# بررسی جمعیت و تنوع باکتریهای اکسیدکنندهٔ گوگرد در چند خاک شور و شور سدیمی

**احمد گلچین**
دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه زنجان

## مقدمه

کاربرد مواد شیمیایی گوناگون از جمله گوگرد و مشتقات آن برای اصلاح خواص فیزیکوشیمیایی خاک حدوداً از سال ۱۹۲۰ و عمدتاً در ایالات متحده آمریکا و شوروی سابق آغاز گردیده و روز بروز بر میزان مصرف آن افزوده شده است. بطوریکه امروز استفاده از گوگرد در کشاورزی رقم قابل توجهی از کل مصرف جهانی گوگرد را شامل می‌شود. گوگرد در تهیه آفت کش ها، کودهای شیمیایی و همچنین به عنوان یک ماده اصلاحی برای تعدیل واکنش خاک کاربرد داشته و در مناطق خشک و نیمه خشک جهان بطور گسترده ای برای اصلاح خواص فیزیکوشیمیایی خاکهای سدیمی و شور - سدیمی و افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی کم مصرف و فسفر مصرف می شود. تحقیقات انجام شده در مناطق مختلف ایران نیز نشان میدهد که کاربرد گوگرد در اراضی سدیمی و شور - سدیمی استانهای آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، گلستان، قزوین، خراسان، اصفهان و مازندران نتایج مثبتی دربرداشته است (مهاجر میلانی، ۱۳۷۹). در کشورما، وجود منابع عظیم نفت و گاز داخلی با درصد نسبتاً بالای گوگرد، باعث شده تا حجم زیاد گوگرد بدست آمده از پالایش مسائل و مشکلات زیادی را بوجود آورد. ناچیز بودن مصارف داخلی گوگرد در مقایسه با تولید انبوه آن از یک طرف و پایین بودن قیمت صادراتی آن از طرف دیگر نیاز به یافتن کاربردهای جدید برای این ماده را بوضوح نشان می دهد. با توجه به وجود ۲۵ میلیون هکتار اراضی شور وقلیا در کشور، بالابودن میزان آهک خاکهای ایران و فراوانی گوگرد در مملکت، مصرف این ماده در خاک نه تنها باعث اصلاح خواص خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می گردد، بلکه موجبات افزایش راندمان کودهای کم مصرف و فسفره را نیز فراهم می آورد (بشارتی و صالح راستین، ۱۳۷۸). از آنجا که خاصیت اصلاحی گوگرد در خاک منوط است به اکسیده شدن آن به اسید سولفوریک، لذا آگاهی از چگونگی اکسیداسیون این ماده در خاکهای کشورمان و همچنین آگاهی از وجود و نوع باکتریهای اکسید کننده و عوامل موثر بر اکسیداسیون می تواند اولین گام در جهت بکارگیری این ماده در زمینه اصلاح خاک، کاهش pH ، تغذیه گیاهی و افزایش حاصلخیزی خاک باشد. اهداف این آزمایش عبارت بودند از :

- تعیین جمعیت و انواع باکتریهای اکسید کننده گوگرد در خاکهای شور و شور ـ سدیمی
- بررسی‌تأثیرمقدار وفرم‌گوگرد مصرفی برجمعیت باکتریهای اکسیدکننده گوگرد، میزان‌سولفات‌تولیدشده وکاهش pH خاک

