مقایسه کارآیی چند ماده حامل باکتری *Sinorhizobium meliloti* برای تولید مایه تلقیح یونجه

شکرا... مشهدی اصغری و ناصر علی اصغرزاده [۱]

چکیده

معروف‌ترین و رایج‌ترین ماده حامل باکتری‌های ریزوبیومی، پیت می‌باشد که متأسفانه معادن وسیع قابل بهره‌برداری در ایران ندارد. به همین دلیل این پژوهش با هدف جایگزینی پیت با مواد ارزان قیمت داخلی برای تولید مایه تلقیح یونجه صورت گرفت. در این بررسی، چندین ماده از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مطلوب برای یک ماده حامل مورد مقایسه قرار گرفتند و توان ماندگاری Sinorhizobium meliloti روی مواد و مخلوط‌های انتخاب شده که عبارت بودند از : ۱- پیت(شاهد) ۲- ورمی کمپوست ۳- ماده زائد بیولوژیکی (BFW) ۴- ورمیکولیت+ ورمی کمپوست (۱:۱) ۵- ورمیکولیت + BFW (۱:۱) در مدت شش ماه نگه‌داری در دمای ۴ºC مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین به منظور بررسی اثر رطوبت حامل بر روی ماندگاری باکتری، دو سطح پتانسیل ماتریک شامل ۱۰- و ۳۰- کیلو پاسکال در حامل‌ها اعمال گردید.

بر اساس نتایج به دست آمده، حامل ورمیکولیت + BFW (۱:۱) نسبت به سایر حامل‌ها، بهترین پاسخ را نشان داد و توانست توان گره‌زایی باکتری روی ریشه یونجه را نیز تا پایان ماه ششم در خود حفظ نماید. حامل BFW گرچه توانست در طی شش ماه، تعداد باکتری را در در سطح بالاتری نسبت به حامل مخلوط نگه‌داری کند ولی به علت اثر منفی بر روی رشد گیاه میزبان، نمی‌تواند به‌عنوان یک حامل مناسب معرفی گردد. در این بررسی تعداد باکتری نگه‌داری شده روی اکثر حامل‌ها در پتانسیل ماتریک ۳۰- بیشتر از ۱۰- کیلوپاسکال بود.

واژه‌های کلیدی: ***حامل‌های باکتری، مایه تلقیح، سینوریزوبیوم ملیلوتی، پتانسیل ماتریک، یونجه***

مقدمه

به منظور حفظ محیط زیست و نیل به کشاورزی پایدار، استفاده از پتانسیل‌های بیولوژیک برای کاهش مصرف کودهای ازته در اراضی زیر کشت لگومینوزها ضروری است. وارد نمودن باکتری به صورت مستقیم و یا سوسپانسیون در خاک مقدور نبوده و اصولاً به همراه یک ماده حامل انجام می‌گیرد. ماده حامل، ضمن حفظ جمعیت قابل قبول از باکتری، باید وسیله‌ای برای عرضه باکتری به سطح بذر یا ریزوسفر گیاه باشد.حامل باکتری (Bacterial carrier) به ماده جامد، مایع یا نیمه جامدی اطلاق می‌شود که قادر است جمعیت مشخصی از باکتری مورد نظر را در مدت معین، در خود حفظ کند. یک حامل خوب باید دارای ویژگی‌های زیر باشد:

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

۱- ظرفیت نگه‌داری آب بالا ۲- بدون حالت خمیری یا چسبندگی ، همراه با شرایط تهویه‌ای مناسب ۳- بدون ایجاد حرارت در هنگام خیس شدن ۴- بدون ترکیبات سمی برای باکتری وگیاه ۵- pH تقریباً خنثی یا قابل تنظیم ۶- قادر به تأمین عناصر غذایی ۷- قابل تجزیه و بدون آلایندگی محیط زیست ۸- فرایند پودرسازی، بسته‌بندی و مخلوط‌سازی آسان ۹- قابل دسترس به مقدار کافی برای تولید انبوه مایه تلقیح و ارزان قیمت ۱۰- سطح تماس کافی و استاندارد با بذر ۱۱- سهولت آزادسازی باکتری در خاک ۱۲- ترجیحاً برای همه گونه‌های خانواده ریزوبیاسه مناسب باشد (۱۷ و ۲۰).

به‌طور خلاصه ماده حامل باید تأمین کننده رشد باکتری و حفظ جمعیت استاندارد آن برای مدت حداقل ۶-۳ ماه باشد (۵ و ۶). پیت(Peat) به عنوان مناسب‌ترین ماده حامل ریزوبیوم در سرتاسر جهان شناخته شده است. در بسیاری از کشورهای پیشرفته مانند کانادا، روسیه و استرالیا برای تولید مایه تلقیح ریزوبیومی از پیت با افزودنی‌های مختلف به‌عنوان حامل استفاده می‌شود (۲ و ۸). در بسیاری از کشورها از جمله در ایران پیت ذخایر قابل بهره‌برداری فراوان ندارد. در کشورهایی که پیت وجود نداشته باشد و یا از مرغوبیت موردنظر برای این هدف برخوردار نباشد، از سایر منابع ارزان قیمت و فراوان داخلی که دارای حداکثر صفات مربوط به یک حامل خوب باشد، استفاده می‌کنند (۱ و۲). به‌طور کلی سه دسته از مواد به‌عنوان حامل‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند مانند: الف) انواع خاک‌ها: شامل پیت، پیت همراه با سایر افزودنی‌ها و خاک‌های معدنی همراه با سایر افزودنی‌ها (۷ و ۱۲). ب) مواد گیاهی شامل: کمپوست باگاس(Bagasse) (۲)، سبوس برنج (۱۶)، کمپوست گیاه (۱۳) و ج) کانی‌ها شامل: ورمیکولیت (۹)، ورمیکولیت همراه با سایر افزودنی‌ها (۱۲)، پرلیت (۸)، سنگ فسفات، سولفات کلسیم (۹)، لیگنیت(Lignite) (۱۵)، سپیولایت (Sepiolite) (۲۱)، بنتونیت (۲) و برخی مواد آلی سینتیتک مانند ژل پلی آکریل آمید(۱۰)، آلژینیت(Alginate) (۴)، آگاروز (Agarose)، کاراژینان(Carrageenan) (۲۲) و ...

