

اثر کربنات کلسیم و سولفات کلسیم بر زنده‌مانی باکتری ایکولای در مخلوط شن ریز

نصراله سپهرنیا^{۱*}، علی اکبر محبوبی^۲، محمدرضا مصدقی^۳،

غلامرضا خداکرمیان^۴، علی اکبر صفری سنجانی^۵

۱ - کارشناس ارشد خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲ - استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۳ - دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۴ - دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۵ - دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۳

چکیده

آلودگی آب و خاک به باکتری‌های بیماری‌زای انسان، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در این راستا زمان زنده ماندن باکتری تارسیدن به منابع خاک و آب بسیار مهم است. پژوهش حاضر به منظور شناخت اثر افزودن کربنات کلسیم و سولفات کلسیم بر زنده‌مانی باکتری *Escherichia coli* انجام گرفت. با استفاده از سولفات کلسیم، کربنات کلسیم و شن ریز مخلوط‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد در شرایط استریل تهیه شد. ظرفیت زراعی مخلوط‌ها با استفاده از دستگاه صفحات فشار محاسبه شد. یک میلی‌لیتر عصاره ۲۰:۱ کود به آب در شرایط استریل، به مخلوط‌ها اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت اتوزین متیلن بلو اضافه شد و در زمان‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت، تعداد باکتری‌های رشد کرده به روش شمارش زنده تعیین شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ترکیب کربنات کلسیم در سطوح بالاتر از ۲۰ درصد، اثر سمی بر رشد باکتری‌ها دارد. در صورتی که هیچ‌گونه اثر سویی در حضور ترکیب سولفات کلسیم در سطوح مختلف مشاهده نشد. هم‌چنین، اثر زمان بر رشد باکتری‌ها معنی‌دار شد ($P < 0.001$). گذشت زمان نشان داد که رشد باکتری‌ها در سطوح بالاتر از ۲۰ درصد در حضور کربنات کلسیم و سولفات کلسیم به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که باکتری *E. coli* از آنیون سولفات در ساختمان خود استفاده می‌کند، در حالی که آنیون کربنات اثر بازدارنده بر رشد باکتری دارد. بنابراین آنیون کربنات می‌تواند به عنوان فیلتر عمل کرده و فراوانی این ترکیب در خاک‌های ایران هزینه فیلتر کردن این باکتری را کاهش می‌دهد.

کلید واژه

آلودگی آب، کود گاوی، شن-کربنات کلسیم، شن-سولفات کلسیم، باکتری بیماری‌زای انسان

سر آغاز

ریزجانداران، نوع کاربرد کود، رطوبت، دما، اسیدیته، عناصر غذایی فراهم در خاک، میزان ماده آلی خاک، نمک‌ها و یون‌های محلول در خاک، تهویه خاک و بافت خاک دارد (Gerba, et al., 1975; Tate, 1978; Reddy, et al., 1981; Ruprich, 1994; McMurry, et al., 1998; Mubiru, et al., 1998; Or and Foppen, 2005; Foppen and Tuller, 2000; Unc, 2000; Schijven, 2006; و صفری سنجانی، ۱۳۸۲). Rietz and Haynes (2003)، (2003) گزارش کردند که شوری

زنده‌مانی ویژگی بسیار مهم و تأثیرگذار در آلودگی منابع آبی به وسیله ریزجانداران است. شرایط محیطی برای زنده ماندن باکتری‌های روده‌ای که تازه از بدن جانور به همراه مدفوع خارج شده‌اند بسیار نامطلوب است و بسیاری از آنها بیش از ۶۰ روز قادر به زنده ماندن نیستند، مگر این‌که در شرایط محیطی، حداقل شرایط بهینه برای آنها فراهم شود (Neely, 2000). زنده ماندن باکتری‌ها در خاک بستگی به منبع تولید باکتری، گونه باکتری، رقابت با سایر

زراعی، در شرایط استریل با استفاده از آب مقطر استریل به مخلوطها اضافه شد تا محدودیت رطوبتی برای رشد باکتری وجود نداشته باشد. مخلوطهای تهیه شده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. به مخلوطهای تهیه شده در شرایط استریل، یک میلی‌لیتر عصاره ۲۰:۱ کود به آب که تقریباً دارای ۴/۸×۱۰^۵ باکتری ایکولای بود اضافه شد. مخلوطهای تهیه شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا شرایط رقابتی سایر ریزجانداران نیز حفظ شود. در زمان‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت نمونه‌برداری انجام گرفت.

عصاره‌هایی از نمونه‌ها تهیه و به محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو^۲ (EMB) افزوده شد. بعد از سپری شدن ۱۸ تا ۲۴ ساعت، جمعیت باکتری ایکولای رشد کرده بر روی این محیط با استفاده از روش شمارش مستقیم محاسبه شد. داده‌های به دست آمده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا و با استفاده از نرم‌افزار (SAS, 1990) تجزیه و تحلیل و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

اثر ویژگی‌های شیمیایی کود گاوی، مخلوط‌های شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم بر زنده ماندن باکتری ایکولای

ویژگی‌های شیمیایی کود گاوی مورد استفاده در جدول شماره (۱) آورده شده‌اند. رسانایی الکتریکی و پی‌اچ مخلوط‌های سولفات کلسیم و کربنات کلسیم که دو مشخصه مؤثر و محدودکننده در رشد باکتری‌ها هستند (Halverson, et al., 2000; Luna, et al., 2003) تعیین شدند و در جدول شماره (۲) آورده شده‌اند. در شرایط سدیمی بودن خاک، ممکن است سمیت یون سدیم همراه با وجود آنیون‌های کلر و بی‌کربنات و افزایش پی‌اچ، رشد جمعیت میکروبی را کاهش دهد (Zahran, et al., 1997).