## مواد و روشها

### ۱- مناطق مورد نمونه برداری و نحوه تهیه نمونه خاک برای مطالعه میکروبی

چون هدف این تحقیق بررسی اکسیداسیون بیولوژیک گوگرددر خاکهای شور و شور و قلیا بود، لذا از خاکهای شور و شور و قلیا مناطق مختلف کشور نمونه برداری بعمل آمد. به لحاظ تاثیر عوامل محیطی بر جمعیت و تنوع میکروبی در خاک، مناطق نمونه برداری طوری انتخاب گردیدند که تنوع آب و هوایی وجود داشته باشد. برای این منظور مناطق تبریز، همدان، اهواز، قزوین، ورامین و اشتهارد برای نمونه برداری انتخاب گردیدند. نمونه ها از خاک سطحی (۰ تا۳۰ سانتیمتری) وبا اگر استریل و از ده نقطه تهیه و پس از مخلوط کردن ده نمونه فرعی با یکدیگر، یک نمونه اصلی تهیه گردید. نمونه های یکنواخت شده در کیسه های پلاستیکی در بسته سریعاً به آزمایشگاه منتقل و از الک دو میلیمتری استریل گذرانده شدند. یک قسمت ازهر نمونه جهت مطالعه میکروبی با همان رطوبت اولیه در کیسه پلاستیکی استریل ریخته شد و برای جلوگیری از تغییرات کمی و کیفی ناخواسته در جامعه میکروبی و کاهش فعالیت حیاتی آنها در یخچال (حرارت۴ درجه سانتیگراد) قرارداده شد و قسمت دیگر بعد از خشک شدن در هوای اطاق برای انجام آزمایشات فیزیکی و شیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. خصوصیات فیزیکی و

شیمیایی خاکهای مورد مطالعه شامل هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک، pH گل اشباع، ظرفیت تبادل کاتیونی، بافت، میزان کربنات کلسیم معادل، و میزان رطوبت خاک درحالت ظرفیت مزرعه با روشهای متداول در موسسه تحقیقات خاک و آب ( علی احیایی، ۱۳۷۳) اندازه گیری شد.

۲- تعیین تعداد باکتریهای اکسید کننده گوگرد

به منظور اطلاع از تراکم جمعیت باکتریهای اکسید کننده گوگرد در خاکهای مورد مطالعه شمارش دو گروه اصلی این باکتریها (انواع اتوتروف و هتروتروف) با روشMPN انجام گردید.

محیط غذایی مورد استفاده در شمارش باکتریهای اتوتروف اکسید کننده گوگرد محیط پوشن و تاردیو بود و همین محیط به اضافه یک گرم در لیتر باکتوپپتون برای شمارش باکتریهای هتروتروف مورد استفاده قرار گرفت. محیط ها پس از تهیه در لوله‌های آزمایش به میزان ۵ میلی لیتر برای هر لوله توزیع و در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد استریل گردیدند. قبل از کشت میکروبی به هر لوله حاوی محیط غذائی استریل حدود ۵۰ میلی گرم گل گوگرد در شرایط استریل (جلو شعله) اضافه شد.

با توجه به اینکه معمولاً باکتریهای هتروتروف جمعیت بیشتری نسبت به باکتریهای اتوتروف دارند رقت سوسپانسیون های خاک بکار رفته برای تلقیح محیط های غذایی برای باکتریهای هتروتروف $10^{-1}$ تا $10^{-8}$ و برای باکتریهای اتوتروف $10^{-1}$ تا $10^{-5}$ در نظر گرفته شد. با توجه به نقش عمده و تعیین کننده ای که تهیه دقیق سوسپانسیون های رقیق شده خاک در شمارش میکروبی دارد این عمل در سه تکرار صورت پذیرفت. برای هر رقت و هر نوع باکتری سه لوله آزمایش محتوی محیط غذایی تلقیح و انکوباسیون لوله های تلقیح شده در حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد بمدت ۳ هفته انجام گرفت. پس از اتمام دورهٔ انکوباسیون تعداد لوله های مثبت یعنی لوله هایی که رویش میکروبی در آنها بصورت تولید سولفات ظاهر شده بود شمارش گردیدند. از آنجا که محیط کشت مورد استفاده حاوی گوگرد عنصری بوده است، پیدا شدن سولفات در محیط تلقیح شده دال بر عمل اکسیداسیون و وجود باکتری اکسید کننده در آن محیط می باشد. وجود سولفات در محیط کشت بکمک اسیدی کردن محیط و اضافه کردن کلروباریم و تشکیل سولفات باریم و کدر شدن محیط صورت گرفت. پس از شمارش تعداد لوله های مثبت مربوط به هر رقت، عدد مشخص کننده حاصل از رقت های نهایی مثبت را تعیین و به کمک جدول مربوطه تعداد باکتریهای اکسید کننده در یک گرم خاک مورد آزمایش محاسبه گردید.