اگر چه پیت رایج‌ترین حامل مورد استفاده در تولید مایه تلقیح لگوم‌هاست، ولی همیشه در دسترس نیست. هم‌چنین معلوم شده است که برخی پیت‌ها ممکن است بازدارنده رشد برخی سویه‌های ریزوبیومی باشند. به‌علاوه ممکن است استفاده از اتوکلاو و با اشعه گاما برای سترون کردن پیت، مشکلاتی به همراه داشته باشد. دمای بالای بخار آب در اتوکلاو یا دز بالای اشعه گامای لازم برای استریل، ممکن است مواد سمی برای باکتری تولید کند. به علاوه اکوسیستم زمین‌های مرطوب، استخراج پیت را در برخی کشورها غیر ممکن می‌سازد (۸).

در هندوستان، مواد پیت مانندی وجود دارد که مقدار آنها تا حدود ۵/۵ میلیون تن تخمین زده می‌شود که می‌توان از آنها به‌عنوان یک حامل مناسب استفاده کرد. حامل دیگری به نام لیگنیت وجود دارد که از معادن لیگنیت نی ویلی واقع در جنوب هندوستان به‌دست می‌آید و مقدار آن به حدود ۳ میلیون تن در سال تخمین زده می‌شود و به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۱). به علاوه بسیاری از تولید کنندگان محلی از سایر مواد ارزان قیمت نیز استفاده می‌کنند. هر چند ممکن است جمعیت باکتری ریزوبیوم در حامل‌های فوق ۲-۱ واحد لگاریتمی از مایه تلقیح‌های اروپایی پایین‌تر باشد، ولی با مصرف بیشتر آن و یا تغییر روش مصرف این ضعف را می‌توان برطرف نمود (۲).

ایجاد رطوبت مناسب، در فرایند تهیه ماده حامل از اهمیت خاصی برخوردار است و زیادی یا کمی آن ممکن است باعث ایجاد وضعیت نامطلوب در مایه تلقیح شود (۲). گریفیس و راولی (۱۱) در آزمایش خود روی سه نوع حامل نشان دادند که پتانسیل ماتریک بهینه برای حامل‌های مختلف متفاوت بوده و هم‌چنین سویه‌های مختلف باکتری واکنش‌های متفاوتی به سطوح پتانسیل ماتریک از خود نشان می‌دهند. نتایج حاکی از این بود که تمام سویه‌های ریزوبیومی مورد بررسی در محدوده پتانسیل ماتریک ۱۰- تا ۳۰- کیلوپاسکال دارای کارایی بهتری هستند.

هدف این پژوهش، بررسی کیفیت چندین ماده حامل برای

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

تولید مایه تلقیح یونجه در کشور بوده و شرط اصلی تحقق این امر فراهم کردن ماده حامل مناسبی است که بتواند جمعیت باکتری را در مدت زمان لازم بین تولید تا مصرف آن توسط کشاورزان، به تعداد کافی و در حد استانداردهای تعیین شده جهانی (10^9 –10^7 باکتری در هر گرم از ماده حامل) به حالت زنده و فعال حفظ کند (۲ و ۳).

مواد و روش‌ها

نخست چند نوع ماده حامل شامل پیت(این ماده شامل بقایای گیاهی نسبتاً تجزیه یافته بوده و از جنگل‌های شمال کشور تهیه گردید)، ورمیکولیت (فرآوری شده)، ماده زائد بیولوژیکی(این ماده لجن‌های بیولوژیک حاصل از تصفیه فاضلاب پتروشیمی است که به مقدار فراوان از این تصفیه خانه‌ها استخراج و دفن می‌گردد و به دلیل داشتن مواد آلی زیاد، بررسی‌های انجام گرفته در رابطه با کاربرد آن به عنوان کود آلی در اراضی کشاورزی، نتایج مثبتی را نشان داده است) (BFW) (Biological Filter Waste)، ورمی کمپوست(این ماده در کارخانه کود آلی شهرداری از فعالیت یک نوع کرم خاکی بر روی کود دامی تهیه می‌گردد) به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از هوا خشک کردن آنها، با استفاده از آسیاب برقی خرد شده و از غربال ۳۵ مش (۰/۰۵ mm) عبور داده شدند. سپس برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها مانند جرم مخصوص ظاهری (روش استوانه)، درصد رطوبت اشباع، ظرفیت نگه‌داری آب، pH (عصاره گل اشباع)، EC_e (عصاره گل اشباع)، درصدکربنات کلسیم معادل (روش خنثی کردن با اسید)، ازت کل (روش کجلدال)، فسفر قابل جذب (روش السن)، پتاسیم قابل جذب (روش استات آمونیوم، pH=۷) و درصد کربن آلی (روش واکلی بلاک) اندازه‌گیری شد(۱۸).

با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه فیزیکی و شیمیایی (جدول ۱)، ۵ نوع تیمار مواد حامل به‌عنوان فاکتور اول به صورت زیر تعیین گردید: ۱- پیت ۲- ورمی کمپوست ۳- BFW ۴- ورمیکولیت + ورمی کمپوست (۱:۱) ۵- ورمیکولیت + BFW (۱:۱). از پیت به‌عنوان یک حامل شاهد که تمامی خواص یک حامل ایدآل و مطلوب را دارد استفاده گردید تا بقیه حامل‌ها نسبت به آن سنجیده شود (۸).

برای بررسی اثر رطوبت حامل بر روی ماندگاری باکتری سینوریزوبیوم *ملیلوتی*، دو سطح پتانسیل ماتریک شامل ۱۰- و ۳۰- کیلوپاسکال با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Pressure plate) بر روی حامل‌ها ایجاد گردید (۱۱). درصد رطوبت وزنی حامل‌ها در هر یک از پتانسیل‌ها، از طریق خشک کردن در دمای ۱۰۵°C به‌دست آمد که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده‌اند. این دو سطح پتانسیل به‌عنوان فاکتور دوم در آزمایش وارد گردیدند.