پی‌اچ بر فعالیت سوخت‌وساز ریزجانداران مانند جذب عناصر غذایی و دفع مواد زائد اثر مستقیم دارد و بر فعالیت آنزیمی باکتری‌ها و زنده ماندن باکتری‌ها بشدت مؤثر است (صفری‌سنجانی، ۱۳۸۲).

میزان سدیم جذب شده^۳ (SAR)، رسانایی الکتریکی^۴ (EC) و پی‌اچ کود مورد بررسی، اثر سویی برای رشد باکتری ایکولای نداشت (شکل شماره ۱، جدول شماره ۱)، ($R^2=92\%$)، رسانایی الکتریکی در مخلوط‌های سولفات کلسیم بیش از مخلوط‌های کربنات کلسیم بود. پی‌اچ مخلوط شن-کربنات کلسیم بین ۸/۲۰ تا

بیش از ۲۵ دسی‌زیمنس بر متر عصاره اشباع خاک، اثر سوء زیادی بر فعالیت ریزجانداران خاک دارد. همچنین Halverson, et al (2000). دریافتند که عبور سریع آب خاک و بارش‌های شدید باران باعث تغییرات شدیدی در فشار اسمزی محلول خاک می‌شود که بر زنده‌مانی ریزجانداران تأثیر زیادی دارد.

بسیاری از پژوهشگران معتقدند که عامل اصلی مؤثر بر زنده‌مانی باکتری‌های دستگاه گوارش انسان، میزان رطوبت خاک است (Gerba, et al., 1975; Kibbey, et al., 1978; Reddy, 1981; Gerba and Bitton, 1984; Harris, 1994; Mubiru, et al., 2000; Akara, et al., 2000; Unc and Goss, 2003; Or, 2000; Foppen, et al., 2007) بهترین رطوبت خاک برای زیست باکتری‌ها، بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد گنجایش زراعی^۱ (FC) است. در این حد رطوبتی، باکتری‌های هوازی و همچنین باکتری‌های بی‌هوازی می‌توانند زندگی کارایی داشته باشند (Cools, et al., 2001; Unc and Goss, 2003) صفری‌سنجانی، (۱۳۸۲).

با وجود این‌که مطالعات بسیار زیادی در زمینه زنده‌مانی باکتری‌ها انجام شده است، اما این‌گونه اطلاعات در مورد باکتری ایکولای در ایران اندک است.

با توجه به اینکه ۲۸ میلیون هکتار خاک گچی در ایران وجود دارد (فرپور و همکاران، ۲۰۰۴) و تقریباً ۶۵ درصد خاک‌های ایران آهکی است (خداوردیلو و همکاران، ۲۰۱۱)، به نظر می‌رسد که نقش سولفات کلسیم و کربنات کلسیم بر کنترل زنده‌مانی و رسیدن باکتری‌ها به آب‌های سطحی و زیرسطحی بسیار مهم باشد. از این رو در این پژوهش با بهینه نگه داشتن شرایط رطوبتی و دمایی، به بررسی اثر و نقش این ترکیبات بر زنده‌مانی باکتری ایکولای در زمان‌های مختلف پرداخته شده است.

مواد و روش بررسی

با استفاده از سولفات و کربنات کلسیم ساخت شرکت مرک آلمان و شن ریز (۰/۱ میلی‌متر) مخلوط‌هایی با سطوح ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد حاوی ترکیبات سولفات و کربنات کلسیم تهیه شد. برای تهیه مخلوط‌ها ۵۰ گرم شن ریز ۰/۱ میلی‌متر توزین و سپس برای رسیدن به درصد مخلوط مورد نظر، از وزن شن کسر و به جای آن کربنات کلسیم یا سولفات کلسیم اضافه شد. حد ظرفیت زراعی هر یک از ترکیبات فوق با استفاده از دستگاه صفحات فشار (Pressure plate) تعیین شد. میزان آب لازم برای رسیدن به حد ظرفیت

۸/۳۴ و پی اچ شن-سولفات کلسیم بین ۷/۱۵ تا ۷/۶۴ بود. (m-1) ۱/۳۴ متغیر بود (جدول شماره ۲). رسانایی الکتریکی هر دو مخلوط بین (dS m-1) ۰/۱۸۴ تا (dS

جدول شماره (۱): برخی ویژگی‌های شیمیایی کود گاوی مورد استفاده

K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	q _m	OC	SAR	pH	EC	I
		mg L ⁻¹			g 100g ⁻¹	(mmol L ⁻¹) ^{-0.5}		(dS m ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)
۳۷۶۰/۰	۱۱۹/۱	۶۸/۴	۱۸۸/۵	۱۱/۰	۳۹/۳۹	۱/۸۸	۸/۲۵	۲/۶۶	۶۳۷

جدول شماره (۲): رسانایی الکتریکی و پی اچ مخلوط‌های شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم مورد استفاده

pH1:5	(dS m-1) EC 1:1	کربنات کلسیم (g 100g-1)	سولفات کلسیم (g 100g-1)
۷/۱۵	۰/۸۲۸	۰	۲۰
۷/۴۰	۰/۸۳۴	۰	۴۰
۷/۵۰	۱/۰۶۶	۰	۶۰
۷/۶۴	۱/۳۴۳	۰	۸۰
۸/۲۰	۰/۱۸۴	۲۰	۰
۸/۳۲	۰/۲۰۰	۴۰	۰
۸/۳۴	۰/۲۱۹	۶۰	۰
۸/۳۴	۰/۳۵۶	۸۰	۰

