Archive of SID

بررسی توان ماندگاری باکتریهای تیوباسیلوس بر روی چند نوع حامل مختلف

حسین بشارتی، ناهید صالح راستین، محمدجعفر ملکوتی و عزیزالله علیزاده[۱]*

چکیده

استفاده از گوگرد به عنوان ماده اسیدزا جهت افزایش قابلیت جذب برخی از عناصر غذایی در خاکهای آهکی و قلیائی، اصلاح خاکهای سدیمی و کنترل و مبارزه با برخی از عوامل بیماریزای گیاهی متداول بوده و سابقه دیرینه دارد. به دلیل اهمیت اکسایش بیولوژیک گوگرد در مقایسه با اکسایش شیمیایی آن، شرط بهره‌گیری از توان بالقوه گوگرد حضور باکتریهای تیوباسیلوس، به عنوان مهمترین اکسید کنندگان گوگرد، در خاک می‌باشد. اثرات سودمند استفاده از گوگرد همراه با باکتریهای تیوباسیلوس ضمن آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای متعددی به اثبات رسیده که در آنها از سوسپانسیون کشت خالص یا خاک حاوی تیوباسیلوس به عنوان مایه تلقیح استفاده شده است. همچنین اکسایش ترکیبات احیاء گوگرد توسط تیوباسیلوس‌ها منجربه تولید اسید در طی دوره تکثیر یا نگهداری بلند مدت آنها می‌شود که عامل محدود کننده رشد بوده و سبب کاهش جمعیت آنها می‌شود. این تحقیق بر مبنای ضرورت تهیه یک حامل مناسب جهت نگهداری بلند مدت باکتریهای تیوباسیلوس و استفاده از آن به عنوان مایه تلقیح در آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای انجام شد. چند ماده ارزان و سهل‌الوصول که تصور می‌شد توانایی نگهداری باکتریهای تیوباسیلوس را دارا می‌باشند انتخاب و برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آنها اندازه‌گیری شد. ترکیبی از آنها به نسبت‌های متفاوت تهیه و شش ترکیب از آنها انتخاب گردید. پس از استریل آنها میزان ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری تیوباسیلوس به آنها اضافه گردید. آزمایش توان ماندگاری باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت آزمایشات کرتهای خرد شده اجرا گردید. با احتساب سه تکرار برای هر تیمار تعداد ۳۶ پاکت مایه تلقیح تهیه و نیمی از آنها در یخچال (۴°C) و نیمی دیگر در دمای معمولی اتاق (۲۵°C) قرار داده شدند. سپس در زمان‌های ۰، ۱۴، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ روز پس از شروع آزمایش از آنها نمونه‌برداری و تعداد باکتریها و همچنین pH آنها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر اصلی و اثرات متقابل تمام تیمارها بر pH و جمعیت باکتریها در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. در حرارت ۴°C، pH و جمعیت باکتریها نسبت به حرارت ۲۵°C بطور معنی‌داری بیشتر بود. حامل شماره ۳ هنگامی که در حرارت ۴°C قرار گرفته بیشترین pH و زمانی که در حرارت ۲۵°C قرار گرفته بیشترین جمعیت باکتری را به خود اختصاص داده است و با بقیه حاملها تفاوت معنی‌داری دارد در حالی که حاملهای ۱ و ۶ به ترتیب کمترین pH و جمعیت باکتریها را دارا می‌باشند. مقایسه ۸ زمان شمارش در حاملهای مختلف نشان داد که در حاملهای ۱ و ۶ پس از شروع آزمایش، در حامل‌های ۲ و ۵ پس از ۹۰ روز، در حامل ۴ پس از ۳۰ روز و در حامل ۳ پس از ۵۰ روز کاهش معنی‌دار جمعیت نسبت به شروع آزمایش آغاز شده است. ضمناً روند کاهش جمعیت با گذشت زمان، در حرارت ۲۵°C سریع‌تر از حرارت ۴°C بوده است.

واژه های کلیدی: تیوباسیلوس، حامل، گوگرد، مایه تلقیح

مقدمه

خاکهای آهکی و قلیایی با غلظت زیاد یون کلسیم و pH بالا عناصر غذایی چون فسفر، آهن، روی را تثبیت کرده و به رغم وجود مقادیر فراوان این عناصر در خاک کمبود مقدار قابل جذب آنها کاهش رشد گیاهان را سبب می‌شود (Tisdale و همکاران، ۱۹۹۳؛ Modaihsh و

۱- به ترتیب استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، دانشیارگروه خاکشناسی دانشگاه تهران و اساتید دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

* - وصول: ۸۱/۲/۹ و تصویب: ۸۳/۵/۲۲

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۹۸۹؛ Kaplan و Orman، ۱۹۹۸). جهت رفع این مشکل، استفاده از گوگرد بعنوان ماده اسیدزا سابقه دیرینه دارد. همچنین کاربرد این ماده در اصلاح خاکهای سدیمی و نیز کنترل و مبارزه با برخی عوامل بیماریزای گیاهی به علت صرفه اقتصادی بسیار متداول است (Rupela و Tauro، ۱۹۷۳؛ Tisdale و همکاران، ۱۹۹۳). اثرات مفید گوگرد از جنبه تغذیه گیاهی به فرآیند اکسایش آن، تولید اسید، کاهش pH و افزایش انحلال عناصر غذایی در محیط اطراف ریشه مربوط می‌شود. لذا شرط بهره‌گیری از توان بالقوه گوگرد حضور باکتریهای تیوباسیلوس در خاک می‌باشد زیرا قسمت اعظم گوگرد توسط میکروارگانیسم های خاک که باکتریهای تیوباسیلوس مهمترین آنها می‌باشند، به اسید سولفوریک تبدیل می‌شود (Nor و Tabatabai، ۱۹۷۷؛ Kilham، ۱۹۹٤).

بطور معمول تعداد و تنوع این باکتریها در خاکهای زراعی به دلیل کمبود فرمهای احیاء شده گوگرد به عنوان منبع غذایی مورد نیاز آنها و نیز عدم توانایی این باکتریها در تولید اسپور و شرایط نامساعد اکثر خاکهای کشاورزی بسیار محدود است، گرچه افزایش جمعیت تیوباسیلوس‌ها (بویژه انواع خنثی دوست) بدنبال مصرف گوگرد در خاک گزارش شده است (Sholeh و همکاران،۱۹۹۷؛ Chapman، ۱۹۹۰). اما این افزایش ضمن نیاز به شرایط محیطی مساعد، زمان نسبتاً طولانی را می‌طلبد. به علاوه این احتمال وجود دارد که انواع بومی خاکهای زراعی از لحاظ توان اکسایش گوگرد ضعیف باشند. لذا استفاده از سویه‌های فعال آنها همراه با گوگرد کمک مؤثری برای سرعت بخشیدن به اکسایش گوگرد و دست‌یابی به اثرات مفید آن خواهد بود که این امر ضمن آزمایش‌های متعددی که متعاقباً به چند نمونه از آنها اشاره خواهد شد، به اثبات رسیده است.

