فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۱، جلد ۱۱، شماره ۲، بهار ۹۷، صفحه ۱ تا ۱۶

تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر فیزیولوژی تولید مثل و رشد کرم خاکی، ریزجانوران و جامعه میکروبی در خاک‌های آهکی

اکبر حسنی[۱]، مریم اعتمادیان[۲]، حمید خطیبی[۳]

۱- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان. ایران. Akbar.hassani@znu.ac.ir

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان زنجان. ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان زنجان. ایران.

تاریخ دریافت:۹۶/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: اسیدهای آلی و معدنی با تاثیر بر برخی ویژگی‌های خاک مانند pH و هدایت الکتریکی و یا با تغییر انحلال-پذیری برخی ترکیبات جامد خاک، می‌توانند روی تولیدمثل و رشد موجودات زنده خاک تاثیرگذار باشند. کاربرد این اسیدها در خاک‌های آهکی ایران به عنوان اصلاح کننده رایج است. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر فیزیولوژی رشد و تولید مثل کرم خاکی، ریزجانوران و جامعه میکروبی در خاک‌های آهکی بود.

روش کار: این آزمایش روی یک خاک آهکی زراعی در ظرف‌های مخصوص در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. اسید سیتریک، اسید استیک، اسید اگزالیک با غلظت ۵ و ۱۰میلی‌مولار، مخلوط سه اسید آلی هرکدام با غلظت ۳/۳۳ میلی‌مولار، اسید سولفوریک و اسید فسفریک هرکدام با غلظت ۵ میلی‌مولار استفاده شد. ظروف محتوی ۱ کیلوگرم خاک به مدت ۲۰ روز در دمای اتاق قرار گرفتند. در پایان تعداد ریزجانوران خاک و جمعیت جامعه میکروبی در هر تیمار شمارش شدند. برای بررسی رشد و تولید مثل کرم خاکی یک آزمایش جداگانه طراحی گردید. به مخلوط خاک و کود گاوی تازه، تیمارهای فوق اعمال شده و با کرم خاکی تلقیح و ٥٦ روز در دمای اتاق قرار گرفت. در پایان تعداد کل کرم‌های نوزاد، کرم‌های بالغ، کوکون‌های تولید شده و وزن کل کرم‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: کاربرد اسیدها باعث کاهش pH و افزایش هدایت الکتریکی در خاک‌ها شد. اسید فسفریک و اسید سیتریک موجب افزایش تعداد کوکون‌های کرم خاکی و سایر اسیدها باعث کاهش تعداد آن ها گردیدند. اسید سیتریک موجب افزایش تعداد کرم نوزاد شد ولی سایر تیمارها تعداد نوزادان را کاهش دادند. اسید فسفریک تعداد کرم‌های بالغ را کاهش داد اما وزن آن ها را بیشتر نمود. در سایر تیمارها تعداد و وزن کرم‌های خاکی کاهش یافت. کاربرد اسیدهای آلی و معدنی موجب کاهش تولیدمثل نماتدها، آمیب‌ها، تاژکداران و مژکداران شد. جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌های خاک در همه اسیدها به‌جز اسید سولفوریک منجر به افزایش جمعیت باکتری‌های خاک شد.

نتیجه¬گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که اسیدهای آلی و معدنی با کاهش pH خاک و افزایش انحلال کانی¬ها و یا عمل به عنوان یک ماده غذایی و یا مهارکننده رشد بر جمعیت کرم¬های خاکی، ریزجانوران و جامعه میکروبی خاک تاثیرگذار هستند که این تاثیر بسته به نوع اسیدها و غلظت آن ها متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: فون خاک، اسید سیتریک، اسید فسفریک، اسید سولفوریک.

