هر دو قارچ در سطح احتمال یک درصد ($p > 0.01$) معنی‌دار بود. بازدارندگی قارچ‌های بیماری‌زا می‌تواند به دلیل هیومیک‌اسید و نیز سایر آنزیم‌ها و متابولیت‌ها با ویژگی ضد قارچی، باشد که در عصاره زیستی ایزوله‌ی قارچ تریکودرما وجود داشت (Stracquadanio et al., 2016).

بازدارندگی رشد مشاهده گردید (شکل ۸). میانگین قطر هاله‌ی بازدارندگی برای فوزاریوم گرامینیوروم برابر با 0.1 ± 2.3 میلی‌متر و برای رایزوکتونیا سولانی برابر با 0.19 ± 1.30 میلی‌متر بود. در تیمار شاهد (بدون عصاره‌ی زیستی) هیچ‌گونه هاله‌ای مشاهده نشد. تأثیر عصاره‌ی هیومیک زیستی بر بازدارندگی رشد فوزاریوم گرامینیوروم به‌طور معنی‌داری بیشتر از رایزوکتونیا سولانی گزارش شد. نتایج تجزیه واریانس نشان



Fig. 8: Well diffusion assay for evaluating the antifungal effect of 1% bio-humic extract against *Rhizoctonia solani*. Formation of inhibition halos around the wells indicates suppression of mycelial growth in the presence of the bio-derived extract

کود بود و میانگین طول ساقه ($1/4 \pm 2.31$ سانتی‌متر) و وزن خشک گیاه (0.15 ± 2.35) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد سالم نشان نداد ($p > 0.01$). در تیمار هیومیک‌اسید معدنی، درصد جوانه‌زنی بین ۹۰ تا ۹۵ درصد بود و میانگین طول ساقه ($1/7 \pm 5.27$ سانتی‌متر) و وزن خشک (0.12 ± 1.95 گرم) به‌ترتیب حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد کمتر از شاهد ثبت گردید (شکل ۹، جدول ۲). بر اساس این نتایج، کاربرد هیومیک زیستی موجب حفظ شاخص‌های رشدی در سطح مشابه با گیاهان سالم گردید، در حالی که هیومیک معدنی کاهش نسبی در رشد گیاه را نشان داد.

۳-۳. آزمون گلدانی: در شرایط گلخانه‌ای، اثر چهار تیمار شامل (۱) شاهد سالم بدون بیماری و بدون کود، (۲) تیمار اسید هیومیک زیستی (یک درصد) به‌همراه قارچ بیماری‌زا، (۳) تیمار هیومیک‌اسید معدنی (یک درصد) به‌همراه قارچ بیماری‌زا و (۴) شاهد به‌همراه بیماری بدون استفاده از کود بر روی رشد گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. در تیمار شاهد بیمار که شامل خاک آلوده به بیماری تحت آبیاری معمول بدون استفاده از کود قرار گرفتند درصد جوانه زنی به ۷۱ درصد تقلیل یافت. در تیمار هیومیک‌اسید زیستی، درصد جوانه‌زنی به ۱۰۰ درصد رسید که مشابه با شاهد بدون تیمار بیماری و

Table 2: Effect of different humic acid treatments on shoot length and dry weight of wheat plants infected under greenhouse conditions

Source of Variation	Degrees of Freedom	Mean Squares	
		Shoot Length	Dry Weight
Treatment	3	18.21**	0.28**
Error	8	0.24	0.007
Coefficient of Variation (CV%)		3.85	4.31