استفاده از گوگرد همراه با باکتریهای تیوباسیلوس در کشت گلخانه‌ای ذرت توانست به اندازه کود سوپر فسفات تریپل در جذب فسفر و افزایش عملکرد موثر واقع شود. pH خاک در تیمارهای شاهد، تیوباسیلوس(10^{6} cfu.ml^{-1})، گوگرد (۰/۵ درصد)، گوگرد + تیوباسیلوس و سوپر فسفات تریپل (۲۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم) به ترتیب ۷/۹، ۷/۸۷، ٦/۸٦ ، ٦/٤۹ و ۷/۹، میزان فسفر قابل جذب خاک به ترتیب ٤/۸، ۵/۰۳، ۷/۵۳، ۱٤/٦۵ و ۷/۲ و آهن قابل جذب خاک ۲/۱۳، ۲/۰۵، ۲/۷۱، ٤/۲ و ۲/۱۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بودند. افزایش مقدار قابل جذب این دو عنصر غذایی باعث افزایش جذب آنها توسط گیاه گردید. فسفر جذب شده توسط ذرت در تیمارهای مذکور به ترتیب ۱۰/۱٦، ۱۰/۸، ۱۸/۸۳، ۳۵/۳۹ و ۱۰/۸۹ و آهن جذب شده ۰/۳۸، ۰/٤۱، ۰/٤۹، ۰/٦٦۵ و ۰/۵۳ میلی‌گرم در گلدان تعیین شدند. وزن خشک ذرت در تیمارهای یاد شده به ترتیب ۱۰/۳، ۱۱/۱، ۱۱/۷، ۲۰/۳۱ و ۱٦/۱۷ گرم در گلدان گزارش شدند. تلقیح باکتریهای تیوباسیلوس بدون مصرف گوگرد تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده نداشت، در حالی که مصرف گوگرد و اکسایش آن توسط میکروارگانیسم‌های بومی اکسید کننده گوگرد، ضمن کاهش معنی‌دار pH خاک، مقدار آهن و فسفر قابل جذب خاک و همچنین فسفر و آهن جذب شده توسط ذرت را در مقایسه با شاهد افزایش داد ولی در افزایش وزن خشک تأثیر معنی‌دار ایجاد نکرد. کاربرد مایه تلقیح باکتریهای تیوباسیلوس همراه با گوگرد با تشدید اکسایش گوگرد، ضمن افزایش معنی‌دار شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مقایسه با شاهد، نسبت به گوگرد نیز شاخص‌ها را به طور معنی‌دار افزایش داد (بشارتی و صالح راستین، ۱۳۷۸). میزان اکسایش گوگرد به علت اختلاف در تعداد و نوع باکتریهای تیوباسیلوس، در خاکهای تلقیح شده یازده برابر بیشتر از خاکهای تلقیح نشده‌بود (Attoe و Olson، ۱۹٦٦). اثر کود بیوسوپر (آپاتیت + گوگرد+ خاک حاوی تیوباسیلوس) معادل کود سوپر فسفات ارزیابی شده است (Pathirathna و همکاران، ۱۹۸۹). Swaby (۱۹۷۵) با بررسی تاثیر سولفافس[1] (آپاتیت + گوگرد)، بیوسوپر[2] (سولفافس + خاک حاوی تیوباسیلوس) و کود سوپر فسفات بر روی شبدر در شرایط گلخانه و مزرعه دریافت که اگر عملکرد و مقدار فسفر و سولفات جذب شده ناشی از مصرف کود سوپر فسفات به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ در نظر گرفته شوند، این ارقام در مورد بیوسوپر ۸۱، ۷۲ و ۱۳۵ و در مورد سولفافس ۲٦، ۳۱ و- می‌باشند.

در مقایسه با تحقیقات گسترده‌ای که در مورد کاربرد گوگرد انجام شده، موارد استفاده از باکتریهای تیوباسیلوس چندان زیاد نیست. در این موارد معدود نیز عمدتاً از سوسپانسیون کشت خالص یا خاک حاوی تیوباسیلوس استفاده شده، که کاربرد آن در سطح وسیع به علت نیاز به تجهیزات خاص و اقتصادی نبودن، عملاً مقدور نیست. تولید انبوه مایه تلقیح تیوباسیلوس‌ها نیز با مشکل مواجه بوده است زیرا این باکتری‌ها به دلیل شیمیولیتوتروف بودن، ضمن اکسایش ترکیبات گوگرد، مقداری اسید تولید می‌کنند که افزایش این حالت اسیدی در طی دوره تکثیر یا نگهداری بلند مدت آنها بصورت یک عامل محدود کننده رشد، افت شدید جمعیت آنها را سبب می‌شود (Vishniac و Santer، ۱۹۵۷). لذا این تحقیق بر

1 - Sulphaphos
2 - Biosuper

www.SID.ir

Archive of SID

مبنای ضرورت تهیه یک ماده حامل مناسب جهت نگهداری بلند مدت تیوباسیلوس‌ها و استفاده از آن به عنوان مایه تلقیح در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای انجام شده است. در تهیه ماده حامل برای یک میکروارگانیسم (از جمله باکتری‌های تیوباسیلوس) علاوه بر تأمین نیازهای اکولوژیک و فیزیولوژیک میکروارگانیسم مورد نظر، به خصوصیات دیگری از ماده حامل نیز باید توجه داشت. یک حامل مناسب باید بتواند جمعیت میکروارگانیسم مورد نظر را از زمان تولید تا هنگام مصرف در حد استانداردهای تعیین شده در خود نگه دارد. لذا باید دارای توان جذب و نگهداری زیاد رطوبت (Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤؛ Smith، ۱۹۹۲)، ظرفیت تبادل کاتیونی و ظرفیت بافری بالا، قدرت آزاد سازی سریع میکروارگانیسم‌ها در خاک، خواص فیزیکی و شیمیایی یکنواخت، شرایط تهویه‌ای مناسب، EC پائین بوده (Strijdom و Deschodt، ۱۹۷٦؛ Motsara و Beena، ۱۹۹۵) و فاقد مواد سمی، گرمای خیس شدن (Heat of wetting) و حالت خمیری و چسبندگی باشد. همچنین ماده حامل باید دارای pH خنثی بوده یا به سهولت قابل تنظیم باشد و دارای سهولت استریل سازی و فرآیند ساخت و حمل و نقل آسان بوده و به راحتی به سطح بذور یا دانه‌های سایر کودهای همراه آن بچسبد، و از لحاظ زیست محیطی به سهولت تجزیه شود (Roughley و Vincent، ۱۹٦۷؛ Rennie و Hyness، ۱۹۹۳؛ Motsara و Beena، ۱۹۹۵). به علاوه از جنبه اقتصادی باید بهای ارزان داشته و فراوان باشد (Motsara و Beena، ۱۹۹۵).