پس از انتخاب تیمارها، ۵۰ گرم از هر ماده حامل (هوا خشک)، در داخل ارلن‌های پلاستیکی (۲۵۰ میلی‌لیتر) که قابل اتوکلاو بودند وارد گردیدند. سپس در دستگاه اتوکلاو با فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

به منظور آماده‌سازی کشت خالص باکتری، از غده‌های ریشه‌ای یونجه، نمونه‌برداری انجام گرفته و باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی موجود در داخل غده‌های فعال، بعد از کشت روی محیط YMA(Yeast Extract Mannitol Agar) حاوی کنگورد با pH = ۶/۸ به صورت کلنی‌های شیری رنگ متمایل به صورتی بر روی محیط کشت ظاهر گردیدند (۳).

برای تشخیص نهایی سینوریزوبیوم *ملیلوتی*، آزمون تلقیح گیاه(Plant infection test) از طریق کشت گیاه یونجه (واریته قره یونجه) در اتاقک رشد با شرایط فتوپریودی ۱۲ ساعت روشنایی با شدت تابش ۱۰۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ °C و دمای تاریکی ۱۸ °C انجام گرفت. برای این منظور، بذرهای سالم و یک‌نواخت یونجه با هیپوکلریت سدیم۰/۵ درصد (وایتکس ۱۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده سپس در گلدان‌های حاوی ماسه استریل کشت گردیده و با محلول غذایی راریسون (Rorison) فاقد ازت، آبیاری شدند. پس از ظهور گیاهچه‌ها عمل تلقیح با سویه خالص آماده شده انجام گرفت. بعد از مدت چهار هفته، غده‌ها روی ریشه یونجه، کاملاً نمایان گردیدند.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

جدول ۱. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مواد پیش بینی شده برای تهیه ماده حامل

ویژگی مورد نظر	نام ماده حامل			
	پیت	ورمیکولیت	ورمی‌کمپوست	BFW
افت مواد آلی در ۴۰۰ ºC (٪)	۵۹/۶	۰/۳	۴۰/۱	۸۳
ازت (٪)	۱/۰۴	۰	۲	۷/۴
فسفر (٪)	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۶۳	۰/۰۵
پتاسیم (٪)	۰/۰۵	۰/۰۲۳	۰/۸۶۵	۰/۲
کربن آلی (٪)	۲۸/۸۶	۰/۴۱	۱۶/۵	۲۶/۶
pH عصاره اشباع	۶/۷	۷/۴	۸	۸/۱
Ec عصاره اشباع (ds/m)	۱/۲۵	۰/۴۹	۱۴/۶۵	۱۱/۴۱
کربنات کلسیم معادل (٪)	۲/۵	۱/۵	۳/۹	۱/۵
SP (٪)	۳۲۳/۲	۷۸/۷	۱۴۷/۹۲	۳۲۳/۷
ظرفیت نگه‌داری آب (٪)	۲۹۸/۷۵	۸۷/۷۳	۱۲۱/۷۲	۲۴۷/۸۳
جرم مخصوص ظاهری(g/cm^3)	۰/۴۱۴	۰/۹	۰/۹۷۵	۰/۷

جدول ۲. درصدهای وزنی رطوبت در پتانسیل‌های ماتریک ۱۰- و ۳۰- کیلوپاسکال

حامل	پتانسیل ماتریک	
	-۱۰	-۳۰
پیت	۲۲۱/۹	۱۳۷/۹
ورمی کمپوست	۱۰۶/۷	۹۶
BFW	۱۰۹/۲	۱۰۳
ورمیکولیت+ ورمی‌کمپوست	۹۳/۵	۷۳
ورمیکولیت + BFW	۹۶	۸۰

سپس باکتروئیدهای داخل غده‌ها با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند(۲۰).

برای تلقیح مواد حامل با کشت خالص باکتری، ابتدا سوسپانسیون باکتری آماده شد. برای این منظور از محیط کشت مایع YMB (Yeast Extract Mannitol Broth) با pH=۶/۸ استفاده گردید. محیط مذکور پس از تلقیح با سویه خالص شده در داخل شیکر انکوباتور در دمای ۲۶ ºC با دور متوسط (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. به منظور تعیین جمعیت باکتری‌های موجود در سوسپانسیون تهیه شده، از روش کدورت سنجی(Serial dilution) و جدول استانداردهای مک فارلند(Mc Farland) استفاده شد (۳ و ۲۰).

جهت تهیه مایه تلقیح، سوسپانسیون باکتری روی حامل‌های آماده شده اضافه گردید. برای انجام این کار، مقدار آب لازم برای ایجاد پتانسیل ماتریک ۰/۱- و ۰/۳- بار با استفاده از جدول ۲ در مقدار موردنظر از حامل‌ها محاسبه شد و بر این اساس حجم مساوی از سوسپانسیون باکتری، در شرایط استریل به هر کدام از ارلن‌های حاوی مواد حامل افزوده شد و باقی‌مانده رطوبت مورد نیاز در برخی حامل‌ها، با آب مقطر استریل تأمین گردید. با در نظر گرفتن تعداد باکتری در واحد حجم سوسپانسیون و حجم سوسپانسیون اضافه شده به حامل‌ها، تعداد باکتری در واحد وزن هر یک از حامل‌ها محاسبه گردید. سپس مایه‌های تلقیح تهیه شده به مدت دو هفته در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

انکوباتور (دمای ۲۶°C) و بعداً به مدت شش ماه در یخچال (دمای ۴°C) نگه‌داری شدند.

شمارش باکتری در حامل‌ها با استفاده از روش رقت‌های دهدهی (Serial dilution)، سپس کشت در ظروف پتری (Plate culture) و شمارش کلنی بر روی محیط YMA حاوی کنگورد انجام گرفت (۳، ۱۷ و ۲۰). زمان‌های شمارش شامل ۷، ۱۴، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ روز بودند.

برای اطمینان از عدم تغییر پتانسیل گره زایی باکتری، آزمون مایه زنی گیاه میزبان در پایان ماه ششم، در شرایط بدون آلودگی (axenic) و به روش گلدانی انجام گرفت. در این آزمایش ماسه سترون شده در داخل گلدان‌های ۲۰۰ میلی لیتری با یک گرم از مایه تلقیح مخلوط گردیده و سپس بذرهای یونجه (واریته همدانی و قره یونجه) ضدعفونی شده با وایتکس ۱۰ درصد در آن کاشته شد و تا زمان تشکیل غده با محلول غذایی راریسون آبیاری گردید. پس از تشکیل غده برای اطمینان از فعال بودن باکتری‌ها در داخل غده، مشاهدات میکروسکوپی از باکتروئیدهای موجود در آن انجام گرفت.

