پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

تأثیر لوریل بنزن سولفونات برجمعیت باکتری‌های گرم منفی خاک

معصومه مصطفائی خروانق[۱]، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، شاهین اوستان[۳]
به ترتیب، کارشناس ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

سالانه مقادیر زیادی از سورفکتانت‌هااز طریق آبیاری مزارع وارد اکوسیستم خاک می‌شود در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف سورفکتانت لوریل بنزن سولفونات (LBS) بر فراوانی باکتری‌های گرم منفی در یک نمونه خاک بررسی شد. برای این منظور سطوح مختلف LBS شامل ۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵و ۱ درصد به گلدان‌های حاوی ۲ کیلوگرم خاک در ۳ تکرار اعمال شد و به مدت ۹۰ روز در رطوبت ۶۵ تا ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباسیون گردید. فراوانی باکتری‌های گرم منفی با کشت میکروبی در محیط کشت مخصوص باکتری‌های گرم منفی(ائوزین متیلن بلو) و شمارش کلنی به دست آمد.طبق نتایج ، با افزایش غلظت LBS به بیش از ۰/۰۵، جمعیت باکتری‌های گرم منفی حدود ۷۳ درصد کاهش یافت. همچنین جمعیت باکتری‌های گرم منفی در سطوح مختلفLBSدر سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت.

واژه‌های کلیدی: سورفکتانت، لوریل بنزن سولفونات، باکتری‌های گرم منفی ،ائوزین متیلن بلو

مقدمه

امروزه آلودگی خاک با آلاینده‌های آلی به یک موضوع مهم در سراسر جهان تبدیل شده است (زنگ و زو؛۲۰۰۴). سورفکتانت‌ها به دلیل استفاده گسترده در پاک‌کننده‌ها، فرآیندهای صنعتی و فرمولاسیون آفت‌کش‌ها به عنوان یکی از آلاینده‌های معمول خاک در نظر گرفته می‌شوند (جیا و اویانگ؛۲۰۰۵). آلکیل بنزن سولفونات خطی (LAS) یک سورفکتانت آنیونی با فرمول $R-ph-SO_3$ می‌باشد، گروه R یک آلکیل با ۱۴-۱۰ کربن است و گروه فنیل می‌تواند از طریق کربن نوع دوم به زنجیره R متصل شود و ایزومرهای مختلفی را ایجاد نماید. یکی از پرکاربردترین سورفکتانت‌هایی که در ساختار پاک‌کننده‌های تجاری استفاده می‌شود لوریل بنزن سولفونات(LBS) است که یک سورفکتانت مصنوعی با زنجیره هیدروکربن ۱۲ کربنه می‌باشد (یوکسل و همکاران؛۲۰۰۹). مصرف سالانه LAS در سراسر جهان بیش از چند هزار تن در سال است. بنابراین ممکن است این ماده در غلظت‌های بسیار بالا در لجن فاضلاب‌ها یافت شده و از این طریق وارد اکوسیستم خاک شود.

میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی در فرآیندهای اکوسیستم خاک مانند تجزیه و چرخه عناصر غذایی دارند (بلوم و برور؛۲۰۰۳). این جوامع میکروبی نسبت به آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین (گیلر و همکاران؛۱۹۹۸) و برخی از آلاینده‌های آلی (وان بلو همکاران؛۲۰۰۳) بسیار حساس هستند و خیلی سریع نسبت به آلاینده‌های زیست محیطی واکنش نشان می‌دهند. بسیاری از باکتری‌های مطرح در فرآیندهای زیستی خاک مخصوصاً چرخه عناصر غذایی از نوع گرم منفی هستند مانند *Rhizobium*و *Azotobacter*که در تثبیت نیتروژن نقش دارند. یا گونه‌های مختلف*Pseudomonas*و*Bacillus*که در انحلال ترکیبات کم محلول و تامین سایر عناصر غذائی نقش بسزائی ایفا می‌کنند.