بر خلاف باکتری‌های ریزوبیوم که تحقیقات زیادی در مورد تهیه ماده حامل مناسب برای آنها انجام شده، در مورد باکتری‌های تیوباسیلوس تحقیقی در این زمینه صورت نگرفته است. در کشورهای مختلف از مواد متفاوتی به عنوان ماده حامل ریزوبیوم‌ها استفاده می‌شود که مهمترین آنها پیت می‌باشد. به علاوه ذغال سنگ (Crawford و Berryhill، ۱۹۸۳)، کمپوست باگاس (Philpotts، ۱۹۷٦)، سبوس برنج (Khatri و همکاران، ۱۹۷۳)، ورمیکولیت (Sparrow و Ham، ۱۹۸۳) پرلیت، سنگ فسفات (Daza و همکاران، ۱۹۹۹) از جمله مواد دیگری هستند که بدین منظور استفاده می‌شوند.

علیرغم خصوصیات مشترک باکتری‌های تیوباسیلوس و ریزوبیوم (میله‌ای، گرم منفی، متحرک، هوازی و عدم تولید اسپور)، روش تغذیه و فرآیند کسب انرژی آنها کاملاً متفاوت و در تیوباسیلوس‌ها همراه با حالت اسیدزایی قوی است. بنابراین برای تهیه ماده نگهدارنده مناسب برای این باکتری‌ها باید ضمن استفاده از تجربیات کارهای انجام شده در مورد ریزوبیوم و لحاظ کردن کلیه ویژگی‌های ماده حامل که در بالا به آنها اشاره شد، دو خصوصیت اساسی یعنی وجود ترکیبات احیاء شده گوگرد و داشتن خاصیت بافری بالا نیز در نظر گرفته شوند که این پژوهش با توجه به تمامی نکات یاد شده، انجام گرفته است.

مواد و روشها

اندازه گیری خصوصیات مواد حامل

در این تحقیق از پرلیت، آپاتیت، باگاس و بنتونیت استفاده شد. این ترکیبات ارزان قیمت و سهل‌الوصول بوده و بر اساس اطلاعات موجود در زمینه نیازهای اکولوژیک باکتری‌های تیوباسیلوس و مشخصات مواد نگهدارنده، به نظر می‌رسد توانایی نگهداری باکتری‌های تیوباسیلوس را دارا باشند. این مواد در ترکیبات حامل باکتری‌های ریزوبیوم نیز استفاده می‌شوند. لذا انتظار می‌رفت که در نگهداری بلند مدت تیوباسیلوس‌ها نیز بتوانند موثر واقع شوند. مواد مذکور که بصورت پودر نرم بودند پس از عبور از الک ۱۰۰ مش درآون در دمای ۵۰°C به مدت ۲٤ ساعت خشک شدند. برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آنها مطابق روشهای معمول آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند (Page و همکاران، ۱۹۸۲). به علاوه ظرفیت نگهداری آب و ظرفیت بافری که از مهمترین ویژگیهای ماده حامل باکتری‌های تیوباسیلوس محسوب می‌شوند نیز اندازه‌گیری شدند (جدول ۱).

به منظور تعیین ظرفیت نگهداری آب، مقدار مشخصی از مواد مذکور در گلدان پلاستیکی کوچک که کاغذ صافی در ته آن تعبیه شده بود، ریخته شد و با آب مقطر اشباع گردید. سطح گلدانها جهت جلوگیری از تبخیر آب پوشانده شد. پس از خروج آب ثقلی و ثابت شدن وزن گلدانها، درصد رطوبت نمونه‌ها تعیین و به عنوان ظرفیت نگهداری آب منظور شد (Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤).

جهت رسم نمودار تیتراسیون مواد که بیانگر خاصیت بافری آنها می‌باشد از هر ماده ده نمونه ۵ گرمی برداشته شد، و به هر نمونه ۱۰ میلی لیتر محلول HCl که حاوی، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ و ٦ میلی‌اکی والان اسید بود، اضافه گردید. pH نمونه‌ها در هشت روز متوالی اندازه‌گیری گردید. نمودار تیتراسیون آنها از روز چهارم به بعد تغییر محل قابل ملاحظه‌ای نداشت. لذا نمودار روز چهارم برای محاسبه ظرفیت بافری مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

آماده سازی حامل ها و تکثیر باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار کافی از چهار ماده مذکور در دستگاه اتوکلاو به مدت نیم ساعت، در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱ اتمسفر چهار بار به فاصله ۲٤ ساعت استریل و سپس در دمای ۵۰°C در آون خشک شدند. از آنجا که هیچ یک از آنها به تنهایی خصوصیات یک ماده حامل مناسب را دارا نبودند، لذا در شرایط استریل ترکیبی از آنها به نسبت‌های مورد نظر تهیه و شش ترکیب متفاوت از آنها به عنوان حامل انتخاب گردیدند. حاملهای ۱ تا ۵ علاوه بر پرلیت به ترتیب حاوی گوگرد (۱ درصد)، خاک فسفات (٦۰ درصد)، گوگرد (۱ درصد)+ خاک فسفات (٦۰ درصد)، کربنات کلسیم (۷ درصد) و بنتونیت (۵۰ درصد) بودند، در حالی که در حامل ٦ از باگاس و گوگرد عنصری (۱ درصد) استفاده شد، به نحوی که ظرفیت جذب آب در همه آنها یکسان بود. سپس هر یک از آنها در کیسه‌های پلی‌اتیلنی (۵۰×۱٦ cm) ریخته و درب آنها دوخته شد. باکتری استفاده شده در این تحقیق از جنس تیوباسیلوس و از گروه خنثی دوست *(Thiobacillus neapolitanus)* بود. این باکتری به مقدار مورد نیاز در محیط کشت پستگیت[1] با استفاده از انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸°C و چرخش ۱٦۰ دور در دقیقه تکثیر شد. با توجه به منحنی رشد این باکتری که قبلاً بدست آمده بود، پس از رشد کافی و رسیدن به مرحله رشد ثابت[2](حدود ٤ روز) pH محیط کشت برابر با ۵/۹۱ و جمعیت باکتری ۸×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از سوسپانسیون کشت تازه باکتری به میزان ۱۰۰ میلی لیتر به هر بسته اضافه گردید و بسته‌ها تا توزیع یکنواخت باکتری در ماده حامل و رسیدن به حالت فیزیکی مناسب با دست بهم زده شدند.