آزمایش توان ماندگاری باکتری بر روی انواع مواد حامل به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج تیمار ماده حامل، دو سطح پتانسیل ماتریک در حامل، ۸ زمان شمارش و در چهار تکرار اجرا گردید. تجزیه آماری هر زمان شمارش، به‌طور جداگانه به شکل فاکتوریل و یک جا به شکل فاکتوریل اسپیلت پلات در زمان انجام گرفت. به منظور رسیدن به توزیع نرمال یا نزدیک به نرمال داده‌ها، تبدیل لگاریتمی بر روی تعداد باکتری انجام شده پس از آن تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر حامل بر روی تعداد باکتری

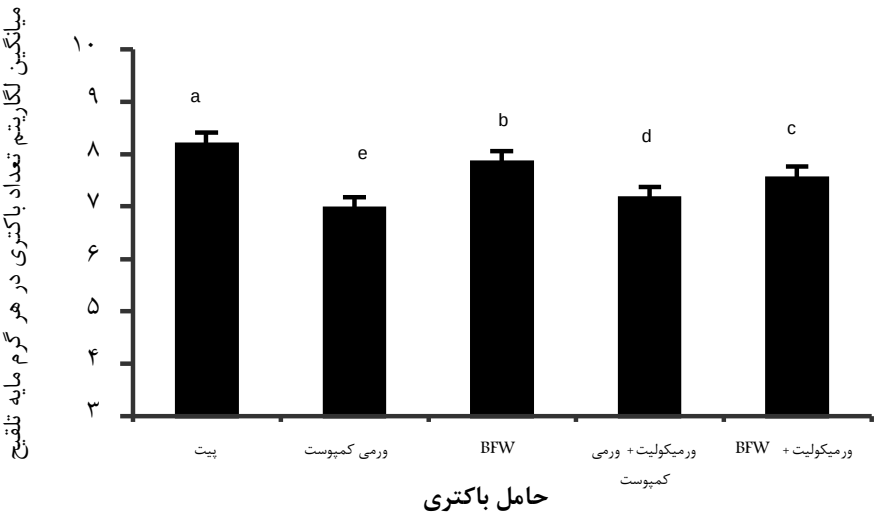
نتایج حاصل از تجزیه آماری اثر حامل نشان داد که بین پنج نوع ماده حامل مورد بررسی از نظر تعداد باکتری اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) وجود دارد. شکل ۱ نشان می‌دهد که میانگین تعداد باکتری در چهار حامل مورد آزمایش، دارای اختلاف معنی‌دار با پیت به عنوان یک حامل استاندارد گردیده است. در بین این چهار حامل، ورمی کمپوست دارای کمترین و BFW دارای بیشترین تعداد باکتری در هر گرم مایه تلقیح در مقایسه با پیت به عنوان یک شاهد بوده است. پیت به علت داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب از جمله ظرفیت نگه‌داری آب بالا، pH خنثی، هدایت الکتریکی پایین، سطح جذبی بالا و ... دارای بیشترین تعداد باکتری در هر گرم مایه تلقیح بود. ورمی کمپوست احتمالاً به علت هدایت الکتریکی زیاد، ظرفیت نگه‌داری آب نسبتاً پایین، سطح جذبی کم و جرم مخصوص زیاد، دارای کمترین تعداد باکتری در بین حامل‌های مورد آزمایش گردیده است (جدول ۱). به‌علاوه این ماده پس از خیس شدن، حالت خمیری و چسبناکی خاصی پیدا کرد که باعث ایجاد حالت بی‌هوازی و در نتیجه، منجر به کاهش معنی‌دار تعداد باکتری در مایه تلقیح شد. BFW به علت داشتن ظرفیت نگه‌داری آب بالا و سطح جذبی زیاد، هم‌چنین ایجاد حالت پودری و مناسب پس از اضافه کردن سوسپانسیون باکتری و آب مقطر استریل، بیشترین تعداد باکتری را بعد از پیت در خود نگه‌داری کرد (شکل ۱).

خاورزی و رجالی (۲) در آزمایش ماندگاری باکتری *برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* بر روی چند ماده حامل نتیجه گرفتند که بنتونیت علی رغم ظرفیت بسیار خوب نگه‌داری آب، پس از جذب آب حالت چسبناک و خمیری خاصی را پیدا می‌نماید که قابل توصیه برای تلقیح بذری و یا استفاده به‌عنوان ماده حامل نمی‌باشد. در آزمایش آنها کمپوست باگاس به علت افزایش جمعیت باکتری در دو هفته اول انکوباسیون و عدم نیاز به تنظیم کننده‌های pH، به‌عنوان بهترین ماده حامل این باکتری تعیین شد. رامیرو و همکاران (۱۹) کارآیی مایه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* را روی حامل پیت سترون شده با pH خنثی بررسی کرده و پی بردند که تعداد سلول‌های زنده در سطح قابل قبولی نگه‌داری شد. هالیدی و گراهام (۱۲) در آزمایشی