مقدمه

عمده خاک های کشور ایران آهکی می باشند. مقدار pH در خاک های آهکی بیش از ۷ بوده و به ۸/۵ نیز می¬رسد. بالا بودن pH در این خاک ها موجب کاهش قابلیت دسترسی برخی عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان مانند آهن، روی، مس و منگنز می-شود. در خاک های آهکی ایران، کاربرد اسیدهای آلی و معدنی که در طولانی مدت منجر به کاهش pH

خاک شوند، امری رایج می باشد. کاهش pH ناشی از کاربرد اسیدها در خاک های آهکی باعث افزایش غلظت عناصر غذایی ضروری مانند فسفر، آهن، روی، مس و منگنز در محلول خاک می شود. استفاده از اسیدهای آلی و معدنی در خاک های آهکی افزون بر کاهش تدریجی مقدار pH محلول خاک، ممکن است مزایای دیگری نیز داشته باشد. اسیدهای آلی قادر به کلات کردن عناصر فلزی هستند و از این طریق نیز قادر به افزایش قابلیت جذب آن ها می باشند(۲۲). هم-چنین این اسیدها به عنوان یک منبع ساده کربن می-توانند باعث افزایش جمعیت میکروارگانیسم های خاک شوند(۲۳). زیستگاه خاک شامل تعداد زیادی از موجودات زنده از سطوح مختلف غذایی می باشد و در صورتی که فقط چند گونه اندک از آن ها تحت تاثیر عاملی قرار بگیرند، ممکن است همه موجودات زنده خاک را تحت تاثیر قرار دهند. کرم های خاکی و ریزجانوران خاک از آن دسته موجودات زنده خاک هستند که نقش مهمی در ایجاد تعادل اکولوژیکی در خاک دارند(۳). این موجودات همواره در معرض تماس با ترکیبات و نهاده های مختلفی که توسط کشاورزان در خاک های زراعی استفاده می کنند، قرار دارند. اهمیت این موجودات به حدی می باشد که از آن ها به عنوان شاخصی برای تعیین سلامت خاک استفاده می شود(۶). کاربرد اسیدهای آلی و معدنی در خاک های کشاورزی اگرچه موجب برخی مزیت ها می شود اما تاثیر آن بر فیزیولوژی رشد و تولید مثل کرم های خاکی و ریزجانوران مفید خاک مانند تاژکداران، مژکداران، آمیب ها و نماتدها چندان مشخص نیست. کرم های خاکی با بیش از ۳۰۰۰ گونه تمام چرخه زندگی خود را داخل خاک سپری می-کنند. تنفس آن ها به شکل پوستی و از طریق روزنه-های روی آن می باشد و از نور مستقیم آفتاب و خشکی دوری می کنند. حدود ۸۵ درصد از بدن آن ها را آب تشکیل داده و جذب و دفع نیز از طریق دیواره بدن صورت می گیرد. کرم¬های خاکی جانورانی خونسرد و دارای پنج قلب می¬باشند که در صورت آسیب فیزیکی سعی بر ترمیم و بازسازی قسمت های آسیب دیده خود می کنند. در تولید مثل کرم خاکی فاصله دو نسل(از تخم تا تخم) در شرایط طبیعی حدود سه ماه و طول عمر کلی کرم ها نیز حدود یک تا دو سال می باشد. زمان لازم برای بلوغ کرم های خاکی ۶۰ تا ۹۰ روز بوده و جمعیت کرم ها در عرض ۲ تا ۴ ماه دوبرابر می شود. وزن هر کرم بین نیم تا ۱ گرم می-باشد(۲۵). کرم های خاکی هرمافرودیت بوده و هم زمان اندام جنسی نر و ماده را دارا هستند ولی برای تولیدمثل معمولاً دو کرم متفاوت با یک دیگر جفت-گیری می کنند. دو کرم بالغ از طریق اندامک کلیتلوم به یک دیگر می چسبند و اسپرم از طریق منافذ پوست به اندامک جنسی کرم دیگر وارد می شود. کرم ها ماده ای ترشح می کنند که باعث می شود انتقال اسپرم در شرایط امنی انجام شود. هر دو کرم تا زمان لقاح اسپرم با تخمک موجود در کلیلتوم در امتداد بدن یک-دیگر حرکت می کنند. هر کرم بالغ می تواند به طور میانگین در هر سه روز یک کوکون ایجاد کند که مدت ۲۳ روز پس از آن از هر کوکون یک تا سه نوزاد خارج می گردد اما تمام نوزادان خارج شده از کوکون زنده نمی مانند. به طور میانگین تعداد این کرم ها می-تواند تا سی برابر افزایش یابد. این کرم ها در خارج از سفره های غذایی خود حرکت نمی کنند(۸). اسیدهای آلی و معدنی با تاثیر برخی ویژگی های خاک مانند pH و هدایت الکتریکی و یا با تغییر انحلال پذیری برخی ترکیبات جامد خاک، می توانند روی تولیدمثل و رشد این موجودات تاثیرگذار باشند. اسپیرینگت و همکاران(۱۹۸۴) گزارش نمودند که با تغییر pH خاک