طرح آزمایش

آزمایش توان ماندگاری باکتری روی حامل‌های مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت آزمایشهای کرتهای خردشده (Split Plots) اجرا گردید. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: ۱- **درجه حرارت:** شامل دو سطح ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (کرت اصلی)، ۲- **زمان شمارش:** شامل زمانهای، ۱٤، ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ روز بود (کرت فرعی)، و ۳- **نوع ماده حامل:** شامل شش ترکیب متفاوت از مواد نگهدارنده (کرت فرعی فرعی). با احتساب سه تکرار برای هر تیمار، تعداد ۳٦ پاکت مایه تلقیح تهیه شد که نیمی از آنها در دمای ٤°C در یخچال و نیمی دیگر در دمای معمولی اتاق (۲۵°C) قرار داده شدند. سپس در ۸ زمان یاد شده از هر بسته دو نمونه یک و پنج گرمی برداشته شد. از نمونه یک گرمی سریهای رقت تهیه شد و سوسپانسیون‌های حاصل روی محیط پستگیت حاوی آگار کشت شدند. پس از ده روز انکوباسیون در دمای ۲۸°C، با شمارش کلنی‌ها روی پلیت‌هایی که حاوی ۳۰۰-۳۰ کلنی بودند تعداد باکتری در هر مایه تلقیح بدست آمد. همچنین pH سوسپانسیون ۱:۱ نمونه‌های ۵ گرمی پس از حدود ۲۰ ساعت اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصل از شمارش باکتری و اندازه‌گیری pH با نرم افزار کامپیوتری MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اگر ظرفیت بالای نگهداری رطوبت و داشتن خاصیت بافری را از مهمترین ویژگیهای یک ماده حامل مناسب برای باکتری‌های تیوباسیلوس‌ها بدانیم، با توجه به نتایج اندازه‌گیری برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آپاتیت، پرلیت، باگاس و بنتونیت (جدول ۱) و همچنین نمودار تیتراسیون آنها (شکل ۱) مشخص شد که پرلیت و باگاس به علت نداشتن خاصیت بافری و آپاتیت به دلیل ظرفیت کم نگهداری رطوبت نمی‌توانند به تنهایی به عنوان ماده حامل استفاده شوند. بنتونیت علیرغم داشتن خاصیت بافری و ظرفیت بالای نگهداری آب، پس از جذب آب حالت خمیری و چسبندگی پیدا کرده و شرایط تهویه‌ای مناسبی برای باکتری‌های هوازی تیوباسیلوس ایجاد نمی‌کند. لذا استفاده از آن به تنهایی به عنوان ماده حامل نیز، منتفی است. لذا ترکیبی از آنها در قالب شش نوع حامل انتخاب شدند.

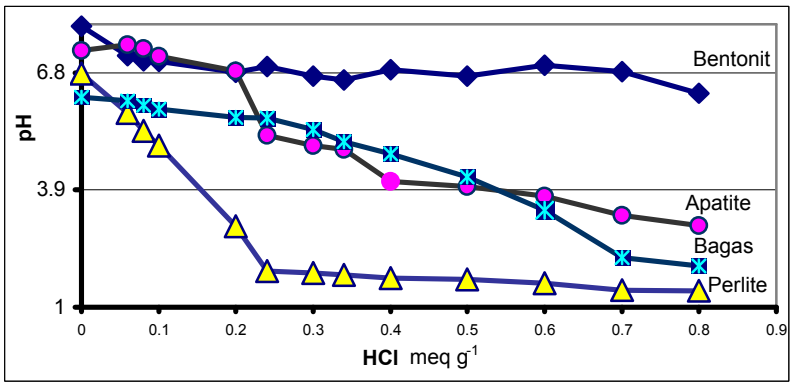
جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر pH و جمعیت باکتریهای ماندگار بر روی ٦ نوع حامل مختلف را نشان می‌دهد. اثر اصلی و اثرات متقابل تمام تیمارها بر pH و جمعیت باکتری‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار شد.

در دمای ٤°C، pH و جمعیت باکتریها بطور معنی‌داری نسبت به pH و جمعیت باکتریها در دمای ۲۵°C بیشتر بود. pH لگاریتم جمعیت باکتریها در دمای ٤°C به ترتیب ۵/۸۱ و ٦/۳۱ و در دمای °C ۲۵، ٤/۵٦ و ٦/۰۵ بودند. جدول ۳ مقایسه میانگین pH و جمعیت باکتریها را در شش حامل مورد بررسی، در مجموع دو درجه حرارت و هشت زمان شمارش، نشان می‌دهد (اثر اصلی نوع ماده حامل). مقایسه شش حامل نشان داد که حامل شماره ۳ دارای بیشترین pH و جمعیت باکتری می‌باشد. این حامل از لحاظ pH با حامل ٦ و از لحاظ جمعیت با حامل های ۲ و ۵ تفاوت معنی‌دار نشان نداد.