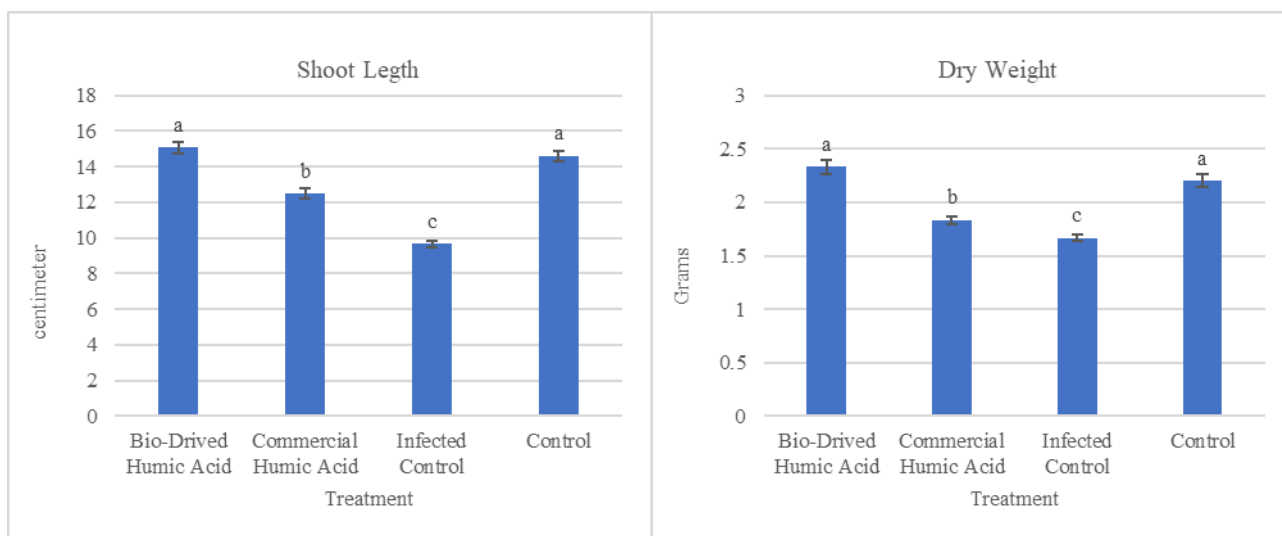


Fig. 9: Comparison of shoot dry weight and shoot length among four treatments: Bio-humic acid fertilizer; Commercial humic acid fertilizer; Control infected with *Fusarium* without fertilizer; Control without fertilizer or pathogen inoculation

علامت * و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد می باشند.

۴. بحث

بالا تر E4/E6 در طیف طیف سنجی مرئی - فرابنفش نمونه‌ی زیستی (۴/۷ در برابر ۳/۳ برای نمونه‌ی معدنی) مؤید ساختاری کمتر آروماتیک و وزن مولکولی پایین تر است (Fuentes *et al.*, 2018). این ویژگی‌ها از دیدگاه فیزیکوشیمیایی اهمیت دارند زیرا گروه‌های عاملی قطبی بیشتر و ساختار بازتر، ظرفیت بالاتری برای برهم‌کنش با کاتیون‌ها و مولکول‌های آلی فراهم می‌کنند و در نتیجه فعالیت اصلاحی و زیستی هیومیک را افزایش می‌دهند. مطالعات مشابه نیز گزارش کرده‌اند که هیومیک‌های منشأ زیستی معمولاً دارای قابلیت بالاتری در تبادل یونی، حلالیت، و تحریک رشد ریشه هستند (Canellas *et al.*, 2015, Nardi *et al.*, 2021). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مسیر تولید زیستی، از طریق افزایش گروه‌های عملکردی اکسیژنی، منجر به افزایش واکنش‌پذیری و نقش فعال‌تر هیومیک در محیط ریزوسفر می‌شود.