به اضافه نمودن کلسیم کربنات و کلسیم هیدروکسید، جمعیت کرم¬های خاکی نیز تغییر می کند(۴۳). آنان هم چنین گزارش نمودند که بالا رفتن فشار اسمزی ناشی از انحلال کلسیم نیترات در محلول خاک باعث کاهش جمعیت کرم های خاکی می شود. پروتوزوئرها جانداران یوکاریوت تک سلولی هستند که به قلمرو آغازیان تعلق دارند. پروتوزوئر جاندار کاملی است که همه فعالیت های حیاتی آن در درون یک سلول صورت می گیرد. این گروه بیشتر یوکاریوت های تک سلولی را به سبب ساختار ساده شامل می شود. این گروه بسیار ناهمگن است و برخی از اعضای آن را می-توان به سلسله های پرسلولی گیاهان، جانوران و قارچ‌ها نسبت داد. آمیب‌ها، تاژکداران و مژکداران از گروه-های اصلی و شاخص در پروتوزوئرها می-باشد(۱۶). تولیدمثل در این گروه به صورت غیرجنسی وجود دارد. تولیدمثل غیرجنسی به روش دوتا شدن، جوانه زدن و تشکیل کیست می‌باشد. در روش دوتا شدن ابتدا هسته جانور به نزدیکی مخزن یعنی به نزدیکی پایه تاژک ها می رود و به روش میتوز تقسیم می شود. به دنبال تقسیم هسته، جسم پایه، لکه چشمی، تاژک و غیره نیز با یک برآمدگی و فرورفتگی طولی تقسیم می‌شود و در نتیجه دو سلول شبیه به هم به وجود می-آید. تقسیم چندتایی در زمان کیستی رخ می دهد. پروتوزوئر با از دست دادن تاژک های خود کروی شکل می شود و با ترشح یک لایه ضخیم به نام کیست به دورخود آماده تقسیم چندتایی می شود. برای این منظور ابتدا با تقسیم دوتایی مضاعف می شود و سپس هر سلول با تقسیم مجدد دو سلول دیگر را به وجود می‌آورد. این تقسیمات ممکن است در نهایت به ۳۲-۱۶ سلول دختری بیانجامد(۱۴). نماتدها به گروهی از جانوران پرسلولی و کرمی یا نخی شکل گفته می‌شود که دارای ساختمان غیر بندبند هستند و در یک یا دو انتها ممکن است باریک¬تر شده باشند. نماتدها فاقد دستگاه گردش خون و تنفس هستند و اکسیژن لازم برای تنفس خود را از طریق نفوذ به دیواره بدن بدست می‌آورند. نماتدها موجوداتی دوجنسی هستند و دارای افراد نر و ماده بوده و تولیدمثل از طریق جفت گیری انجام می‌شود و مانند حشرات به¬نظر می‌رسد، فرمون‌های جنسی در جلب نرو ماده موثر باشند. بکرزایی و هرمافرودیسم(نرمادگی) نیز در نماتدها دیده شده است. دوره زندگی نماتدها شامل یک مرحله تخم، ۴ مرحله لاروی و یک مرحله بلوغ می‌باشد. هر نماتدی در طول زندگی خود ۴ بار تغییر جلد انجام می‌دهد و معمولاً اولین تغییر جلد در داخل تخم انجام می‌شود و نماتد به صورت لارو سن ۲ از تخم خارج می‌شود. به طور کلی نماتدها موجودات هوازی هستند و برای فعالیت احتیاج به اکسیژن دارند ولی دستگاه‌های خاص برای تنفس ندارند(۲۹). تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر جمعیت جامعه میکروبی خاک نیز مبهم است. مطالعات گسترده ای موکد این موضوع است که بین جمعیت میکروبی خاک و شرایط محیطی همبستگی زیادی وجود دارد. برخی ویژگی های خاک مانند موقعیت جغرافیایی(۲۶، ۱۵)، بافت خاک(۴۲)، نوع کاربری اراضی(۲۰، ۴)، pH خاک(۲۶، ۲۰، ۵)، حضور مواد غذایی در خاک(۱۹، ۷)، مواد آلاینده(۳۰) و عناصر سنگین(۲۸) بر جمعیت گروه های مختلف میکروبی خاک موثر است. pH خاک یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر زی¬توده، فعالیت و ترکیب جامعه زیستی خاک ها می¬باشد(۳۹،۴۰، ۳۶، ۲۷، ۲۴). در پژوهشی راسک و همکاران(۲۰۰۹) گزارش نمودند که با کاهش pH از ۸/۳ به ۴/۵ افزایش پنج برابری در جمعیت قارچ های خاک رخ داد در حالی که در همین فاصله جمعیت باکتری ها کاهش یافت(۴۰). در پژوهشی دیگر راسک و همکاران(۲۰۰۹) گزارش