در مطالعه‌ای اثر تیمارآلکیل بنزن سولفونات (LAS) بر رشد و بقا میکروارگانیسم‌ها نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت خاک نسبت به باکتری‌های گرم منفی به LAS افزوده شده مقاوم‌تر هستند(لی؛۱۹۷۰). در تحقیق ذیگری با استفاده از تکنیک آنالیز الگوهای اسیدچرب فسفولیپیدی غشای سلولی، مشخص شد که سورفکتانت‌های کاتیونی باکتری‌های گرم منفی را بیشتر از باکتری-های گرم مثبت تحت تأثیر قرار می‌دهند (سارکار و همکاران؛۲۰۰۹). السگارد و همکاران(۲۰۰۱) گزارش کرد هر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی خاک تحت تأثیر LAS قرار می‌گیرند. در آزمایش دیگری گزارش شد که فقط باکتری‌های گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی با سورفکتانت‌های آنیونی مهار می‌شوند (جنسن و همکاران؛۲۰۰۱).

در تحقیق حاضر تأثیر سورفکتانت لوریل بنزن سولفونات (LBS) که نوعی سورفکتانت آنیونی است بر فراوانی باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

خاک مورد آزمایش از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان تبریز از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شد. پس از هوا خشک شدن برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی شامل بافت، pH و ECدر عصاره اشباع ، درصد کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون، درصد ماده آلی به روش والکلی- بلک (جیا و اویانگ؛۲۰۰۵)اندازه‌گیری شد. میزان رطوبت ظرفیت مزرعه(FC) با استفاده از دستگاه صفحه فشار تعیین شد.

مقدار ۲ کیلوگرم خاک عبور داده شده از الک چهار میلی متر در هر یک از گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد، رطوبت خاک به ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای(FC) رسانده شده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباسیون گردید. مقادیر مختلف محلول سورفکتانت لوریل بنزن سولفونات (LBS) شامل ۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵و ۱ درصد وزنی پس از تنظیم pH در ۷، در ۳ تکرار به خاک اضافه شده و به مدت ۹۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۵ تا ۷۵ درصد وزنی (معادل ۱۰- کیلوپاسکال) انکوباسیون شد (دیاز راوینا و بت؛۱۹۹۶).

برای شمارش جمعیت باکتری‌های گرم منفی ، رقت‌های$^{-2}$۱۰ تا $^{-6}$ ۱۰ از خاک تهیه شدند (علی اصغرزاد؛۱۳۸۵) و سه رقت $^{-4}$ ۱۰، $^{-5}$۱۰ و $^{-6}$ ۱۰ انتخاب شد. برای هر رقت یک پتری‌دیش (در ۳ تکرار) حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های گرم منفی، ائوزین متیلن بلو[1] انتخاب شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. برای تهیه محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو از ۱۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم لاکتوز، ۲ گرم K_2HPO_4، ۰/۴ گرم ائوزین، ۰/۰۶۵ گرم متیلن بلو و ۱۵ گرم در لیتر آگار بعد از تنظیم pH روی ۶/۴ تا ۷/۳ استفاده شد. از رنگ‌های ائوزین و متیلن بلو برای ممانعت از رشد باکتری‌های گرم مثبت استفاده شد، این رنگ‌ها همچنین در pHاسیدی با هم ترکیب شده و ایجاد رسوب می‌نمایند، بنابراین می‌توان از وجود آنها به عنوان شاخصی جهت تخمیر لاکتوز و تولید اسید نیز استفاده نمود. شمارش کلنی‌ها ۳ روز پس از کشت انجام گرفت. تحقیق حاضر به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی با تیمار LBSدر شش سطح ۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد با ۳ تکرار انجام گردید. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین توسط نرم افزارهای SPSSو MSTATC انجام گرفته و نمودارها به وسیله نرم افزارهایExcelرسم گردید.