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی، ساختار لایه‌ای و متخلخل همراه با حضور ذرات نانوکریستالی سلولز با اندازه‌ی ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر مشاهده شد (Spaccini *et al.*, 2022). این الگوی سطحی بیانگر تخریب جزئی الیاف لیگنوسلولزی در طی فرایند تخمیر زیستی است که منجر به ایجاد منافذ ریز و افزایش نسبت سطح به حجم ذرات هیومیکی می‌شود. چنین ساختاری با افزایش ظرفیت جذب یونی، نگهداری آب، و برهم‌کنش با ترکیبات معدنی و آلی خاک مرتبط است (Spaccini *et al.*, 2022). افزون بر این، حضور

نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان داد که قارچ تریکودرما هارزیانوم با استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی، اسید هیومیک زیستی با ویژگی‌های شیمیایی، ساختاری و زیستی متمایز نسبت به هیومیک‌های معدنی تولید کرده است. تفسیر داده‌های طیفی و شیمیایی بیانگر آن است که این فرآیند زیستی، منجر به تولید ترکیبات هیومیکی با گروه‌های عاملی واکنش‌پذیرتر، ساختار متخلخل‌تر، و فعالیت زیستی بیشتر، در مقایسه با نمونه صنعتی آن می‌شوند. این یافته‌ها در چارچوب مفاهیم اخیر مرتبط با هومیکی شدن زیستی قرار می‌گیرد؛ مفهومی که در آن فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها جایگزین واکنش‌های شیمیایی پرمصرف انرژی در تجزیه‌ی لیگنین و تشکیل مواد هیومیکی می‌گردد (Saldarriaga-Hernández *et al.*, 2020; Bischof *et al.*, 2016).

طیف‌های تبدیل فوریه فروسرخ نشان دادند که در نمونه‌ی هیومیک زیستی، شدت باندهای مربوط به گروه‌های کربونیل و هیدروکسیل نسبت به هیومیک معدنی افزایش یافته است. این باندها که در محدوده‌ی ۳۴۰۰ و ۱۷۲۰ برسانتی‌متر مشاهده می‌شوند، نشانگر حضور گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل آزاد و افزایش محتوای ترکیبات قطبی در محصول هستند. چنین الگوی طیفی معمولاً به هیومیک‌های جوان‌تر و واکنش‌پذیرتر نسبت داده می‌شود (Fukushima *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2018). افزون بر این، نسبت جذب نوری

پلیمریزاسیون و افزایش گروه‌های قطبی، شرایط تشکیل هیومیک جوان‌تر را فراهم می‌کند. این مشاهدات هم‌راستا با افزایش شدت باند کربونیل در تبدیل فوریه فروسرخ و نسبت جذب نوری E4/E6 بالاتر در نمونه‌ی زیستی است که هر دو نشانه‌ی محتوای بیشتر گروه‌های کربوکسیلیک و ساختار بازتر هستند (Fuentes et al., 2018; Saldarriaga-Hernández et al., 2020). بنابراین، داده‌های ساختاری و آنزیمی یکدیگر را تأیید می‌کنند و نقش مستقیم قارچ را در جهت‌دهی به مسیرهای شیمیایی تشکیل هیومیک زیستی نشان می‌دهند.

نتایج آزمون انتشار چاهک بیانگر اثر بازدارندگی هیومیک زیستی در برابر فوزاریوم گرامینیوروم و رایزوکتونیا سلولانی بود. حضور ویریدین و ترکیبات فنولی در هیومیک زیستی می‌تواند عامل اصلی این بازدارندگی باشد. تفاوت حساسیت میان دو پاتوژن ممکن است به ترکیب دیواره‌ی سلولی آن‌ها مربوط باشد؛ دیواره‌ی نازک‌تر فوزاریوم گرامینیوروم باعث حساسیت بیشتر آن به ترکیبات فنولی می‌شود، درحالی‌که رایزوکتونیا سلولانی به دلیل وجود پلی‌ساکاریدهای مقاوم‌تر، به بازدارندگی کمتری پاسخ می‌دهد (Vinale et al., 2012). افزون بر اثر مستقیم ضدقارچی، این ترکیبات قادر هستند در سطح گیاه نیز از طریق القای مقاومت سیستمیک عمل کنند و موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز شوند (Shoresh et al., 2010). بدین ترتیب، هیومیک زیستی علاوه بر خاصیت اصلاحی خاک، یک سامانه‌ی کنترل زیستی چندجهتی محسوب می‌شود که هم در سطح میکروبی و هم در سطح گیاه اثرگذار است.