و ۲/۵ ساعت بود. تفاوت بین زمان ۱۵ ساعت و سه زمان دیگر در سطح اطمینان پنج درصد معنی‌دار بود، اما تفاوت معنی‌داری بین زمان ۵ و ۱۰ ساعت مشاهده نشد (جدول شماره ۴). همچنین کمترین میزان غلظت باکتری‌ها در زمان ۲/۵ ساعت پس از انکوباسیون مشاهده شد که تفاوت آن با زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول شماره ۴). کولز و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کرده‌اند که قدرت زنده‌مانی ایکولای در یک خاک شنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰۰ درصد گنجایش زراعی بین ۶۸ تا ۸۰ روز است. همچنین (Boes, et al., 2005) گزارش کردند که در شرایط طبیعی مزرعه در اثر کاربرد کود حیوانی در سطح یک خاک رسی قدرت زنده‌مانی ایکولای ۲۱ روز است. آثار متقابل سطح در واحد زمان نشان داد که بیشترین میزان باکتری ایکولای رشد کرده در مخلوط شن تیمار شده با کربنات کلسیم در سطح ۲۰ درصد در زمان ۱۵ ساعت بود که تفاوت معنی‌داری را با سایر آثار متقابل سطح در واحد زمان در سطح اطمینان ۵ درصد داشت. کمترین میزان باکتری ایکولای رشد کرده بر مخلوط شن-کربنات کلسیم در سطح ۸۰ درصد در زمان ۱۵ ساعت بود (جدول شماره ۴). بررسی آثار متقابل نشان داد که ممکن است اثر سمیت کربنات کلسیم بر باکتری‌های ایکولای در سطوح ۴۰ و ۶۰ درصد هم مشاهده شود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۵ درصد بین سطوح ۴۰ و ۶۰ درصد در تمامی زمان‌ها (به جز زمان ۱۰ ساعت سطح ۴۰

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از انکوباسیون باکتری ایکولای ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت در مخلوط‌های شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم

در جدول شماره (۳) تجزیه واریانس غلظت باکتری ایکولای در مخلوط شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم نشان داده شده است. اثر سطح، ترکیب، سطح در ترکیب، زمان، سطح در زمان، ترکیب در زمان و سطح در ترکیب در واحد زمان در سطح اطمینان یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین اثر مربوط به ترکیب کربنات کلسیم و سولفات کلسیم و کمترین اثر مربوط به سطح در واحد زمان بود (جدول شماره ۳). در جدول شماره (۴) مقایسه میانگین غلظت باکتری‌های ایکولای تیمار شده با کربنات کلسیم نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطح کربنات کلسیم رشد باکتری‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد، به گونه‌ای که میانگین غلظت باکتری ایکولای در سطح ۲۰ درصد کربنات کلسیم پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون تقریباً ۹، ۲۲/۶ و ۳۹ برابر میانگین سطوح ۴۰ و ۸۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری را با سطوح دیگر در سطح اطمینان پنج درصد آماری داشت. کمترین غلظت باکتری رشد کرده در سطح ۸۰ درصد کربنات کلسیم مشاهده شد، اما تفاوت معنی‌داری با مخلوط‌های ۴۰ و ۶۰ درصد نداشت. اثر زمان انکوباسیون هم بر غلظت و رشد باکتری‌ها تأثیر داشت، به طوری که با گذشت زمان، غلظت باکتری‌ها افزایش یافت. بیشترین غلظت باکتری‌های رشد کرده در زمان ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون بود. که تقریباً ۱،۲/۸ و ۴/۷ برابر زمان‌های ۱۰، ۵

میانگین غلظت باکتری ایکولای رشد کرده در مخلوط شن - سولفات کلسیم در سطح ۶۰ درصد بیش از ۸۰ درصد، ۴۰ درصد و ۲۰ درصد بود که به ترتیب عبارتند از: $1.03 \times 10^3 < 1.60 / 1.3 \times 10^3 < 1.47 / 5.1 \times 10^3 < 9.1 / 1.8 \times 10^3 < 6.8 / 5.6 \times 10^3$ تفاوت میانگین سطوح سولفات کلسیم در سطح اطمینان ۵ درصد معنی دار شد (جدول شماره ۵). اثر سطوح سولفات کلسیم بمراتب بهتر از کربنات کلسیم در مقایسه میانگین‌ها مشاهده شد (جدول شماره ۵).
بر خلاف کربنات کلسیم، با افزایش سطح سولفات کلسیم اثر سوء بر باکتری‌های ایکولای مشاهده نشد. به طوری که با افزایش سطح سولفات کلسیم میزان غلظت باکتری افزایش یافت. نسبت باکتری‌های رشد کرده در سطوح ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد به ترتیب، ۲/۳، ۱/۸، ۱ و ۱/۱ بود.