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

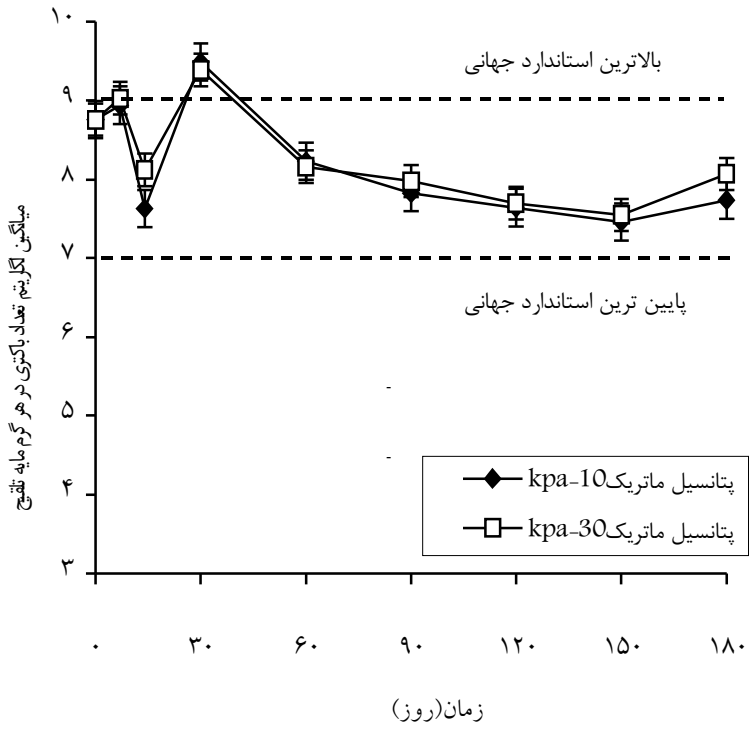


شکل ۱. اثر اصلی نوع حامل روی میانگین تعداد باکتری

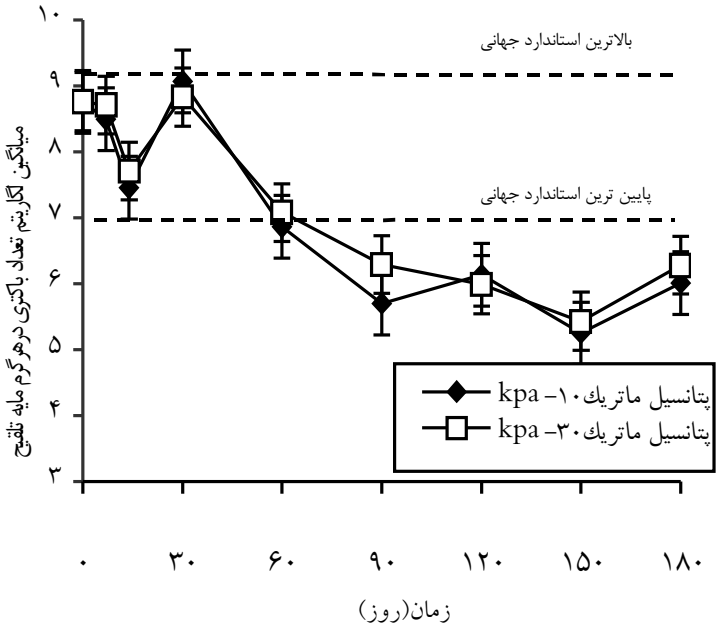
روی سه نمونه زغال سنگ آنتراسیت و یک نمونه پیت در کلمبیا، نتیجه گرفتند که زغال سنگ به علت تمایل به کلوخه‌ای شدن و مقاومت در برابر خیساندن در موقع تلقیح بذر لگوم‌ها، به‌عنوان ماده حامل قابل توصیه نبوده، ولی پیت به علت داشتن بیشترین تعداد باکتری در مدت ۶ ماه نگه‌داری و عدم وجود معایب فوق‌الذکر بهترین ماده حامل شناخته شد.

نتایج ماندگاری باکتری روی پیت در شکل ۲ نشان می‌دهد که این حامل، تعداد باکتری را در مدت شش ماه نگه‌داری در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی حفظ کرده است. ورمی کمپوست، تعداد باکتری را به مدت دو ماه و مخلوط آن با ورمیکولیت، به مدت سه ماه در حد استانداردهای جهانی حفظ کرده و بنابراین فقط برای استفاده سریع و فوری و یا در مواقعی که فاصله محل تولید تا مصرف کوتاه باشد می‌تواند موثر واقع شود (شکل‌های۳ و۵). از مقایسه دو شکل ۴ و ۶ چنین استنباط می‌شود که BFW در مدت شش ماه نگه‌داری، جمعیت باکتری را در حد استاندارد جهانی حفظ کرده ولی مخلوط آن با ورمیکولیت فقط به مدت حدود چهار ماه موثر بوده است. چنین به نظر می‌رسد مخلوط ورمیکولیت با BFW احتمالاً به علت ایجاد شرایط تهویه‌ای نامناسب و افت کیفیت مایه تلقیح از لحاظ ظرفیت نگه‌داری آب و عناصر غذایی، باعث کاهش زمان ماندگاری باکتری از حد استانداردهای جهانی شده است. در آزمایش انجام گرفته توسط خاورزی و رجالی (۲)، ثابت شد که بنتونیت در ترکیب با بسیاری از مواد آلی یا انواع کمپوست حالت گلوله‌ای ایجاد کرده، باعث افت کیفیت مایه تلقیح گردید. نتایج ماندگاری در اکثر حامل‌ها نشان می‌دهد که در هفته دوم انکوباسیون، احتمالاً به علت تداوم رطوبت نسبی زیاد در دمای ۲۶°C و افزایش غلظت برخی گازهای بازدارنده به علت دمای زیاد تعداد باکتری به صورت معنی‌دار نسبت به شمارش ۷ روز کاهش یافته است به‌طوری‌که میزان کاهش تعداد باکتری در پتانسیل ماتریک ۱۰- نسبت به ۳۰- کیلوپاسکال به خاطر داشتن رطوبت زیاد بیشتر بوده است (شکل ۲) و با انتقال مایه‌های تلقیح به داخل یخچال و نگه‌داری آنها در دمای ۴°C به علت کاهش رطوبت نسبی، شرایط برای رشد باکتری‌ها بهبود و جمعیت آنها به‌طور معنی‌دار افزایش یافته و در شمارش ۳۰ روز به بالاترین حد رسیده است و تعداد باکتری در زمان‌های بعدی به صورت غیرمعنی‌دار کاهش یافته است. چنین به نظر می‌رسد که تحت شرایط رطوبتی ۱۰- و۳۰- کیلوپاسکال و با این حامل‌ها، انکوباسیون به مدت ۷ روز کافی بوده و اصولاً بعد از این مدت، بهتر است برای حفظ جمعیت باکتری در حد بالا، مایه‌های تلقیح به یخچال انتقال یافته و در دمای ۴°C نگه‌داری