[1] - Postgate
[2] - Stationary phase

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نمودارتیتراسیون آپاتیت، پرلیت، بنتونیت و باگاس با HCl

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مواد حامل باکتری

ویژگی	ماده حامل			
	پرلیت	آپاتیت	بنتونیت	باگاس
ازت (٪)	۰/۰۲٦	۰/۰٤۲	۰	۱/٤۲
فسفر (٪)	۰/۰۰۷	۳۹	۰/۰۲۱	۰/۱٤
پتاسیم (٪)	۰/۰۵۳	۰/۰۰۳	۰/۱۷	۰/٤٦
کربن آلی (٪)	۰/۱۱	۰/٤۲	۰	۵۳
مواد خنثی شونده (٪)	۰/۱	۸	۵/۹	۰/۷۵
ظرفیت جذب آب (٪)	۳۵۰	۳٦	۲۸٦	۲۳۵
آهن $mgkg^{-1}$	۱۹۰	۰/۸	۸۰۰	۱۰۰۰
روی $mgkg^{-1}$	۲	۳/۹	۲۳	۱۱۹
مس $mgkg^{-1}$	۱	۲/۷	۵	۷/۵
منگنز $mgkg^{-1}$	۹	۳۱	۵۵	٦۵
pH*	۵/۷۲	۷/۹	۸/٦۷	٦/۷
dS m^{-1} EC*	۰/۳۷	۰/۳۵	٤/۰۳	۱/۵
وزن مخصوص ظاهری $g\ cm^{-3}$	۰/۱۷-۰/۰۵	۱/۵۲	۰/۹۹	۰/٤۲

* pH و EC پرلیت درسوسپانسیون ۱:۱۰ و بقیه درسوسپانسیون ۱:۲/۵ تعیین شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر pH و جمعیت تیوباسیلوس

لگاریتم جمعیت باکتری	pH		
میانگین مربعات	میانگین مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
٤/٥٨٣ **	١١٢/١٥٠ **	١	درجه حرارت
٢٤٣/٤٩٥ **	٣٥/٩٧٧**	٥	ماده حامل
٤٣/٩٩٧ **	١٤/٤٦ **	٧	زمان
٨/٨٠٧ **	١١/٠٦**	٥	حرارت × حامل
٢/١٦٧ **	٣/٨٤ **	٧	حرارت × زمان
٨/٠٢٧**	٠/٦٧١**	٣٥	زمان × حامل
٢/٠٤٩**	٠/٦٢٧**	٣٥	حرارت × حامل × زمان
٣/٨٢	٢/٩٨		C.V (%)

** معنی دار در سطح ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین سطوح مختلف حرارت و حامل بر pH و جمعیت باکتری تیوباسیلوس

pH						لگاریتم جمعیت					
حامل ۱	۲	۳	٤	٥	٦	۱	۲	۳	٤	٥	٦
۳/۷	/۱٥	٦/۱۲	٥/۰۸	/۰۸	٥/۹۹	٥/۰۱	۷/٥۳	۷/۸٤	۷/۱٥	۷/٤۷	۲/۰۸٤
	٥			٥							
c	b	a	b	b	a	C	ab	a	b	ab	d*

*میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری (روش دانکن) در سطح ٥٪ اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل درجه حرارت و حامل بر pH و جمعیت باکتری تیوباسیلوس

شماره حامل	pH		لگاریتم جمعیت باکتری	
	٤°C	۲٥ °C	٤ °	۲٥ °C
۱	۳/۸۳ g(d)	۳/٥۷ h (d)	٥/٦۱ d (b)	٤/۳۹ e (d)*
۲	٦/۳۳ b (b)	۳/۹٦ g (c)	۷/٤٥ b (a)	۷/٦۲ b (b)
۳	٦/٥۹ a (a)	٥/٦۳ e (a)	۷/۳٦ b (a)	۸/۳۲ a (a)
٤	٦/۲٤ b (b)	۳/۹۲ g (c)	۷/۳٥ b (a)	٦/۹٥c (c)
٥	٥/۷۷ de (c)	٤/۳۹ f (b)	۷/۳۹ b (a)	۷/٥٥ b (b)
٦	٦/۰۸ bc (b)	٥/۸۱cd(a)	۲/٦۸ f (c)	۱/٤۹ g (e)

*میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف یکسان هستند از نظر آماری (روش دانکن) با هم تفاوت معنی دار ندارند.

مقایسه میانگین اثرات متقابل حرارت و حامل بر pH و جمعیت باکتری در جدول شماره ٤ آمده است. با توجه به نتایج حاصل، حامل شماره ۳ هنگامی که در حرارت ٤°C قرار گرفته بیشترین pH و زمانی که در دمای ۲٥°C، قرار گرفته بیشترین جمعیت باکتریها را به خود اختصاص داده است. در حالی که حامل‌های شماره ۱ و ٦ هنگامی که در حرارت ۲٥°C قرار گرفته‌اند، به ترتیب کمترین pH و جمعیت باکتری را دارا می‌باشند. بهترین درجه حرارت برای اکسایش بیولوژیک گوگرد دمای ۲٥ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Wainwright، ۱۹۸٤). از طرفی چون باکتری استفاده شده مزوفیل بوده و حرارت حدود ۳۰°C را برای حداکثر فعالیت ترجیح می‌دهد، لذا حامل شماره ۳ وقتی که در دمای ٤°C قرار گرفته است، به علت کاهش فعالیت باکتری نسبت به حرارت ۲٥°C اسید در حامل تولید نشده و افت pH آن کم می‌باشد. در حالی که همین حامل وقتی که در حرارت ۲٥°C قرار گرفته، در اثر فعالیت باکتریها و تولید اسید کاهش معنی دار pH نسبت به حرارت ٤°C در آن دیده می‌شود. همچنین به علت مناسب بودن حرارت برای فعالیت باکتری، تکثیر باکتری در حامل صورت گرفته و جمعیت در ۲٥°C بیشتر از ٤°C می‌باشد. افزایش اکسایش گوگرد و فعالیت میکروارگانیسم‌های اکسید کننده در اثر افزایش درجه حرارت توسط Chapman (۱۹۸۹)، Nor و Tabatabai (۱۹۷۷) نیز گزارش شده است.

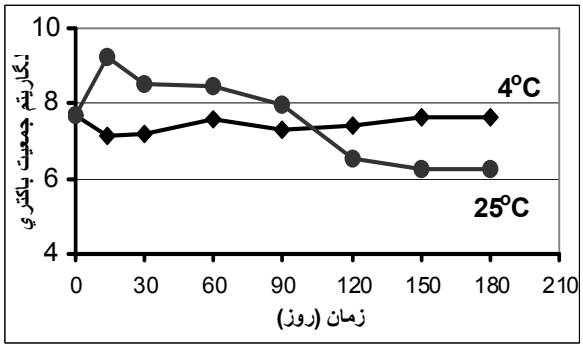
به منظور بررسی اثر نوع ماده حامل بر روی pH و جمعیت باکتری در هر یک از دو درجه حرارت، در جدول ٤ پس از مقایسه ۱۲ میانگین به روش دانکن (مقایسه اثرات متقابل)، بار دیگر شش میانگین موجود در هر ستون به روش دانکن با هم مقایسه شدند و نتیجه این مقایسه با حروف داخل پرانتز در جدول مشخص شده است. این مقایسه نشان داد که حامل شماره ۳ در هر دو حرارت بیشترین pH و جمعیت باکتری را به خود اختصاص داده و از لحاظ pH در هر دو حرارت، و از لحاظ جمعیت باکتری فقط در حرارت ۲٥°C با بقیه تفاوت معنی‌دار دارد. این حامل در دمای ٤°C از نظر جمعیت با حاملهای شماره ۲، ٤ و ٥ تفاوت معنی‌دار نشان نمی‌دهد. شکل‌های ۲ تا ۷ روند تغییرات جمعیت باکتری را در طی شش ماه در دو حرارت ٤ و ۲٥ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند. در حامل شماره ۱ در هر دو درجه حرارت با گذشت زمان جمعیت بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این کاهش در حرارت ٤°C کندتر بوده و همواره در زمانهای مختلف جمعیت در این حرارت بیشتر از حرارت ۲٥°C می‌باشد. تفاوت جمعیت