۳- شناسایی باکتریهای اکسید کننده گوگرد

علاوه برتعیین تعداد کل باکتریهای اکسید کننده گوگرد، بررسیهائی نیزدر جهت مشخص کردن گونه های اصلی اکسید کننده گوگرد انجام گرفت. از آنجا که گونه های باکتری متعدد و از لحاظ شباهت خیلی بهم نزدیک هستند جداسازی آنها از خاک غالباً بر اساس خصوصیتهای فیزیولوژیک اختصاصی صورت می گیرد. بهمین دلیل جداسازی بر روی محیط های کشت اختصاصی که فقط گروه مورد نظر قادر به رویش در آن بود انجام گرفت. قبل از کشت روی محیط اختصاصی، از یک محیط غنی کننده بمنظور افزایش تراکم نسبی و تعداد باکتریهای اکسید کننده نیز استفاده گردید. این امر باعث شد تا جدا سازی گونه ها روی محیط های اختصاصی با سهولت بیشتری انجام پذیرد. استفاده از روش فوق برای جداسازی و شناسایی گونه های اتوتروف اکسید کننده گوگرد بخوبی امکان پذیراست زیرا استفاده از محیط های کشت فاقد ماده آلی که در آنها فقط از گوگرد و یا تیوسولفات بعنوان منبع تامین انرژی استفاده می شود از رشد سایر گونه های میکروبی مخصوصاً انواع هتروتروف جلوگیری بعمل می آورد (Collins,1969). برای رشد اکثر باکتریهای اتوتروف اکسید کننده گوگرد جنس تیوباسیلوس از محیط ویشنیاک و سانتر(Vishniac and Santer) بعنوان محیط غنی‌کننده پایه استفاده گردید و pH این محیط بسته به نوع گونه مورد نظر بصورت متفاوت تنظیم گردید. جهت تکثیر باکتریهای هتروتروف اکسیدکننده گوگرد همین محیط که به نسبت یک گرم در لیتر به آن باکتوپپتون اضافه شده بود استفاده گردید. برای جداسازی گونه‌های مختلف تیوباسیلوس از محیطهای غذایی ویشنیاک و انترو پوستگیت بعنوان محیطهای اختصاصی استفاده گردید(Kelly and Harrison, 1989). برای جداسازی باکتریهای هتروتروف اکسید کننده گوگرد نیز از محیط ویشنیاک و سانتر که به آن باکتوپپتون به نسبت یک گرم در لیتر و باکتوآگار به نسبت ۱۵ گرم در لیتر اضافه شده بود استفاده گردید. علاوه بر استفاده از محیط های اختصاصی،

بررسیهایی میکرسکوپی شامل مطالعه شکل، اندازه و ترتیب سلولهای باکتری، رنگ‌آمیزی گرم، تحرک نیز بمنظور تکمیل کلید شناسایی انجام گرفت (Kuenen and Tuovinen, 1981).