در آزمون گلدانی، تیمار هیومیک زیستی موجب حفظ کامل درصد جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد گندم در خاک آلوده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که فرآورده‌های تولید شده قادر هستند اثرات منفی تنش بیماری را خنثی کنند. افزایش رشد گیاه احتمالاً از طریق ترکیب چند سازوکار: بهبود تغذیه‌ی معدنی (از طریق کلات عناصر)، افزایش جذب ریشه‌ای (از طریق تحریک مسیرهای شبه‌آکسینی) و کاهش تنش اکسیداتیو (از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) عمل می‌کند (Canellas et al., 2015; Zandonadi et al., 2013). در این میان، گروه‌های کربوکسیلیک و فنولی آزاد در هیومیک زیستی نقشی دوگانه دارند: هم در تبادل یون‌ها مؤثر هستند و هم

خلل و فرج در مقیاس نانومتر می‌تواند ریززیستگاه مناسبی برای تجمع میکروارگانیزم‌های مفید در سطح مواد آلی فراهم کند و بدین ترتیب، فعالیت میکروبی و تبادل مواد در ریزوسفر را ارتقا دهد (Puglisi et al., 2013). در مجموع، مورفولوژی متخلخل و ناهمگن هیومیک زیستی نشان‌دهنده‌ی توان بالقوه‌ی بالاتر آن در بهبود خصوصیات فیزیکی و زیستی خاک است.

داده‌های کروماتوگرافی گازی و مایع وجود ترکیباتی از جمله استرها، اسیدهای آلی و مشتقات فنولی را در نمونه‌ی زیستی تأیید کردند که بیانگر ترکیبات متنوع تولید شده در تخریب زیستی لیگنین و همی‌سلولز هستند. شناسایی متابولیت ویریدین به‌عنوان یک ترکیب فورانوستروئیدی از منشأ قارچی، یکی از یافته‌های کلیدی این پژوهش است. این ترکیب پیش‌تر در گونه‌های تریکودرما هارزیانوم و تریکودرما ویرید^۱ گزارش شده و نقش مؤثری در مهار قارچ‌های بیماری‌زا از طریق تخریب غشای سلولی و مهار مسیرهای تنفسی دارد (Vinale et al., 2008; al., 2014). حضور آن در کنار سایر ترکیبات هیومیک زیستی نشان می‌دهد که مسیر تخمیر، تنها منجر به تولید ترکیبات آلی ساده نشده بلکه ترکیبات فعال با خاصیت کنترل زیستی قارچ‌های پاتوژن را نیز تولید کرده است. این یافته اهمیت فرآیند زیستی را دوچندان می‌کند، زیرا ترکیب حاصل علاوه بر خاصیت اصلاح‌کنندگی خاک، پتانسیل کنترل زیستی بیماری‌های قارچی را نیز دارد. افزون بر این، وجود ترکیبات فنولی و الکل‌های زنجیره‌کوتاه در محصول زیستی می‌تواند نقش مهمی در تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه ایفا کند و از طریق القای مقاومت عمومی^۲ مسیرهای هورمونی دفاعی را فعال نماید (Shoresh et al., 2010).

فعالیت آنزیمی قارچ تریکودرما هارزیانوم در محیط حاوی کربوکسی‌متیل‌سلولز، توان تحزیه سلولز بالای را نشان داد که در فرآیند هومیکی شدن نقش کلیدی دارد. سلولاز، لاکاز و لیگنین پراکسیداز سه گروه آنزیمی اصلی هستند که در تخریب لیگنوسلولز نقش دارند و با شکستن پلی‌ساکاریدها و اکسیداسیون ساختارهای آروماتیک، پیش‌سازهای مواد هیومیکی را تولید می‌کنند (Bischof et al., 2016; Martínez et al., 2005). مسیرهای آنزیمی با کاهش درجه‌ی

1. *Trichoderma viride*
2. Induced Systemic Resistance (ISR)

وثیقی معراجی و همکاران: تولید اسید هیومیک زیستی از ضایعات...