نمودند که نسبت جمعیتی و رشد قارچ ها و باکتری ها تحت تاثیر pH خاک به دلیل رقابت بین آن ها می‌باشد و در pH بالاتر رشد باکتری ها مانع از رشد قارچ ها می شود و این اتفاق به طور معکوس نیز در pH پایین رخ می دهد(۳۹). با توجه به مطالعات صورت گرفته به نظر می رسد تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی در خاک ها بر فیزیولوژی رشد و تولیدمثل کرم های خاکی و ریزجانوران خاک و هم چنین جامعه میکروبی خاک نیاز به مطالعات بیشتری دارد. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر فیزیولوژی رشد و تولیدمثل کرم خاکی، ریزجانوران و جامعه میکروبی در خاک های آهکی می باشد.

مواد و روش ها

طرح آماری و تیمارها

این آزمایش در ظرف های مخصوص از جنس پلی اتیلن با ظرفیت ۵ کیلوگرم خاک صورت گرفت. خاک مورد استفاده از یک قطعه زمین قابل کشت متعلق به مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان تهیه و نمونه ای از آن برای تعیین برخی ویژگی های فیزیکی-شیمیایی به آزمایشگاه فرستاده شد. مقدار pH گل اشباع و هدایت الکتریکی عصاره گل اشباع خاک استفاده شده در این آزمایش به ترتیب برابر با ۷/۴۹ و ۰/۸۶ میکروزیمنس بر سانتی¬متر بود. درصد کربنات کلسیم معادل و مواد آلی در آن به ترتیب ۱۷/۲ و ۰/۴۳ بود. بر این اساس خاک آهکی محسوب شده و ویژگی‌های مخصوص این خاک ها را دارا می¬باشد(۱۳). برای بررسی تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر تولید مثل ریزجانوران و جامعه میکروبی خاک، یک طرح آزمایشی آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاه با تیمارهای زیر انجام شد: تیمار ۱: اسید سیتریک با غلظت ۵ میلی مول بر لیتر(C5)، تیمار ۲: اسید سیتریک با غلظت ۱۰ میلی‌مول بر لیتر(C10)، تیمار ۳: اسید استیک با غلظت ۵ میلی-مول بر لیتر(A5)، تیمار ۴: اسید استیک با غلظت ۱۰ میلی‌مول بر لیتر(A10)، تیمار ۵: اسید اگزالیک با غلظت ۵ میلی مول بر لیتر(O5)، تیمار ۶: اسید اگزالیک با غلظت ۱۰ میلی‌مول بر لیتر(O10)، تیمار ۷: کاربرد مخلوط اسیدهای آلی سیتریک، استیک و اگزالیک هرکدام با غلظت ۳/۳۳ میلی مول بر لیتر(Mix)، تیمار ۸: اسید سولفوریک با غلظت ۵ میلی مول بر لیتر(S)، تیمار ۹: اسید فسفریک با غلظت ۵ میلی مول بر لیتر(P) و تیمار ۱۰: تیمار شاهد بدون کاربرد اسید. هر تیمار در سه تکرار انجام شده و در نهایت جامعه آماری شامل ۳۰ ظرف آزمایشی از ۱۰ تیمار و سه تکرار می باشد. علت انتخاب این اسیدها بر مبنای غلظت های رایج آن-ها در خاک ریزوسفری در محدوده ریشه گیاهان بود(۲۳). محلول¬های مورد نیاز اسید سیتریک، استیک و اگزالیک در دو سطح غلظتی ۵ و ۱۰ میلی مول بر لیتر و اسید فسفریک و اسید سولفوریک با غلظت های ۵ میلی مول بر لیتر تهیه شدند. حجم ساخت محلول¬ها به اندازه¬ای بود که رطوبت خاک را تا حدود رطوبت ظرفیت مزرعه برساند. کلیه محلول-ها از مواد شیمیایی با درصد خلوص بالا و تهیه شده از شرکت Merck آلمان است. ظروف محتوی یک کیلوگرم خاک به مدت ۲۰ روز در شرایط آزمایشگاه در دمای اتاق ۲۲-۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. حفظ رطوبت با استفاده از محلول های هر تیمار انجام شد به نحوی که هر پنج روز یک بار مقدار ۱۰۰ میلی¬لیتر از هر محلول هر تیمار به نمونه ها اضافه می گردید. در پایان تعداد ریزجانوران خاک و جمعیت جامعه میکروبی در هر تیمار به روش های استاندارد شمارش شدند.