جدول شماره (۵): مقایسه میانگین غلظت باکتری

ایکولای تیمار شده با سولفات کلسیم ($10^3 \times CFU ml^{-1}$)

سطح (%) زمان ساعت	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	میانگین
۲/۵	۱۲/۱۷ ^c	۲۳/۵۷ ^d	۳۸/۰۰ ⁱ	۴۸/۷۰ ⁱ	۳۰/۶۱ ^d
۵	۶۸/۳۰ ^{gh}	۱۰۲/۱۳ ^f	۱۰۴/۲۳ ^f	۶۷/۲۰ ^h	۸۵/۴۶ ^c
۱۰	۸۲/۱۳ ^g	۱۲۲/۶۷ ^e	۲۲۲/۳۰ ^c	۱۷۳/۱۴۰ ^d	۱۵۰/۰۶ ^b
۱۵	۱۱۱/۶۷ ^{ef}	۱۱۶/۳۳ ^{ef}	۲۷۶/۰۰ ^b	۳۰۱/۰۰ ^a	۲۰۱/۲۵ ^a
میانگین	۶۸/۵۶ ^d	۹۱/۱۸ ^c	۱۶۰/۱۳ ^a	۱۴۷/۵۱ ^b	

حروف مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن در سطح اطمینان ۵ درصد است.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمام زمان‌های مورد بررسی در سطح اطمینان ۵ درصد وجود دارد (جدول ۵). بیشترین و کمترین غلظت باکتری ایکولای به ترتیب در زمان ۱۵ و ۲/۵ ساعت مشاهده شد که در سطح اطمینان ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. همانند اثر سطوح سولفات کلسیم، اثر زمان‌های مورد بررسی در مخلوط شن - سولفات کلسیم متمایز تر از اثر زمان در مخلوط شن - کربنات کلسیم بود. آثار متقابل سطح سولفات کلسیم × زمان نشان داد که بیشترین و کمترین غلظت باکتری ایکولای به ترتیب در سطح ۸۰ درصد، در زمان ۱۵ ساعت و

درصد) با سطح ۸۰ درصد کربنات کلسیم که کمترین میزان باکتری‌ها در آن مشاهده شد وجود نداشت (جدول شماره ۴).

جدول شماره (۳): تجزیه واریانس غلظت باکتری ایکولای در

مخلوط شن - کربنات کلسیم و شن - سولفات کلسیم.

منبع تغییرات	درجه آزادی	نسبت F	میزان $pr > F$
سطح	۳	۲۶/۱۰	$< .0001^{**}$
ترکیب	۱	۱۱۸۷/۶۴	$< .0001^{**}$
سطح × ترکیب	۳	۷۱/۳۷	$< .0001^{**}$
زمان	۳	۱۶۱/۱۸	$< .0001^{**}$
سطح × زمان	۹	۱۲/۳۸	$< .0001^{**}$
ترکیب × زمان	۳	۱۲۴/۶۱	$< .0001^{**}$
سطح × ترکیب × زمان	۹	۱۸/۴۸	$< .0001^{**}$

** معنی‌داری در سطح اطمینان یک درصد است حروف مشترک بیان‌گر معنی‌دار

نبودن در سطح اطمینان ۵ درصد است.

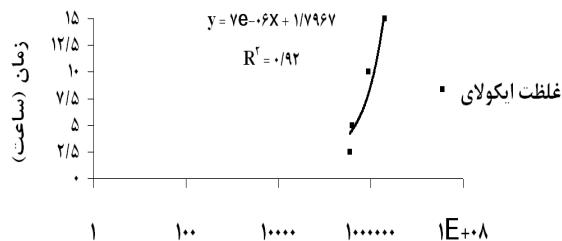
نتایج Conboy and Goss (2000) نشان داد در خاکهای

رسی و لومی با سنگ بسترهای آهکی و دولومیتی احتمال انتقال باکتری‌ها به آبهای زیرسطحی بیشتر است. چرا که این بسترها سریع هوادیده شده و احتمال ایجاد جریان‌های ترجیحی را در این خاکها افزایش می‌دهد. بنابراین می‌توان دریافت با وجود این که کربنات کلسیم اثر سمی بر زنده‌مانی باکتری ایکولای دارد، اما ممکن است در شرایط طبیعی به دلیل ویژگی‌های شیمیایی این نوع سازندها، باکتری‌های ایکولای به آبهای زیرسطحی منتقل شوند. در جدول شماره (۵) مقایسه میانگین غلظت باکتری‌های تیمار شده با سولفات کلسیم آورده شده است.

جدول شماره (۴): مقایسه میانگین غلظت باکتری ایکولای

تیمار شده با کربنات کلسیم ($10^3 \times CFU ml^{-1}$)

سطح (%) زمان (ساعت)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	میانگین
۲/۵	۵/۳۰ ^c	۳/۰۰ ^d	۴/۰۰ ^c	۲/۱۰ ^d	۳/۶۰ ^c
۵	۲۹/۲۳ ^b	۳/۳۷ ^{dc}	۰/۶۷ ^d	۰/۳۳ ^d	۸/۳۹ ^b
۱۰	۳۰/۰۰ ^b	۵/۵۰ ^c	۰/۶۷ ^d	۰/۶۷ ^d	۹/۲۱ ^b
۱۵	۶۴/۰۰ ^a	۲/۶۷ ^d	۰/۳۳ ^d	۰/۱۷ ^d	۱۶/۷۹ ^a
میانگین	۳۲/۱۳ ^a	۳/۶۳ ^b	۱/۴۲ ^b	۰/۸۲ ^b	



غلظت باکتری ایکولوی (CFU ml⁻¹)

شکل شماره (۱): غلظت باکتری ایکولوی در عصاره ۲۰:۱ کود گاوی به عنوان تابعی از زمان.

بنابراین، در بیشتر خاک‌های قابل کشت که سطح سولفات کلسیم و کربنات کلسیم در آنها پایین است با ثابت در نظر گرفتن سایر عوامل این باکتری‌ها براحتی در سطح ۲۰ درصد سولفات کلسیم و کربنات کلسیم رشد می‌کنند و در صورت کاربرد کودهای حیوانی در اراضی کشاورزی، احتمال انتقال این ریزجانداران بیماریزا به آبهای سطحی و زیرسطحی وجود دارد.