کربن و کاهش تخلیه‌ی مواد مغذی به محیط آبی کمک نماید (Lal, 2019).

۵. نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیومیک زیستی تولیدشده توسط تریکودرما هارزینانوم ترکیبی چندمنظوره است که ویژگی‌های شیمیایی اصلاح‌کننده، ساختار متخلخل فعال، ترکیبات زیست‌فعال ضدقارچی و اثرات محرک رشد را به‌طور هم‌زمان در خود دارد. به عبارت دیگر، اسید هیومیک زیستی حاصل از فرآیند تخمیر قارچی، فرآورده‌ای که هم‌زمان باعث بهبود پویایی خاک، کنترل بیماری‌های گیاهی و افزایش بهره‌وری پایدار می‌گردد. چنین فرآورده‌ای می‌تواند به‌عنوان یک ساختار هیومیکی زیست‌فعال و سازگار با محیط زیست در کشاورزی مدرن معرفی شود (Olivares et al., 2017). از آنجا که تولید آن مبتنی بر منابع تجدیدپذیر است، این روش قابلیت مقیاس‌پذیری بالا در شرایط اقلیمی خشک ایران و سایر مناطق مشابه را دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا و با حمایت مالی شرکت ماز و ژن رازک کالا انجام شده است.

به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در غشای سلولی عمل می‌کنند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که هیومیک‌های زیستی می‌توانند بیان ژن‌های مرتبط با رشد ریشه و جذب فسفر را در گیاهان فعال کنند (Nardi et al., 2021). در مجموع، اثر هم‌افزایی ترکیبات زیستی تولید شده و گروه‌های عاملی فعال، موجب می‌شود هیومیک زیستی عملکردی مشابه محرک‌های زیستی داشته باشد که هم به رشد و هم به دفاع گیاه کمک می‌کنند. از دیدگاه زیست‌محیطی، فرآیند تولید هیومیک زیستی که بر پایه‌ی ضایعات کشاورزی استوار است، نمونه‌ای از اقتصاد بازیافتی محسوب می‌شود و می‌تواند به کاهش وابستگی به منابع معدنی محدود مانند لئوناردیت کمک کند (Canellas et al., 2014). این مسیر زیستی نسبت به فرآیندهای شیمیایی رایج، انرژی کمتری مصرف کرده و آلودگی‌های زیست‌محیطی کمتری ایجاد می‌کند (Spaccini et al., 2019). در عین حال، تبدیل پسماندهای آلی به محصولی با ارزش افزوده بالا مانند هیومیک زیستی، نه تنها از منظر محیط‌زیستی بلکه از جنبه‌ی اقتصادی نیز حائز اهمیت است، زیرا امکان تولید محلی کودهای آلی و کاهش واردات کودهای شیمیایی را فراهم می‌کند. افزون بر آن، استفاده از هیومیک زیستی در سیستم‌های کشت پایدار می‌تواند به بهبود ساختار خاک، افزایش ترسیب

۶. منابع

- Ampong, K., Thilakarathna, M. S. and Gorim, L. Y. (2022). Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. *Frontiers in Agronomy*, 4, 848621.
- Baigorri, R., Fuentes, M., González-Gaitano, G. and García-Mina, J. M. (2007). Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1–3), 301–306.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Bischof, R. H., Ramoni, J. and Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 106.
- Bulgari, D., Alias, C., Peron, G., Ribauda, G., Gianoncelli, A., Savino, S. and Gobbi, E. (2023). Solid-state fermentation of *Trichoderma* spp.: A new way to valorize the agricultural digestate and produce value-added bioproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(10), 3994–4004.
- Canellas, L. P. and Olivares, F. L. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 3.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H. and Dai, S. (2002). Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48(1), 59–68.
- Chen, Y., Senesi, N. and Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, 41(2), 352–358.
- Chen, Y., Senesi, N. and Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, 41(2), 352–358.
- Cheng, G., Cui, Y., Sun, Z. and Li, J. (2019). Extraction of humic acid from lignite by KOH: Process optimization and characterization. *Applied Sciences*, 9(7), 1356.