www.SID.ir

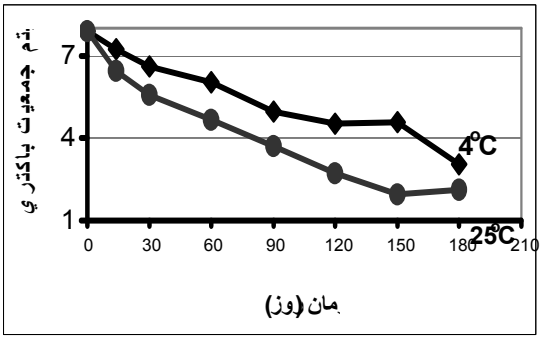
Archive of SID

در این دو حرارت معنی‌دار است، بطوری که در حرارت ٤°C جمعیت درماه ششم با میزان جمعیت درحرارت۲۵°C و ماه چهارم در یک سطح آماری قرار دارند (شکل ۲). در حامل دوم در حرارت ٤°C تغییرات جمعیت از شروع تا پایان آزمایش ناچیز است و تغییرات آن معنی‌دار نیست، در حالی که در حرارت ۲۵°C تا ماه چهارم کاهش معنی‌دار بوده و از آن پس تغییرات جمعیت ناچیز می‌باشد. تفاوت جمعیت در این دو حرارت معنی‌دار است بطوری که در سه ماهه اول جمعیت در ۲۵°C و در سه ماهه دوم جمعیت در ٤°C بالاتر می‌باشد (شکل ۳). در حامل ۳ اگرچه روند تغییرات جمعیت در دو حرارت مشابه بوده ولی تفاوت بین آنها معنی‌دار است. در حرارت ٤°C تغییرات جمعیت در طی شش ماه معنی‌دار نیست ولی در حرارت ۲۵°C سه ماهه اول نسبت به سه ماهه دوم از لحاظ آماری در سطح بالاتری قرار دارد (شکل ٤). در حامل چهارم تفاوت بین جمعیت باکتری در دو حرارت معنی‌دار بوده و در حرارت ۲۵°C در سه ماهه اول و در حرارت ٤°C در سه ماهه دوم جمعیت بالاتر است ضمناً تغییرات جمعیت در حرارت ٤°C پس از یک ماه کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد، در حالی که در حرارت ۲۵°C تغییرات آن در کل دوره نگهداری معنی‌دار است (شکل ۵). در حامل ۵ تغییرات جمعیت در هر دو حرارت یکسان و از لحاظ آماری تفاوتی بین آنها نیست. در هر دو حرارت تغییرات جمعیت در سه ماه اول نسبت به سه ماهه دوم معنی‌دار باشد (شکل ٦). در حامل ٦ در هر دو حرارت جمعیت بشدت کاهش یافته و این کاهش در ۲۵°C شدیدتر است، بطوری که در این حرارت پس از یک ماه جمعیت به صفر می‌رسد. در حالی که در ٤°C پس از سه ماه این اتفاق افتاده است (شکل ۷).

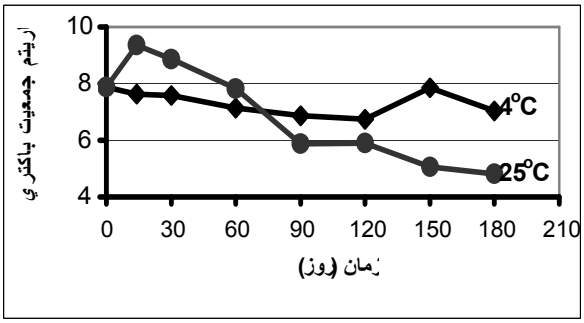
شکلهای ۸ و ۹ روند تغییرات pH در هر یک از حاملها در طی شش ماه در دو حرارت ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهند. مقایسه این دو نمودار با نمودارهای مربوط به جمعیت باکتریها به خوبی نشان می‌دهد که روند تغییرات pH و جمعیت در هر حامل بسیار مشابه و تفاوت ماندگاری باکتریها در حاملهای مختلف به ظرفیت تامپونی متفاوت حاملها مربوط می‌شود. اما در حامل ٦ افت شدید جمعیت باکتریها احتمالاً به دلیل اثرات سوء ماده آلی بر باکتریهای تیوباسیلوس می‌باشد (Borichewski، ۱۹٦۷).



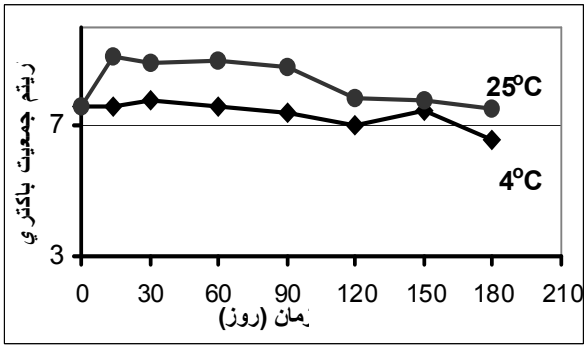
شکل۳-روند ماندگاری باکتری در دو درجه حرارت طی شش ماه در حامل ۲