Personne (1998) گزارش کردند که قدرت زنده‌مانی باکتری ایکولوی در سازندهای آهکی با افزایش تنش رطوبتی، کمتر از باکتری‌های انتروکوکسی است. همچنین، رستمی (۱۳۸۵) گزارش کرد که پالایش باکتری سودوموناس فلورسنس در ستون‌های شن تیمار شده با کربنات کلسیم، بیشتر از ستون‌های شن تیمار شده با سولفات کلسیم است.

روند تغییرات غلظت باکتری ایکولوی در مخلوط ۴۰ درصد سولفات کلسیم و کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان در شکل شماره (۲) آورده شده است.

اثر سولفات کلسیم و کربنات کلسیم بر باکتری‌های ایکولوی متفاوت بود، به طوری که کربنات کلسیم اثر سوء و سولفات کلسیم اثر افزایشی بر رشد باکتری‌ها داشت.

در تیمار کربنات کلسیم کمترین غلظت ایکولوی در ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون مشاهده شد در حالی که در این زمان، بیشترین غلظت ایکولوی برای تیمار سولفات کلسیم مشاهده شد (شکل شماره (۳)).

همانند سطح ۲۰ درصد، در تمامی زمان‌های مورد بررسی غلظت باکتری‌ها در مخلوط شن-سولفات کلسیم بیش از شن-

سطح ۲۰ درصد، در زمان ۲/۵ ساعت رشد کرده است که تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۵ درصد با یکدیگر داشتند.

منحنی‌های به دست آمده پس از ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت انکوباسیون مخلوط‌های شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم

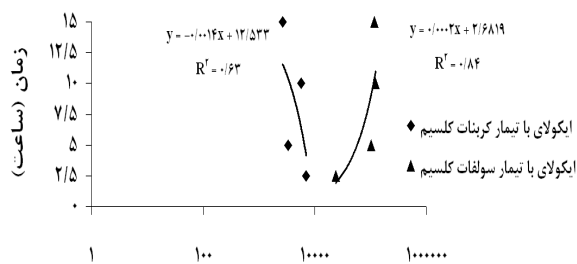
در شکل شماره (۱) غلظت باکتری ایکولوی در عصاره ۲۰:۱ کود گاوی در زمان‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون آورده شده است. کود گاوی محیط مناسبی برای رشد و فعالیت باکتری‌های ایکولوی است. به طوری که با گذشت زمان، غلظت باکتری‌ها افزایش یافت (شکل ۱، $R^2 = 0.92$).

Anderson (2002), Unc and Goss (2004), Goss and Richards (2007), Foppen and Schijven (2006) گزارش کردند که کودهای حیوانی محیط مناسب برای رشد و فعالیت ریزجانداران بیماریزا، بویژه باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، است. وجود چنین محیط مناسب و از طرفی قدرت زنده ماندن برخی ریزجانداران بیماریزای واگیردار برای مدت زمان زیاد باعث شده است که حتی به تیمارهای گندزایی آب مقاوم شوند (Anderson and Meyer, 1981; Hutchinson, et al., 2004; Avery, et al., 2004).

این موضوع، سبب افزایش هزینه‌های تصفیه آب شده است. زندسلیمی (۱۳۸۵) گزارش کرد که در اثر کاربرد کودهای آلی در خاک‌های کشاورزی با بافت‌های لوم رسی سیلتی و شن لومی آلودگی باکتری‌های کلی فرم روده‌ای^۵ در زه‌آب خاکها افزایش می‌یابد. همچنین، صحرایی (۱۳۸۷) این نتیجه را در اثر آیشویی خاک‌هایی با ساختمان منشوری، تکدانه‌ای و ستونی تیمار شده با کود گاوی آلودگی باکتریایی گزارش کرد.

در شکل شماره (۲) غلظت باکتری ایکولوی در مخلوط ۲۰ درصد سولفات کلسیم و کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان ذکر شده است. همان طور که در شکل شماره (۲) مشاهده می‌شود باکتری‌های ایکولوی با گذشت زمان در دو مخلوط شن-کربنات کلسیم و شن-سولفات کلسیم رشد کرده و محدودیتی در تشکیل کلنی ایجاد نشد. با گذشت زمان، جمعیت باکتری‌ها به شکل تقریباً خطی در هر دو مخلوط مورد بررسی افزایش یافت ($R^2 = 0.63$) و $R^2 = 0.85$). میزان باکتری ایکولوی رشد کرده حاصل از نمونه‌های مخلوط شن-سولفات کلسیم در تمامی زمان‌های مورد بررسی بیشتر از شن-کربنات کلسیم بود (شکل شماره ۲).

زمان‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون بیشتر بود که این نتیجه در سطوح ۲۰ و ۴۰ درصد هم مشاهده شد (شکل‌های شماره ۲، ۳ و ۴). همچنین، همبستگی غلظت باکتری‌های رشد کرده بر روی مخلوط شن-سولفات کلسیم، بیشتر از مخلوط شن-کربنات کلسیم در سطوح ۴۰، ۶۰ و ۲۰ درصد شد ($R^2 = 97\%$).