نتایج و بحث

برخی ویژگی های شیمیایی و فیزیکی خاک مورد آزمایش در جدول ۱ نشان داده می‌شود.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

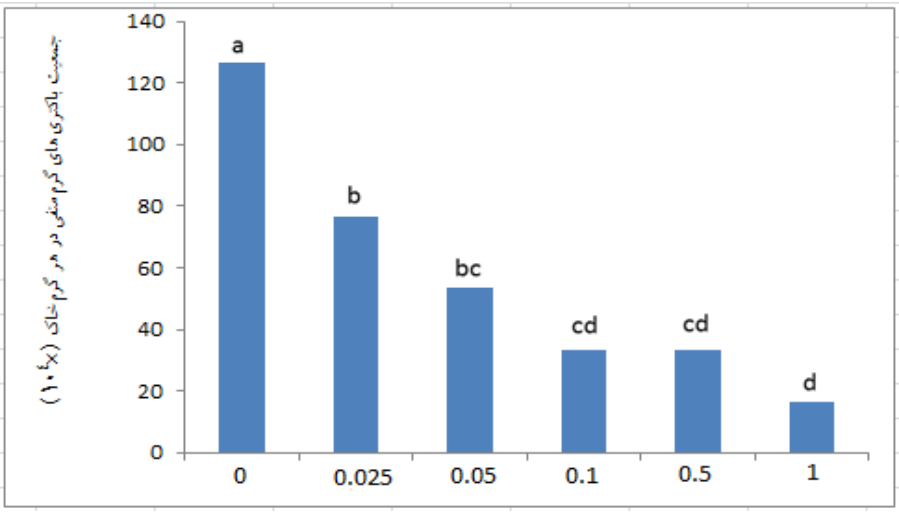
pH	EC(dS/m)	کربنات کلسیم معادل (٪)	کربن آلی (٪)	بافت
۸/۱۳	۰/۶۲۴	۹/۲	۰/۱۹۵	لوم شنی

جمعیت باکتری‌های گرم منفی در هریک از تیمارها در شکل(۱)نشان داده شده است. بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) جمعیت باکتری‌های گرم منفی در سطوح مختلف LBSدر سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار دارد.

[1]-Eosin - methylene blue

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس شمارش باکتری‌های گرم منفی در خاک در روز۹۰

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
سطوح LBS	۵	۴۸۰۰**
خطا	۱۲	۱۰۰
ضریب تغییرات	٪۱۷/۶۵	



شکل۱- جمعیت باکتری‌های گرم منفی خاک در سطوح مختلف LBSدر انتهای آزمایش (روز۹۰)

طبق شکل (۱) با افزایش غلظت LBSجمعیت باکتری‌های گرم منفی در خاک کاهش می‌یابد. مقایسه میانگین در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان داد که جمعیت باکتری‌های گرم منفی خاک در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار دارد. همچنین میان ۰/۰۲۵ درصد LBSبا سطوح ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ درصد LBSو سطح ۰/۰۵ درصد با سطح ۱ درصد LBSاختلاف معنی‌دار مشاهده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت LBSبه بیش از ۰/۰۵ درصد جمعیت باکتری‌های گرم منفی به مقدار قابل ملاحظه‌ای (حدود ۷۳ درصد) در مقایسه با شاهد، کاهش یافت.

اولین اثر سورفکتانت‌ها بر میکروارگانیسم‌های خاک تخریب دیواره سلولی آنهاست که به دنبال آن میکروب از بین می‌رود. ترکیب دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی با باکتری‌های گرم مثبت متفاوت است. میزان لیپیدهای موجود در دیواره باکتری‌های گرم منفی بیشتر از گرم مثبت است، بنابراین تأثیری که سورفکتانت بر دیواره باکتری‌های گرم منفی می‌گذارد بیشتر خواهد بود. در واقع سورفکتانت، چربی موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی را در خود حل کرده و موجب لیز شدن دیواره سلولی آن و در نهایت مرگ باکتری می‌شود، پس طبیعی است که با افزایش سطوح LBSاز فراوانی باکتری‌های گرم منفی کاسته شود. ویلک(۱۹۹۷) بیان کرد که باکتری‌های گرم منفی موجود در خاک نسبت به LASاضافه شده به خاک حساس‌تر هستند. نای (۲۰۱۴) گزارش کرد جمعیت باکتری‌های گرم منفی خاک با افزودن علف‌کش (گلیفوسیت) حاوی سورفکتانت در تمام طول دوره انکوباسیون کاهش پیدا کرد. در رابطه با تأثیر سورفکتانت بر فراوانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نتایج متناقضی گزارش شده است. در تحقیق حاضر اثر منفی سورفکتانت LBSبر باکتری‌های گرم منفی کاملاً مشخص است. برای اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده بهتر است از

روش‌های پیشرفته‌تر مانند آنالیز الگوهای اسیدچرب فسفولیپیدی غشای سلولی، الکتروفورز ژل دارای شیب واسرشتگیو روش‌های دیگر برای ارزیابی آلاینده‌ها بر جوامع میکروبی خاک استفاده شود.