شکل۲-روند ماندگاری باکتری در دو درجه حرارت طی شش ماه در حامل ۱



شکل۵- روند ماندگاری باکتری در دو

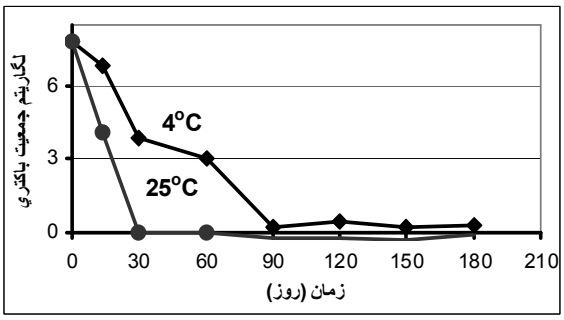


شکل٤-روند ماندگاری باکتری در دو

www.SID.ir

Archive of SID

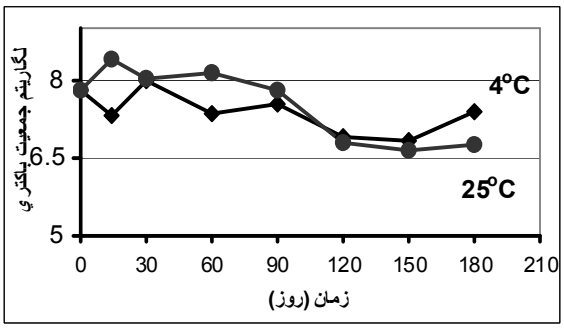
درجه حرارت طی شش ماه در حامل ٤



شکل۷- روند ماندگاری باکتری در دو

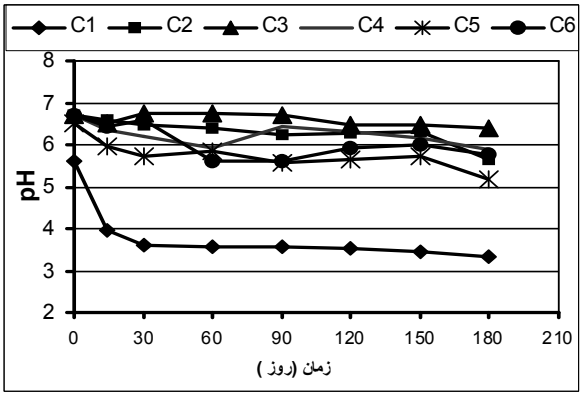
درجه حرارت طی شش ماه در حامل ٦

درجه حرارت طی شش ماه در حامل۳



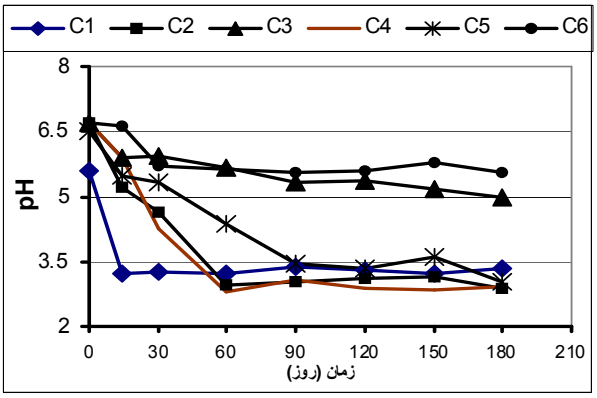
شکل٦- روند ماندگاری باکتری در دو

درجه حرارت طی شش ماه در حامل ٥



شکل۹- روندتغییرات pH در حاملها در طی

شش ماه در حرارت ٤ درجه سانتی گراد



شکل۸- روندتغییرات pH درحاملها طی

شش ماه درحرارت۲۵درجه سانتی گراد

جدول ٥- لگاریتم جمعیت باکتریهای تیوباسیلوس روی حامل‌های متفاوت در طی ٦ ماه دوره نگهداری

	زمان (روز)							
شماره حامل	۰	١٤	۳۰	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
۱	۷/۹۰a	٦/۸٥b	٦/۰۸c	٥/۳٥ d	٤/۳٥ e	۳/٦۳f	۳/۲۷f	۲/٥۹g*
۲	۷/۷۱ b	۸/۲۱a	۷/۸٦ab	۸/۰۲ab	۷/٦۳ b	٦/۹٦c	٦/۹٦c	٦/۹۳c
۳	۷/٦۰ b	۸/۳٤a	۸/۳٥a	۸/۲۷a	۸/۱۲ a	۷/٤۲b	۷/٦۲b	۷/۰۳c

www.SID.ir

Archive of SID

٤	٧/٨٨ b	٨/٤٩a	٨/٢٢ab	٧/٤٩c	٦/٣٧d	٦/٣٣d	٦/٤٧d	٥/٩٣e
٥	٧/٨٠a	٧/٨٦a	٨/٠٢a	٧/٧٦a	٧/٦٦a	٦/٨٥b	٦/٧٣ b	٧/٠٧b
٦	٧/٨٠a	٥/٤٥b	١/٩٢c	١/٥ d	٠/٠٠e	٠/٠٠e	٠/٠٠e	٠/٠٠e

*در هر ردیف میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف یکسان هستند از نظر آماری (روش دانکن) در سطح ٥٪ تفاوت معنی دار ندارند.

جدول ٥ روند ماندگاری باکتریها درطول دوره نگهداری روی شش حامل را نشان می‌دهد. در حامل‌های یک و شش پس از شروع آزمایش، در حامل های ٢ و ٥ پس از ٩٠ روز، در حامل ٣ پس از ١٥٠ روز و در حامل ٤ پس ا ز ٣٠ روز کاهش معنی‌دار جمعیت نسبت به زمان صفر (شروع آزمایش) آغاز شده است.

بطورکلی نتایج این بررسی نشان داد که اثر درجه حرارت، زمان و نوع ماده حامل بر pH و جمعیت باکتریها در سطح ١٪ معنی‌دار می‌باشد. در دمای ٤°C pH حاملها و جمعیت باکتریها بیشتر از مقدار آنها در دمای ٢٥°C بود. ماده حامل شماره ٣ بیشترین pH و جمعیت باکتریها و حاملهای ١ و ٦ کمترین جمعیت را به خود اختصاص دادند. حامل شماره ٣ در مقایسه با سایر حاملها توانست جمعیت بالایی از باکتریهای تیوباسیلوس را در فاصله زمانی طولانی‌تر در خود نگه دارد. به طوریکه در این حامل پس از گذشت ١٥٠ روز تعداد باکتریها نسبت به زمان شروع آزمایش تغییر معنی‌داری نداشت، و بر خلاف سایر حاملها، در آن در طی شش ماه آزمایش تعداد باکتریها در دمای ٢٥°C بیشتر از تعداد آنها در دمای ٤°C بود. لذا این حامل به عنوان بهترین حامل انتخاب و معرفی گردید.