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



شکل ۲. توانایی نگه‌داری باکتری توسط حامل پیت

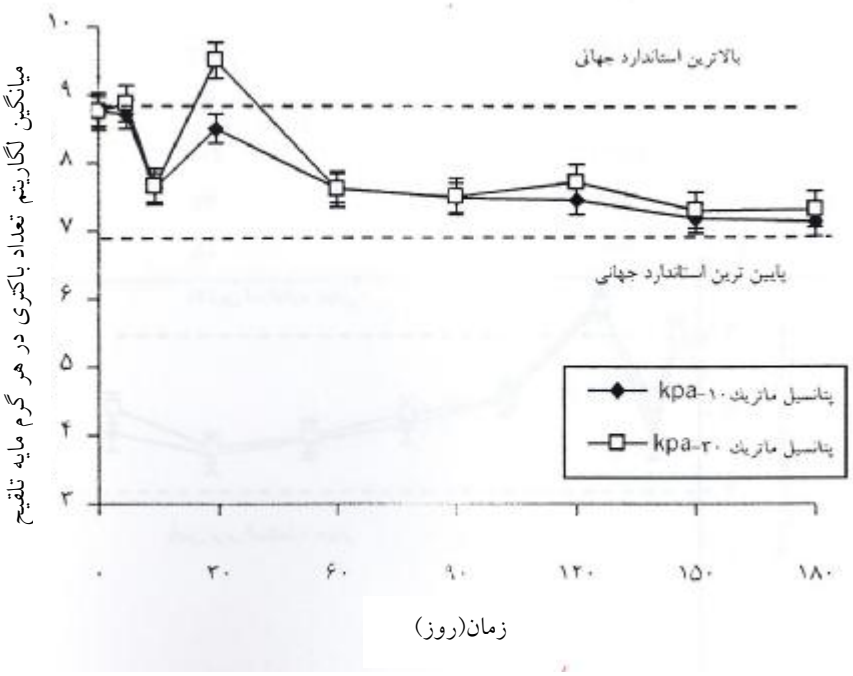


شکل۳. توانایی نگه‌داری باکتری توسط حامل ورمی کمپوست

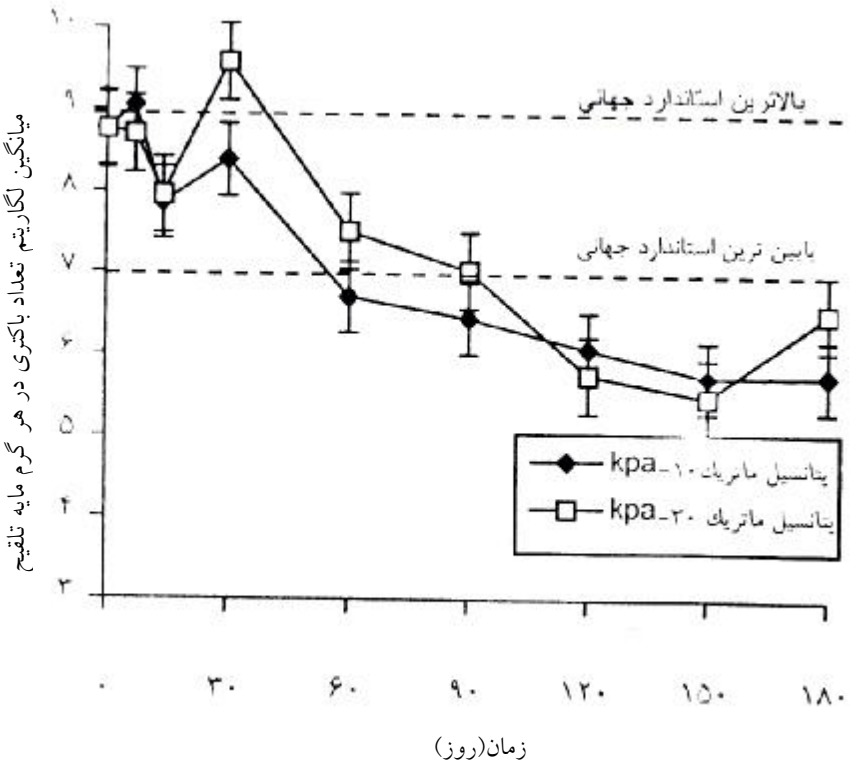
[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

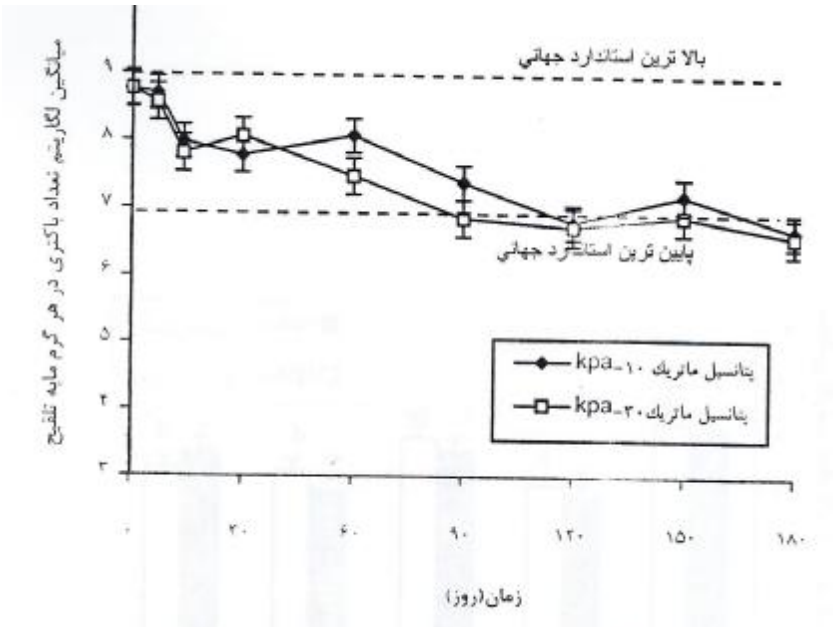


شکل٤. توانایی نگه‌داری باکتری توسط حامل BFW



شکل٥. توانایی نگه‌داری باکتری توسط حامل ورمیکولیت + ورمی کمپوست

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



شکل٦. توانایی نگه‌داری باکتری توسط حامل ورمیکولیت+BFW

شود. جووارکار و ریواری (۱۴) در بررسی‌های خود بر روی اثر رطوبت نسبی و دما بر روی میزان بقای باکتری ریزوبیوم، نشان دادند که رطوبت نسبی بیش از ۶۵ درصد و دمای بالای $26^{\circ}C$ باعث کاهش قابل ملاحظه تعداد باکتری بر روی حامل می‌گردد.