- de Souza, A. F. F., García, A. C., Sátiro, J. N. de O., de Lima, B. R., Fernandes, M. S., Berbara, R. L. L. and Santos, L. A. (2025). Humic acid regulates root growth through ROS-dependent pathway and hormone signaling in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(32), 20081–20093.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749-759.
- Florencio, C., Couri, S. and Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*, 2012(1), 793708.
- Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E. and Ladisch, M. R. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and microbial technology*, 90, 53-60.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2017). *The future of food and agriculture – Trends and challenges*. Rome: FAO.
- Fuentes, M., Baigorri, R., González-Gaitano, G. and García-Mina, J. M. (2018). New methodology to assess the quantity and quality of humic substances in organic materials and commercial products for agriculture. *Journal of Soils and Sediments*, 18(4), 1389–1399.
- Fuentes, M., González-Gaitano, G. and García-Mina, J. M. (2006). The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*, 37(11), 1949–1959.
- Fukushima, M., Fujisawa, N., Furubayashi, K., Iwai, H., Otsuka, K., Yamamoto, M., ... & Horiya, S. (2012). Structural features and Fe(II)-binding capacities of humic acids from reservoir sediments. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 45(6), 452–458.
- Gams, W. and Bissett, J. (1998). Morphology and identification of Trichoderma. In C. P. Kubicek & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1: Basic biology, taxonomy and genetics (pp. 3-34). Taylor & Francis.
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O. and Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*, 12(3), 432.
- Hu, Z.-T., Zhou, W., Lin, Q. and Fang, Z. (2022). Humic substances derived from biomass waste during aerobic composting and hydrothermal treatment: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 878686.
- Hubka, V., Kolarik, M., Kubátová, A. and Peterson, S. W. (2012). Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Petersonii* based on β -tubulin and ITS sequence data. *IMA Fungus*, 3(1), 97-133.
- Klavins, M. and Purmalis, O. (2014). Characterization of humic acids from raised bog peat. *Latvian Journal of Chemistry*, 52(1–2), 83.
- Lal, R. (2019). Eco-intensification through soil carbon sequestration: Harnessing ecosystem services and advancing sustainable development goals. *Journal of Soil and Water Conservation*, 74(3), 55A–61A.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., ... & del Río Andrade, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.
- Mbarki, S., Cerdà, A., Brestic, M., Mahendra, R., Abdelly, C. and Pascual, J. A. (2017). Vineyard compost supplemented with *Trichoderma harzianum* T78 improves saline soil quality. *Land Degradation & Development*, 28(4), 1028–1037.
- Meryemoglu, B. and Ozsel, B. K. (2022). Humic acids derived from lignocellulosic biomass: Characterization and utilizing for environmental applications. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(10), 402.
- Mitchell, D. A., Lonsane, B. K. and Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid-state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68, 61-138.
- Motta, F. L. and Santana, M. H. A. (2013). Production of humic acids from oil palm empty fruit bunch by submerged fermentation with *Trichoderma viride*: Cellulosic substrates and nitrogen sources. *Biotechnology Progress*, 29(3), 631–637.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R. and Parvoli, G. (2000). Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41(5), 653–658.
- Nardi, S., Schiavon, M. and Francioso, O. (2021). Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules*, 26(8), 2256.
- Olivares, F. L., Busato, J. G., de Paula, A. M., da Silva Lima, L., Aguiar, N. O. and Canellas, L. P. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 4(1), 30.
- Piccolo, A. and Spiteller, M. (2003). Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(6), 1047–1059.
- Puglisi, E., Pascazio, S., Suciú, N., Cattani, I., Fait, G., Spaccini, R., ... & Trevisan, M. (2013). Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 82-94.
- Rani, J., Kumari, S. and Paul, B. (2024). Extraction and chemical characterization of humic acid produced from lignite coals of arid region of Gujarat, Western India. *Scientific Reports*, 14(1), 30923.
- Rathor, P., Upadhyay, P., Ullah, A., Gorim, L. Y. and Thilakarathna, M. S. (2024). Humic acid improves wheat growth by modulating auxin and cytokinin biosynthesis pathways. *AoB Plants*, 16(2), plae018.*