همانطوریکه قبلاً اشاره شد در زمینه تهیه ماده حامل برای تیوباسیلوسها بجز موارد بسیار معدود، تحقیقی صورت نگرفته است. Swaby (١٩٧٥) با افزودن باکتریهای تیوباسیلوس به گرانولهای کود بیوسوپر و هوا خشک کردن گرانولها، پی بردکه بیش از ٩٩ درصد تیوباسیلوسها در اثر هوا خشک کردن گرانولها از بین می‌روند. او افزودن مواد جذب کننده رطوبت مثل رس، پیت، موسین، فسفات آمونیوم، آلبومین و اتیلن گلیکول به بیوسوپر را برای ماندگاری باکتری‌ها بی‌تأثیر گزارش کرد. Daza و همکاران (١٩٩٩) با بررسی ماندگاری باکتریهای همزیست لوبیا، سویا و باکتری باسیلوس مگاتریم برروی دو حامل پیت و پرلیت در دو حرارت ٤ و ٢٨ درجه سانتی‌گراد دریافتند که روند تغییرات همه باکتریها در دو حامل یکسان بوده ولی ماندگاری آنها در ٤°C به مراتب بیشتر از ٢°C می‌باشد. McInroy و همکاران (١٩٩٩) با نگهداری ریزوبیومهای همزیست درختان مناطق گرمسیری در سه حرارت ٧٠ – ٤ و ٢٥ درجه سانتی‌گراد در طی ٢٤ ماه مشاهده کردند که ماندگاری اکثر سویه‌ها در ٧٠ – و ٢٥ درجه سانتی‌گراد مشابه بوده و بیشتر از ٤ درجه سانتی‌گراد است.

فهرست منابع

١. بشارتی، ح. و ن. صالح راستین. ١٣٧٨. بررسی تأثیر کاربرد مایه تلقیح باکتریهای تیوباسیلوس همراه با گوگرد در افزایش قابلیت جذب فسفر. مجله علوم خاک و آب، جلد ١٣، شماره ١، موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.

2. Attoe, O.J., and R.A. Olson. 1966. Factors affecting the rate of oxidation of elemental sulfur and that added in rock-phosphate-sulfur fusion. Soil. Sci. 101: 317-24.
3. Borichewski, R.M. 1967. Keto acid as growth- limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bacteriol. 93:597-599.
4. Chapman, S. J. 1989. Oxidation of micronized elemental sulfur in soil. Plant and Soil. 116: 69-76.
5. Chapman, S. J. 1990. *Thiobacillus* populations in some agricultural soils. Soil Biol. Biochem. 22: 479-482.
6. Crawford, S. L., and D.L., Berryhill. 1983. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal – based legume inoculants applied to seeds. Environ. Microbiol. 45:703-705.
7. Daza, A., C. Santamaria, D. N. Rodriguez-Navarro, M. Camacho, R. Orive, and F. Temprano. 1999. Perlite as a carrier for bacterial inoculatns. Soil Biol. Biochem. 32:567-572.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Kaplan, M. and S. Orman. 1998. Effect of elemental sulfur and sulfur containing waste in a calcareous soil in Turkey. J. Plant Nutrition. 21(8): 1655-1665.
Khatri, A. A., M. Choksey, and E Dsilva. 1973. Rice husk as the medium for legume inoculants. Sci. cult 39:194-196.
9. Kilham, K. 1994. Soil Ecology. pp:141-150. Cambridye University Press.
10. McInroy, S. G., Machua, J., Obote, M., Ochieng, J., Odee, D. W., Sprent, J. I., and Sutherland, J. M. 1999. Storage and preservation of Rhizobia isolated from African acacias and other tropical trees. Kenya Forestry Research Institute, Kenya.
11. Modaihsh, S., W. A. Al-mustafa, and A. E. Metwally. 1989. Effect of elemental sulfur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils. Plant and Soil. 116:95-101.
Motsara, B. and S. Beena. 1995. Biofertilizer technology, marketing and usage. Fertilizer Development and Consulation Organization. New Delhi. India.
12. Nor, Y.M., and M.A. Tabatabai.1977.Oxidation of elemental sulfur in soils. Soil Sic. Am. J. 40:736-741.
13. Page, A.L., R.H. Miller, and D.K. Keeney. 1982. Methods of soil analysis. Part 2., chemical and microbiological properties, No.9, Madison, WI.
14. Pathirathna, L. S. S., U. P. De, S. Waidynatha, and O. S. Peries. 1989. The effect of apatite and elemental sulfur mixtures on growth and P content of *Centrocema pubescens.* Fertilizer Research. 21:37-43.
15. Philpotts, H. 1976. Filter mud as a carrier for *Rhizobium* inoculants. J. Appl. Bacteriol. 41: 277-281.
16. Rennie, R. J., and R.K. Hyness. 1993. Scientific and legislative quality control of legume inoculants for lentil and field pea. J. Prod. Agric. 6: 569-574.
17. Roughley, R.J. and J.M. Vincent. 1967. Growth and survival of *Rhizobium spp.* In peat culture. J. Appl. Bacteriol. 30(2):362-376.
18. Rupela, O. P. and P. Tauro. 1973. Utilization of *Thiobacillus* to reclaim alkali soil. Soil Boil. Biochem. 5:899-901.
19. Sholeh, R. D. B. Lefrog and G. J. Blair. 1997. Effect of nutrients and elemental sulfur particle size on elemental sulfur oxidation and the growth of *Thiobacillus thiooxidans*. Aust. J. Agric. Res 48:497 -501.
20. Smith, R. S. 1992. Legume inoculant formulation and application. Can. J. Microbiol. 38:485-492.
21. Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994. Hand book for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Springer –Verlag, New York.
22. Sparrow, S. D., and G. E Ham. 1983. Surrrival of *Rhizobium phsaeoli* in six carrier materials. Agron. J. 75:181-184.
23. Strijdom, B.W. and C.C. Deschodt. 1976. Carriers of *Rhizobia* and effects of prior treatment on the survival of *Rhizobia.* In : Nitrogen Fixation in Plants. pp:151-168. ed . Nutman, P.S. Cambridye University Press. London. England.
24. Swaby, R. J. 1975. Biosuper-Biological Superphophate. In sulfur in Australian Agriculture, (Ed. K. D. Mclachlan), Sydney University Press, Sydney.
25. Tisdale, S.L., Nelson, W. L., Beaton, J. D. and Havlin, J. L. 1993. Soil Fertility and Fertilizers. 5 th ed. Mcmillon publishing Co., New York
26. Wainwright, M. 1984. Sulfur oxidation in soils. Advances in Agronomy. 37:346-396.
27. Vishniac, W., and M. Santer. 1957. The *Thiobacilli.* Bacteriol. Rev. 21:195-213.

www.SID.ir