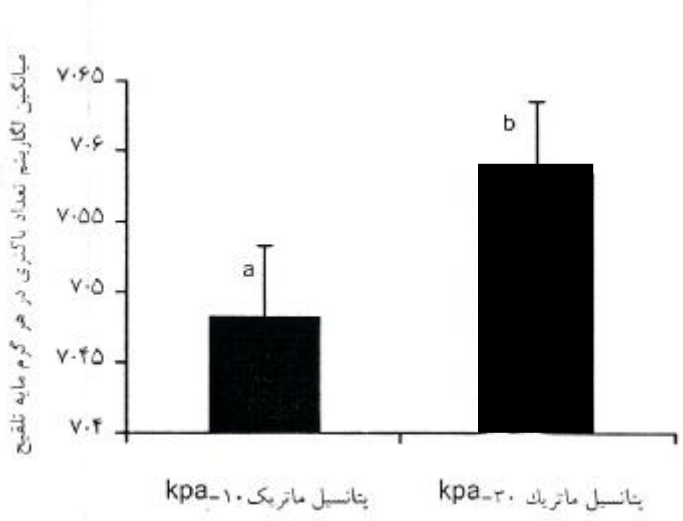
اثر سطوح پتانسیل ماتریک بر روی تعداد باکتری

اثر اصلی سطوح پتانسیل ماتریک روی میانگین تعداد باکتری در شکل ۷ نشان می‌دهد که بین دو سطح پتانسیل ماتریک از نظر تعداد باکتری، اختلاف معنی‌دار وجود داشته و تعداد باکتری در پتانسیل ماتریک ۳۰- کیلوپاسکال بیشتر از پتانسیل ماتریک ۱۰- کیلوپاسکال گردیده است. کاهش پتانسیل ماتریک از ۱۰- به ۳۰- کیلوپاسکال احتمالاً ضمن تأمین رطوبت مناسب باعث ایجاد حالت پودری در حامل گردیده و در نتیجه شرایط تهویه‌ای مناسبی را برای رشد و تکثیر باکتری فراهم کرده است.

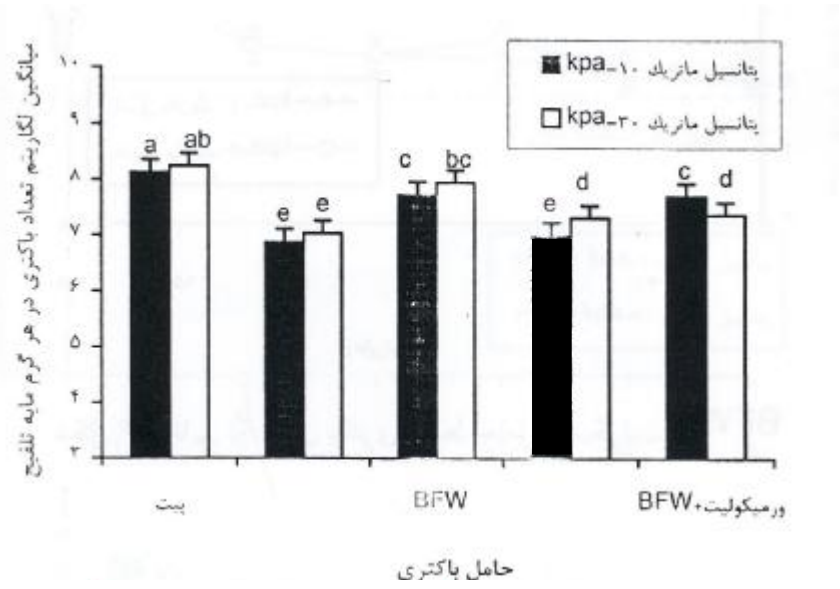
اثر متقابل حامل × پتانسیل ماتریک بر روی میانگین تعداد باکتری در شکل ۸ نشان می‌دهد که در مخلوط‌های ورمیکولیت + ورمی‌کمپوست و ورمیکولیت + BFW اختلاف معنی‌داری بین دو سطح پتانسیل ماتریک وجود دارد. به نظر می‌رسد اثر ورمیکولیت بر روی ورمی‌کمپوست و BFW از نظر ایجاد خصوصیت فیزیکی مناسب بر روی حامل، متفاوت بوده به‌طوری‌که بیشترین تعداد باکتری در اولی، در پتانسیل ماتریک ۳۰- کیلوپاسکال و در دومی، ۱۰- کیلوپاسکال نگه‌داری گردیده است ولی به‌طور کلی در اکثر حامل‌ها بیشترین تعداد باکتری در ۳۰- کیلوپاسکال بوده است. احتمالا در حالت مخلوط دو حامل، پتانسیل ماتریک فقط ناشی از جذب سطحی نبوده بلکه ناشی از آرایش فضاهای میکرو و ماکرو نیز می‌باشد (پدیده مویینگی) که این آرا یش در مخلوط‌های متفاوت می‌تواند متنوع ظاهر شود و بر پتانسیل ماتریک اثر بگذارد.

گریفیس و راولی (۱۱) در آزمایشی، ماندگاری سه نوع سویه باکتری ریزوبیوم را روی سه نوع پیت، در شرایط پنج سطح پتانسیل ماتریک از ۱۰- تا ۱۰۰۰- کیلوپاسکال مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفتند که بهترین ماندگاری باکتری روی حامل‌ها در محدوده پتانسیل ماتریک ۱۰- تا ۳۰- کیلوپاسکال بوده است. هم‌چنین به این نکته پی بردند که پتانسیل ماتریک بالاتر در کوتاه مدت برای باکتری محدودیت ایجاد نکرده ولی برای نگه‌داری طولانی مدت، پتانسیل‌های ماتریک پایین‌تر، به ویژه ۳۰- کیلوپاسکال نتیجه بهتری می‌دهد.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



شکل۷. اثر اصلی سطوح پتانسیل ماتریک روی میانگین تعداد باکتری



شکل۸. میانگین تعداد باکتری در حامل‌ها و سطوح پتانسیل ماتریک در کل زمان‌ها

حفظ پتانسیل همزیستی باکتری در پایان ماه ششم

آزمون گره زایی در گیاه یونجه در پایان ماه ششم نگه‌داری حامل‌ها، نشان داد که غده‌های فعال در تمامی تیمارها به استثنای تیمار حاوی BFW (در هر دو واریته قره یونجه و همدانی) تشکیل و باکتروئیدهای موجود در داخل غده‌ها از طریق رنگ‌آمیزی گرام به اشکال فعال مشاهده شدند. هم‌چنین نوع واریته یونجه تأثیری روی گره زایی نشان نداد. تیمار حاوی BFW سبب خشکیدن گیاهچه‌های یونجه گردید و گیاهان به مرحله غده‌بندی نرسیدند. احتمالاً وجود برخی موادآلی بخصوص مواد هیدروکربنه بازدارنده در BFW عامل توقف رشد گیاهچه‌ها بوده است.