منابع

علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روش‌های آزمایشگاهی در بیولوژی خاک (ترجمه). چاپ اول. انتشارات دانشگاه تبریز.

Bloem J. and Breure A.M. 2003.Microbial indicators. In: Markert BA, BreureAM,Zechmeister HG (eds) Bioindicators and biomonitors. Elsevier, Amsterdam.6: 259-282.

Diaz-RavinaM.andBååth E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterialcommunities exposed to experimentally increase metal levels. Applied and Environmental Microbiology. 62:2970–2977.

Elsgaard L., Petersen S.O., Debosz K., and Kristiansen, I.B. 2001a. Effects of linearalkyl benzene sulfonates (LAS) on soil microbiology.Tenside Surfactants Detergents. 38: 94–97.

Giller K., Witter E. and McGrath, SP. 1998.Toxicity of heavy metals tomicroorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. SoilBiology and Biochemistry. 30:1389-1414.

Jensen J., Løkke, H., Holmstrup M., Krogh P.H. and Elsgaard L 2001. Effects andrisk assessment of linear alkyl benzene sulfonates in agricultural soil.5.Probabilistic risk assessment of linear alkyl benzene sulfonates in sludge-amendedsoils. Environmental Toxicology and Chemistry. 20: 1690–1697.

Jia L.Q., Ou Z.Q. and Ouyang, Z.Y. 2005. Ecological behavior of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in soil–plant systems.Pedosphere. 15: 216–224.

Lee BKH.1970. The effect of anionic and non-ionic detergents on soil microfungi.Canadian Journal of Botany.48:583-589.

LoeppertRH., Suarez GL., 1996. Chemical Methods. Pp: 437-474. In: Sparks DL (ed.) Methods of Soil Analysis, Part 3. SSSA, Medison Wisconsin.

Nye M., Hoilett N., Ramsie, c., Renz P., and Dick R.P, 2014. Microbial community structure in soils amended with glyphosate-tolerant soybean residue.Applied Ecology and Environmental Sciences.2: 74-81.

Van Beelen P., Verbruggen EMJ. andPeijnenburg WJGM. 2003. The evaluation of theequilibrium partitioning method using sensitivity distributions of species in waterandsoil. Chemosphere 52:1153-1162.

Wilke B-M. 1997. Effects of non-pesticide organic pollutants on soil microbialactivity. Advances in GeoEcology.30:117-132.

The effects of lauryl benzene sulfonate on Gram-negative bacterial population in soil

M. Mostafaie Kharvanag[1], N. Aliasgharzad[2], S. Oustan[3]

M.Sc. Graduate, Professor and Associate Prof respectively, Dept. of Soil Science and Engineering, University of Tabriz

Abstract

The high amounts of surfactants were annually entered to the soil ecosystems through irrigation with wastewater. In this study the impact of different levels of lauryl benzene sulfonate (LBS) on Gram-negative bacteria population in soil were evaluated, For this purpose, different levels of LBS including 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 and the 1% (w/w) were added to the pots containing 2 kg of soil with three replications and kept at 65 to 75% of field capacity soil moisture and 25 ° C temperature for 90 days. The frequency of Gram-negative bacteriawas determined using plate count in a selective culture medium (eosin methylene blue).The results showed the Gram-negative bacterial population was significantly reduced by enhancement of LBS concentration and incubation period. Gram-negative bacterial population was declined by 73% as the LBS concentration was raised up to 0.05%. Moreover, different levels of LBS had significantly different impacts on Gram negative bacterial counts ($p<0.01$).

Keywords: surfactant, lauryl benzene sulfonate, Gram-negative bacteria and eosin methylene blue