- Sadh, P. K., Duhan, S. and Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-15.
- Saldarriaga-Hernández, S., Velasco-Ayala, C., Flores, P. L. I., de Jesús Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M. and Carrillo-Nieves, D. (2020). Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1099–1116.
- Sarlaki, E., Kianmehr, M. H., Marzban, N., Shafizadeh, A., Sheikh Ahmad Tajuddin, S. A. F., Hu, S., Tabatabaei, M. and Aghbashlo, M. (2024). Advances and challenges in humic acid production technologies from natural carbonaceous material wastes. *Chemical Engineering Journal*, 155521.
- Shoresh, M., Harman, G. E. and Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21–43.
- Singh, R. K., Pandey, P. K., Singh, R. N., Swati, & Nain, L. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*, 2012, 793708.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.
- Soccol, C. R. and Vandenberghe, L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 205-218.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Drosos, M. and Vinci, G. (2024). Antibacterial and antioxidant properties of humic substances from composted agricultural biomasses. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 1–15.
- Stavi, I., Thevs, N. and Priori, S. (2021). Soil salinity and sodicity in drylands: A review of causes, effects, monitoring, and restoration measures. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 712831.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions* (2nd ed.). Wiley.
- Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G. and Cacciola, S. O. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. *Journal of Fungi*, 6(4), 263.
- Teather, R. M. and Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 777-780.
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Van Veen, J. A., Cocconcelli, P. S. and Trevisan, M. (2013). Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(2), 172–184.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M. (2008). *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. and Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, 7(11), 1934578X1200701133.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycology Journal*, 8(1), 127–139.
- Vinci, G., Cangemi, S., Bridoux, M., Spaccini, R. and Piccolo, A. (2021). Molecular properties of the Humeome of two calcareous grassland soils as revealed by GC/qTOF-MS and NMR spectroscopy. *Chemosphere*, 279, 130518.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Busato, J. G., Peres, L. E. P. and Façanha, A. R. (2013). Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25, 13-25.
- Zhai, S., Wang, L., Yu, F., Gao, Z., Yang, X., Cao, X., Shaghaleh, H. and Hamoud, Y. A. (2025). Effects of *Trichoderma harzianum* combined with *Phanerochaete chrysosporium* on lignin degradation and humification during chicken manure and rice husk composting. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1515931.
- Zhang, Y., Li, M., Yang, R., Chen, W. and Li, H. (2021). *Extraction and structural characterization of humic acids from composted agricultural wastes using FTIR and elemental analysis*. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 14(4), 187–194.
- Zhang, W., Sunami, K., Liu, S., Triana, D., Tachrim, Z. P., Kikuchi, R., ... & Murai, Y. (2025). Scalable preparation of furanosteroidal viridin, β -viridin and viridiol from *Trichoderma virens*. *Scientific Reports*, 15(1), 3110.
- Zhou, L., Yuan, L., Zhao, B., Li, Y. and Lin, Z. (2019). Structural characteristics of humic acids derived from Chinese weathered coal under different oxidizing conditions. *PLoS One*, 14(5), e0217469.
- Ezeonuegbu, B. A., Abdullahi, M. D., Whong, C. M., Sohunago, J. W., Kassem, H. S., Yaro, C. A., ... & Batiha, G. E. S. (2022). Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. *Scientific Reports*, 12(1), 2094.