با توجه به نتایج فوق می‌توان گفت اگر چه BFW توانست

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

در مدت شش ماه، تعداد باکتری را در سطح بالاتری نسبت به سایر حامل‌ها حفظ کند ولی به خاطر عدم توانایی استقرار گیاه در حضور این ماده (به صورت مخلوط با بذر) نمی‌تواند به عنوان یک حامل مناسب جهت تلقیح بذری به کار رود ولی مخلوط آن با ورمیکولیت، احتمالاً به خاطر کاهش اثر سمیت این ماده بر روی رشد گیاهچه‌ها، قادر به تشکیل غده بوده و می‌تواند تا مدت حدود چهار ماه به‌عنوان یک مایه تلقیح استاندارد برای انجام تلقیح بذری استفاده شود. هم‌چنین مایه تلقیح ورمیکولیت + ورمی‌کمپوست و ورمی کمپوست خالص، به علت توانایی تشکیل غده‌های فعال می‌توانند به‌عنوان مایه تلقیح استاندارد به ترتیب تا مدت سه ماه و دو ماه، جهت انجام تلقیح بذری مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که BFW، ورمی کمپوست و پیت، مواد آلی پیچیده‌ای هستند که ساختار شیمیایی دقیق آنها مشخص نیست لذا نمی توان رفتار فیزیکی و شیمیایی معینی برای آنها در نظر گرفت و علت را توجیه کرد و ذکر هر علتی به‌طور احتمالی بوده و قطعی نیست. در مورد توصیه مایه تلقیح برای کشاورزان بایستی گفت که این تحقیق فقط توانایی چند ماده حامل را مقایسه کرده و برای توصیه آن به عنوان مایه تلقیح و کاربرد در مزرعه بایستی آزمایش‌های دیگری صورت گیرد.

منابع مورد استفاده

۱. آستارایی، ع. ر. و ع. کوچکی. ۱۳۷۵. *کاربرد کودهای بیولوژیکی در کشاورزی پایدار* (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۲. خاورزی، ک. و ف. رجالی. ۱۳۷۹. استفاده از برخی مواد ارزان قیمت به عنوان حامل باکتری *برادی ریزبیوم ژاپونیکوم*. مجله خاک و آب ۱٤(۱) :۳٦-٤٥.

۳. علی‌اصغرزاده، ن.، ر. صباغ فرشی و ع. ۱. بهبهانی‌زاده. ۱۳۷۳. بررسی و مقایسه چند ماده نگه‌دارنده (Carrier) باکتری *برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم*. نشریه فنی شماره ۹۳۷، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.

4. Bashan, Y., J. P. Herandez, L. A. Leyva and M. Bacilo. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria.Biol. Fert. Soils. 35: 359-368.
5. BNF Bulletin. 1991. Volume X, Number 1, university of Hawaii, NIFTAL project, paia, Hawaii.
6. Burton, J. C. 1981. *Rhizobium* inoculants for developing countries. Trop. Agric. 58: 291-295.
7. Cho, W. L and M. Alexander. 1984. Mineral soils as carrier for *Rhizobium* inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 47: 94-97.
8. Daza, A., C. Santamaria, D. N. Rodriguez-Navarro, M. Camacho and R. Orive. 2000. Perlit as a carrier for bacterial inoculants. Soil. Biol. Biochem. 32:567-572.
9. Deka, S. and G. Baruah. 1992. Storage efficiency of different carrier materials for rhizobia culture. Environ. and Ecol. 10: 857-860.
10. Dommergues, Y. R., H. G. Deim and C. Divies. 1979. Polyacrylamide entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. Appl. Environ. Microbiol. 37: 779-781.
11. Griffith, G. and A. Roughly. 1992. The effect of moisture potential on growth and survival of root nodule, bacteria in peat culture and on seed. J. Appl. Bacteriol. 73: 7-13.
12. Halliday, J. and L. Graham. 1978. Coal compared to peat as a carrier of rhizobia. Tyrrialba. 28: 348-349.
13. Iswaran, V., A. sen and R. apte. 1972. Plant compost as a substitute for peat for legume inoculants. Curr. Sci. 41: 299-301.
14. Juwarkar, A. and R. B. Rewari. 1988. Sinergistic effect of relative humidity and temperature on the survival of rhizobia in inoculant carrier. J. Appl. Bacteriol. 69: 465-469.
15. Kandasamy, R. and N. N. Prasad. 1971. Lignite as a carrier of rhizobia. Curr. Sci. 40: 496-498.
16. Khatri, A. A., M. Choksey and E. Dsilva. 1973. Rice husk as the medium for legume inoculants. Sci. Cult. 39: 194-196.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

17. Motsara, M., P. Bhattacharyya and B. Stava. 1995. Biofertilizer technology, marketing and usage- a source book-cum-glossary fertilizer development and consultion organization, New Delhi, India.
18. Page, A. L., R. H. Miller and D. R. Keeney. 1982. Method of soil analysis. part 2- Chemical and microbiological properties. 2nd ed., ASA pub. Buxton, Madison, WI.
19. Romero, J., A. Palomares, F. Gallavdo and J. Olivares. 1987. Survival and preservation of effectivness of *Rhizobium meliloti* in inoculants prepared with a netural-alkalin peat as carrier. Anales De Edafologia Agrobiologia 37: 551-560.
20. Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994. Hand book for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Springer-verlag, New York.
21. Urio, E., M. Chowdhuru and S. Eneju uiwe. 1981. The Survival pattern of rhizobia in some local carrier materials for seed inoculation of legumes. Global Impacts of Appl. Microbiol. 139-144.
22. Van Dyke, M. I. and J. I. Prosser. 2000. Enhanced survival of *Peseudomonas flurecens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. Soil. Biol. Biochem. 23: 41-44.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.4.6.3]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com