غلظت باکتری ایکولای ($CFU ml^{-1}$)

شکل شماره (۳): غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۴۰

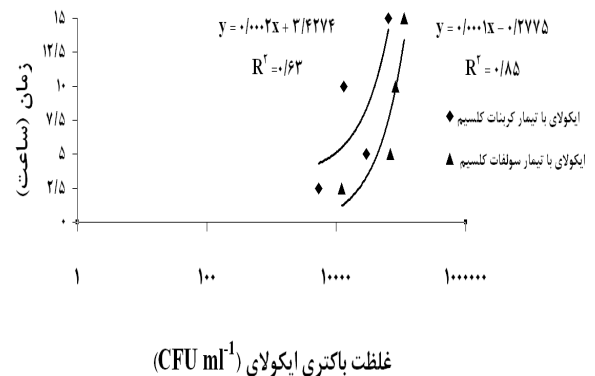
درصد شن-سولفات کلسیم و شن-کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان

به نظر می‌رسد که نه تنها ترکیب سولفات کلسیم اثر سوء بر رشد باکتری‌های ایکولای ندارد بلکه باکتری‌ها در حضور این ترکیب با گذشت زمان رشد چشمگیری دارند، به طوری که باکتری‌ها در این سطح سولفات کلسیم به شکل توانی رشد داشتند (شکل شماره ۵). این نتیجه با نتایج (Lim and Flint (1989) هماهنگ بود. این محققان گزارش کردند افزودن سولفات آمونیوم و برخی اسیدهای آمینه که حاوی ازت هستند سبب افزایش زنده‌مانی باکتری ایکولای می‌شود.

باکتری‌های ایکولای از گوگرد موجود در این ترکیبات برای سنتز پروتئین استفاده می‌کنند. شکل شماره (۵) تغییرات غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۸۰ درصد شن-سولفات کلسیم و شن-کربنات کلسیم را به عنوان تابعی از زمان نشان می‌دهد. رفتار باکتری‌ها در حضور مخلوط شن-سولفات کلسیم و شن-کربنات کلسیم همانند سطوح ۴۰ و ۶۰ درصد بود.

تغییرات غلظت باکتری‌های ایکولای در مخلوط شن-کربنات کلسیم با سطح ۸۰ درصد در فاصله زمانی ۲/۵ تا ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون تقریباً ۱۰ برابر کاهش یافت، در حالی که این تغییر در مورد مخلوط شن-سولفات کلسیم ۱۰ برابر افزایش داشت

کربنات کلسیم بود. همچنین، همبستگی داده‌های غلظت مخلوط شن-سولفات کلسیم بیش از شن-کربنات کلسیم بود ($R^2 = 84\%$).



شکل شماره (۲): غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۲۰

درصد شن-سولفات کلسیم و شن-کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان

(Avery, et al., 2004, 2005) گزارش کردند قدرت زنده‌مانی باکتری‌های ایکولای در لایه سطحی، ۶۰ ستون از خاک لوم شنی ۶ هفته، در حالی که در لایه‌های زیر سطحی به ۸ هفته می‌رسد. همچنین Stoddard, et al., 1998 دریافتند پس از سپری شدن ۶۰ روز از توزیع کود حیوانی در مرزعه، غلظت باکتری‌های کلی فرم کاهش می‌یابد.

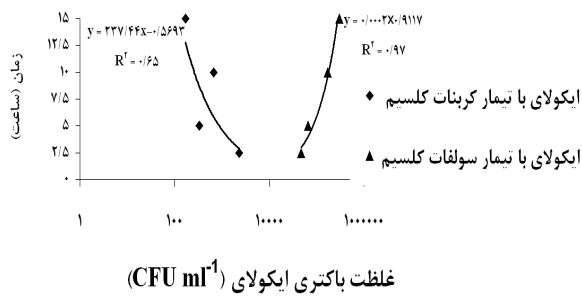
با توجه به این نتایج و گزارش‌ها می‌توان دریافت وجود کربنات کلسیم و به ویژه آمیون کربنات در مخلوط‌های مورد بررسی نقش بسیار زیادی در تسریع از بین بردن باکتری ایکولای در طی مدت زمان ۱۵ ساعت داشته است.

غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۶۰ درصد شن-سولفات کلسیم و شن-کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان در شکل شماره (۴) ذکر شده است.

در این سطح همانند سطح ۴۰ درصد، اثر سوء کربنات کلسیم در مخلوط شن-کربنات کلسیم بر باکتری‌های ایکولای مشاهده شد، به طوری که با گذشت زمان، اثر سمی بودن کربنات کلسیم بیشتر شد (شکل شماره ۴).

نسبت غلظت باکتری‌های ایکولای در مخلوط‌های شن-سولفات کلسیم به شن-کربنات کلسیم در زمان ۲/۵ ساعت پس از انکوباسیون تقریباً یک بود، در حالی که در زمان ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون این نسبت تقریباً ۱۰۰۰ برابر شد (شکل شماره ۴). غلظت باکتری‌های رشد کرده در مخلوط شن-سولفات کلسیم در تمامی

باکتری‌ها افزایش یافت. بیشترین ضریب همبستگی در سطح ۶۰ درصد کربنات کلسیم و سولفات کلسیم حاصل شد. همچنین، روابط رگرسیونی نشان داد که در سطوح ۶۰ و ۸۰ درصد، اثر افزایشی و کاهش سولفات کلسیم و کربنات کلسیم به صورت توانی است؛ در حالی که در سطوح ۲۰ و ۴۰ درصد، اثر دو ترکیب به صورت خطی مشاهده شد. اثر زمان‌های مورد بررسی نیز بر رشد باکتری‌ها زیاد بود، به طوری که با گذشت زمان در سطوح ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد، اثر سمی بودن کربنات کلسیم به‌طور چشمگیری افزایش یافت؛ در حالی که با گذشت زمان، رشد باکتری‌ها در حضور ترکیب سولفات کلسیم به‌طور چشمگیری افزایش یافت. به نظر می‌رسد که باکتری ایکولای از سولفات کلسیم و بویژه آنیون سولفات (SO_4^{2-}) در ساختار بدنی خود استفاده می‌کند، در حالی که آنیون کربنات (CO_3^{2-}) اثر سمی بر باکتری‌ها داشته است.