## نتایج و بحث

۱- نتایج بدست آمده از شمارش میکروبی

شمارش دو گروه اصلی باکتریهای اکسید کننده گوگرد (اتوتروف و هتروتروف) قبل و بعد از انکوباسیون نشان داد که هر دو گروه اکسید کننده در خاکهای مورد مطالعه وجود داشته و تعداد باکتریهای اتوتروف اکسید کننده از ۴۰ عدد در هر گرم خاک اشتهارد تا ۱۰۲۱ عدد در هر گرم خاک همدان متغیر است. تعداد باکتریهای هتروتروف اکسید کننده گوگرد بمراتب بیشتر از باکتریهای اتو تروف بوده و تعداد آنها از $۶/۱۸\times۱۰^{3}$ عدد در یک گرم خاک همدان تا $۸/۱۵\times۱۰^{5}$ عدد در هر گرم خاک اشتهارد متغیر است. بطوریکه ملاحظه شد خاک اشتهارد دارای کمترین تعداد باکتری اتوتروف و بیشترین باکتری هتروتروف اکسید کننده است و در مقابل خاک همدان دارای بیشترین تعداد باکتری اتوتروف و کمترین باکتری هتروتروف اکسید کننده گوگرد می باشد. با توجه به شرایط نا مطلوب (شوری، pH و سدیم تبادلی بالا) خاکهای مورد مطالعه مخصوصاً خاک همدان، بنظر میرسد که باکتریهای اکسید کننده گوگرد از قدرت سازگاری خوبی برخوردار باشند. نتایج بدست آمده از شمارش باکتریهای اکسید کننده گوگرد (اتوتروف و هتروتروف) بعد از انکوباسیون حاکی از افزایش جمعیت این باکتریها است. این نتایج نشان داد که حرارت و رطوبت مناسب حتی بدون اضافه کردن گوگرد باعث بالا رفتن جمعیت این باکتریها در خاک می شود. تعداد باکتریهای اتو تروف بعد از انکوباسیون در مقایسه با قبل از انکوباسیون (بجز خاک همدان) حدوداً ۱۰۰۰ مرتبه افزایش نشان میدهد در صورتیکه تعداد باکتریهای هتروتروف اکسید کننده گوگرد فقط ۱۰ برابر افزایش یافته است. با توجه به اینکه نمونه برداری از خاکهای مورد مطالعه در فصل تابستان صورت گرفت و حرارت لازم برای رشد و تکثیر باکتریها در این فصل فراهم است، بنظر می رسد که عامل محدود کننده رشد و تکثیر آنها رطوبت بوده است. تاثیر کمتر خشکی بر جمعیت باکتریهای هتروتروف را شاید بتوان مقاومت بیشتر این دسته در برابر شرایط نامناسب محیطی بوسیله تشکیل اسپر یا سایر مکانیزمهای دفاعی دانست. افزایش گوگرد به خاک نیز باعث افزایش سریع جمعیت باکتریهای اکسید کننده گوگرد در خاک گردید. جمعیت باکتریهای اتوتروف اکسید کننده گوگرد در خاکهای اشتهارد و همدان حدود ۱۰۰ برابر نسبت به نمونه های بدون گوگرد افزایش یافته است. در صورتی که این افزایش برای باکتریهای هتروتروف نزدیک به ۱۰ برابر است. علت این امر را شاید بتوان اینطور بیان کرد که اهمیت گوگرد در زندگی باکتریهای هتروتروف به اندازه اهمیت آن برای باکتریهای اتو تروف اکسید کننده گوگرد نبوده و این دسته به ماده آلی به عنوان منبع کربن و انرژی محتاج است. تفاوت چندانی بین جمعیت باکتریهای اکسید کننده گوگرد در دو سطح گوگرد بکار رفته (۰/۲۵ و۰/۵ درصد) مشاهده نگردید (جدول شماره ۳). شمارش باکتریهای کل خاک قبل و بعد از اضافه کردن گوگرد به خاک نشان داد که مصرف گوگرد در دو سطح ۰/۲۵ و۰/۵ درصد تاثیر چندانی بر کل جمعیت باکتریهای خاک ندارد.

۲- نتایج بدست آمده از مطالعه انواع

الف) باکتریهای اتوتروف

- گونه تیوپاروس: ظهور کلنی های گرد کوچک به قطر ۱ تا ۲ میلی متر و به رنگ زرد مایل به سفید روی محیط پایه ویشنیاک و سانتر جامد و بررسیهای میکروسکوپی از قبیل مطالعه مورفولوژیک باکتری و همچنین مطالعه نحوه رشد، تشکیل پرده سطحی و میزان تنزلpH محیط کشت وجود این گونه را در تمام خاکهای مورد مطالعه تایید میکند.
- گونه دنیتریفیکانس : تغییر رنگ محیط اختصاصی بکار رفته برای این گونه (پوستگیت) از آبی به زرد به دلیل کاهش pH و تجمع حبابهای گاز در لوله دورهام در اثر احیای نیترات به گاز ازت در نمونه خاکهای اشتهارد،تبریز، اهواز، قزوین و ورامین و تطبیق نتایج بدست آمده از مطالعه مورفولوژی کلنی و سلول باکتری با خصوصیات این گونه وجود این باکتری را درنمونه های ذکر شده تایید می کند. هیچ گونه تغییر رنگ محیط یا تشکیل حباب گاز که دلالت بر وجود این گونه داشته باشد در نمونه خاک همدان دیده نشد و بنابراین می توان گفت که این نمونه فاقد گونه دنیتریفیکانس است.