شکل شماره (۵): غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۸۰

درصد شن - سولفات کلسیم و شن - کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان

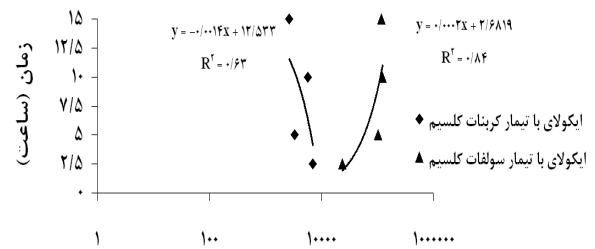
با توجه به نتایج به دست آمده و با در نظر گرفتن این مسئله که در کشور ایران سازندهای آهکی به وفور یافت می‌شوند (FAO, 1972، مؤذالهی و فرپور، ۲۰۰۹؛ خدوردیلو و همکاران، ۲۰۱۱) می‌توان از ترکیب کربنات کلسیم در تصفیه فاضلاب‌ها استفاده کرد و هزینه‌های تصفیه را کاهش داد.

یادداشت

- 1-Field Capacity
- 2- Eozin Methylene Blue
- 3- Sodium Adsorption Ratio
- 4- Electrical Conductivity
- 5- Fecal Coliform

(شکل شماره ۵). نتایج بررسی‌ها نشان داده است که قدرت زنده‌مانی ایکولای بسته به شرایط متغیر است. Bogosian, et al., (1996) گزارش کردند در قدرت زنده‌مانی ایکولای در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس ۶۰ روز و در دمای ۴ درجه سلسیوس، ۱۰۰ روز است. Cools, et al., 2001, Topp, و Sorenson, et al., (1999), et al., (2003) قدرت زنده‌مانی ایکولای را بین ۴۲ تا کمتر از ۸۰ روز گزارش کردند.

مقایسه نتایج محققان فوق و نتایج حاصل از این پژوهش مبین نقش مؤثر کربنات کلسیم بر کنترل رشد و زنده‌مانی باکتری ایکولای است. ضریب همبستگی به دست آمده از مخلوط مخلوط شن - سولفات کلسیم و شن - کربنات کلسیم به ترتیب ۹۷ و ۶۵ درصد بود که این ضریب در مخلوط شن - کربنات کلسیم نسبت به سطح ۶۰ درصد کاهش یافت. همچنین، غلظت باکتری‌ها در حضور ترکیب سولفات کلسیم و کربنات کلسیم همانند سطح ۶۰ درصد به ترتیب به صورت توانی افزایش و کاهش یافت.



غلظت باکتری ایکولای (CFU ml⁻¹)

شکل شماره (۴): غلظت باکتری ایکولای در مخلوط ۶۰

درصد شن - سولفات کلسیم و شن - کربنات کلسیم به عنوان تابعی از زمان

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که رشد باکتری‌های ایکولای در مخلوط شن - کربنات کلسیم و شن - سولفات کلسیم تحت تأثیر قرار می‌گیرد؛ به طوری که اثر سویی در سطح پایین کربنات کلسیم و سولفات کلسیم بر رشد باکتری‌های ایکولای مشاهده نشد. ما با افزایش سطح کربنات کلسیم، رشد باکتری‌ها کاهش یافت. میانگین جمعیت باکتری رشد کرده در مخلوط شن - کربنات کلسیم، کمتر از مخلوط شن - سولفات کلسیم شد.

از طرفی، هیچ‌یک از سطوح سولفات کلسیم بررسی شده، اثر سوء بر رشد ایکولای نداشت و با افزایش سطح میزان رشد