رشد سوش نمونه ورامین در محیط اختصاصی بسیار کند و مدت زمان لازم برای تغییر رنگ محیط طولانی تر از سایر نمونه‌ها بود.

- گونه تیواکسیدانس: عدم تغییر رنگ محیط اختصاصی بکار رفته برای این گونه (ویشنیاک و سانتر) از بنفش به زرد که نشانه تنزلpH محیط به کمتر از ۳ می باشد فقدان این گونه را در کلیه نمونه های مورد مطالعه نشان میدهد. دلیل عدم وجود این باکتری را شاید بتوان pH قلیایی و شرایط نامناسب خاکها از لحاظ pH دانست زیرا pH مناسب برای این گونه ۲ تا ۳/۵ است و در pH بالای ۶ بکندی رشد میکند.
- گونه فرواکسیدانس: نشانه رشد گونه فرواکسیدانس در روی محیط اختصاصی حاوی املاح فرو تغییر رنگ محیط از حالت شفاف به رنگ زرد مایل به نارنجی کدر و گاهی قهوه ای مایل به قرمز است. عدم تغییر رنگ محیط اختصاصی بکار رفته (پوستگیت،9k) برای این گونه فقدان این باکتری را در نمونه خاکهای مورد مطالعه تائید می کند. شرایط نامناسب خاکها، بخصوصpH را می توان دلیل عدم وجود این گونه در نمونه خاکهای مورد مطالعه دانست.

ب- باکتریهای هتروتروف اکسید کننده گوگرد

گونه های هتروتروف اکسید کننده گوگرد بسیار متنوع و از لحاظ رده بندی متعلق به خانواده و جنس های بسیار متفاوتی از باکتریها هستند و بهمین دلیل شناسایی آنها بسیار مشکل و وقت گیر است. بعد از مطالعه معیارهای مورفولوژیک و بسیاری از خصوصیات فیزیولوژیک و فعالیتهای بیوشیمیایی این باکتریها و انطباق آنها با کلید شناسایی، جنس های باسیلوس، پسودوموناس و میکروکوکوس درنمونه خاکهای مورد مطالعه تشخیص داده شدند.

**منابع مورد استفاده**

۱- مهاجر میلانی، پرویز. ۱۳۷۹. مروری بر تحقیقات کاربرد گوگرد و مشتقات آن در موسسه تحقیقات خاک و آب. ماهنامه علمی تخصصی کشاورزی زیتون، شماره ۱۴۲،۲۳- ۲۸.

۲- علی احیایی، مریم. ۱۳۷۳. شرح روشهای تجربه شیمیایی خاک. نشریه فنی شماره ۸۹۳ موسسه تحقیقات خاک و آب.

۳- بشارتی، حسین و ناهید صالح راستین. ۱۳۷۸. بررسی تاثیر کاربرد مایه تلفیح باکتریهای تیوباسیلوس همراه با گوگرد در افزایش قابلیت جذب فسفر. مجله علوم خاک و آب، جلد ۱۳، شماره ۱،۲۳- ۳۹.

4- Aaronson, S. 1970. Experimental Microbial Ecology. Academic Press. New york.

5- Collins, V.G. 1969. Isolating, cultivation and maintenance of autotrophs. Methods in Microbiol. 3B: 1 32.

6- Kelly, D.P. and A.P. Harrison. 1989. Thiobacillus, p. 1842 1858 In J. T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (Ed) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

7- Kuenen, J. G. and D. H. Tuovinen. 1981. p. 1023 1036 In M.P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel (Ed) The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Idendification of Bacteria. Springer, Verlag, New york.