منابع مورد استفاده

- رستمی، ک. ۱۳۸۵. بررسی اثر مقادیر مختلف آهک و گچ بر انتقال باکتری سودوموناس فلورسنس در ستون‌های شنی تحت شرایط رطوبتی اشباع و غیراشباع. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- زندسلیبی، س. ۱۳۸۵. بررسی اثر ویژگی‌های فیزیکی خاک و کودهای آلی بر حرکت باکتری‌های آلوده‌کننده آبهای زیرزمینی در ستون‌های خاک دست-نخورده، پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- صحرائی، ن. ۱۳۸۷. بررسی اثر ساختمان خاک بر حرکت باکتری ایشریشایی کولی در شرایط اشباع و غیراشباع. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- صفری سنجانی، ع.ا. ۱۳۸۲. بیولوژی و بیوشیمی خاک. چاپ اول. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- Aakra, A., M., Hesselsoe, L.R., Bakken. 2000. Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Microbiology Ecology*. 39: 222–235.
- Avery, S.M., et al. 2004. Escherichia coli O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 2101–2103.
- Avery, S.M., Walters, L.D. and Hutchinson, M.L. 2005. Fate of Escherichia coli O157 and detection of STX phage during fermentation of maize an animal feed stuff. *Lett. Journal of Applied Microbiology*, 40: 99-105.
- Boes, J., et al. 2005. Survival of Escherichia coli and Salmonella Typhimurium in slurry applied to clay soil on a Danish swine farm. *Preventive veterinary medicine*. 69: 213–228.
- Bogorian, G., et al. 1996. Death of the Escherichia coli K-12 strain W3110 in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4114-4120.
- Conboy, M.J., M.J. Goss. 2000. Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. *Water Air and Soil Pollution*. 129: 101-118.
- Cools, D., et al. 2001. Survival of E. coli and Enterococcus spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* 17, 53-62.
- FAO/UNDP. 1972. Calcareous Soils. Report of the Regional Seminar on Reclamation and Management of Calcareous Soils. 27 November–2 December, Cairo, Egypt.
- Farpour, et al. 2004. Mode of gypsum deposition in southeastern Iranian soils as revealed by isotopic composition of crystallization water. *Geoderma*. 121: 233-242.
- Foppen, J.W.A., J.F., Schijven. 2006. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of Escherichia coli and thermo tolerant coli forms in aquifer under saturated conditions. *Water Resources Journal*, 40: 401-426.
- Foppen, J.W.A., A., Mporokoso, J.F., Schijven. 2005. Determining straining of Escherichia coli from breakthrough curves. *Journal of Contaminant Hydrology*, 76: 191–210.
- Foppen, J., et al. 2007. Transport of Escherichia coli and solutes during waste water infiltration in an urban alluvial aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 95: 1-16.

- Gerba, C.P., G., Bitton .1984. Microbial pollutants: Their survival and transport pattern to groundwater. In: Bitton, G. and Gerba, C.P. (Eds.) "Groundwater Pollution Microbiology". pp. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. pp. 746.
- Gerba, C.P., C., Wallis, J.L., Melnick .1975. Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 101: 157-174.
- Goss, M., C., Richards .2007. Development of a risk-based index for source water protection planning, which supports the reduction of pathogens from agricultural activity entering water resources *Journal of Environmental Management*, 89: 1-9.
- Halverson, L.J., T.M., Jones, M.K., Firestone .2000. Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress. *Soil Science Society of American Journal*, 64: 1630-1637.
- Harris, P.J. 1994. Consequences of the spatial distribution of microbial communities in soil. In: beyond the biomass. Chichester, UK: John Wiley & sons. P: 239-246.
- Hutchinson, M.L., et al. 2004. Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Lett. Applied and Environmental Microbiology*, 66: 887-893.
- Khodaverdiloo, H., M.Th., van Genuchten, Sh., Ghorbani Dashtaki .2011. Deriving and validating pedotransfer functions for some calcareous soils. *Journal of Hydrology* 399: 93-99.
- Kibbey, H.J., C., Hagedorn, E.L., McCoy .1978. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 711-717.
- Lim, C.H., K.P., FLINT .1989. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *Journal of Applied Microbiology*, 66: 559-569.
- Luna, M.L., et al. 2003. Mineralization of C-14 labeled maize in alkaline saline soils". *Plant and Soil Journal*, 250: 29-38.
- McMurry, S.W., M.S., Coyne, E., Perfect .1998. Fecal coli form transport through intact soil blocks amended with poultry manure. *Journal of Environmental Quality*, 27: 86-92.
- Moazallahi, M., M.H., Farpoor .2009. Soil Micromorphology and Genesis along a Climotoposequence in Kerman Province, Central Iran *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 4078-4084.
- Mubiru, D.N., M.S., Coyne, J.H., Grove .2000. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality*, 29: 1821-1825.
- Neely, A.N. 2000. A survey of Gram- negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *Burn Care and Rehabilitees Journal*, 21: 523-527.
- Or, D., M., Tuller .2000. Flow in unsaturated fractured porous media: hydraulic conductivity of rough surfaces. *Water Resources Research*, 36: 1165-1177.
- Or, D., et al. 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media-A review. *Advanced. Water Resources*, 30(6): 1505-1527.

Personne, et al. 1998. Survival, transport and dissemination of *Escherichia coli* and enterococci in a fissured environment. Study of a flood in a karstic aquifer. *Journal of Applied Microbiology*, 84:431-438.

Reddy, K.R., R., Khaleel, M.R., Overcash .1981. Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *Journal of Environmental Quality*, 10: 255-266.

Rietz, D.N., R.J., Haynes .2003. Effect of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 845-854.

Rüprich, A. 1994. Field studies on the infiltration capacity and the viability of fecal bacteria in the soil after manure fertilization. Ph.D. Thesis. University of Hohenheim, Germany.

Sorensen, S.J., T., Schyberg, R., Ronn .1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 11:79-90.

Stoddard, C.S., M.S., Coyne, J.H., Grove .1998. Fecal bacterial survival and infiltration through a shallow agricultural soil: Timing and tillage effects. *Journal of Environmental Quality*. 27, 1516-1523.

Tate, R.L. 1978. Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in Histosols. *Applied Environmental Microbiology*, 35: 925-929.

Topp, E., et al. 2003. Strain-dependent arability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 44:303-308.

Unc, A. 2002. Importance of manure properties for the vadose zone transport and survival of manure bacteria. Ph.D. Thesis. Univ. Guelph, Guelph, Ont., Canada.

Unc, A., M.J., Goss .2003. Movement of fecal bacteria through the vadose zone. *Water Air Soil Pollution*, 149: 327-337.

Unc, A., M.J., Goss .2004. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Applied Soil Ecology*, 25: 1-18.

Zahran, H.H., A.M., Moharram, H.A., Mohammad .1997. Diversity, adoption and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology Fertility Soils*, 25: 211-223.