تولید مثل در نماتدهای خاک

برای تعیین روند تولیدمثل در نماتدها، سه نمونه خاک ۵۰ گرمی از هر تیمار پس از چندین بار مخلوط کردن، انتخاب و نماتدهای هر نمونه با استفاده از روش سینی و در دمای آزمایشگاه ۲۶-۲۳ درجه سلسیوس استخراج گردید(۴۵). خاک مخلوط شده روی سینی قرارگرفت و آب حاوی نماتد(محتوای سینی) دو بار و طی دو روز متوالی از الک ۴۰۰ مش عبورداده و نماتدهای جمع آوری شده در الک در بشر کوچک جمع آوری شده و با استفاده از استریومیکروسکوپ در سه تکرار شمارش شده و میانگین آن ها در نظر گرفته شد.

تولید مثل در پروتوزوئرهای خاک

برای تعیین تولید مثل پروتوزوئرهای خاک از روش ادل و کولمن استفاده گردید(۱). بدین منظور شش نمونه یک گرمی خاک تازه(بدون خشک کردن و یا الک نمودن) از هر ظرف به داخل لوله آزمایش منتقل و ۳ میلی لیتر آب دیونیزه استریل به آن اضافه شد. برای شمارش تاژکداران کوچک(کوچک تر از ۱۵ میکرومتر) از لام هموسیتومتر استفاده گردید. حجم ۰/۱ میلی لیتر از محلول خاک روی لام و تعداد تاژکداران با بزرگنمایی ۴۰۰ زیر میکروسکوپ وارونه شمارش شدند. در صورت بالا بودن جمعیت، رقیق-سازی با آب دیونیزه استریل انجام گردید. برای شمارش تاژکداران بزرگ(بزرگ تر از ۱۵ میکرومتر) و مژکدارن، عصاره خاک در یک پتری دیش جمع-آوری و زیر میکروسکوپ وارونه شمارش شدند. برای تخمین جمعیت آمیب ها نیز قطراتی از سوسپانسیون خاک روی یک محیط کشت جامد محتوی ۱/۵ درصد آگار بدون مواد غذایی ریخته شده و به مدت یک روز در محیط تاریک انکوباسیون گردیدند. آمیب‌ها در این مدت به سمت لبه قطرات حرکت می-کنند. تعداد آمیب ها نیز با میکروسکوپ وارونه زمینه سیاه با بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش گردید. از هر نمونه خاک شش تکرار مورد شمارش قرار گرفته و میانگین آن شش تکرار گزارش شد.

تولید مثل باکتری ها و قارچ های هتروتروف خاک

تعداد جمعیت باکتری ها در نمونه ها با استفاده از کشت پلیت انجام شد. برای شمارش کل باکتری ها ۱۰ گرم خاک به ۹۰ میلی لیتر آب استریل افزوده و سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر(۱۲۰ دور در دقیقه) تکان داده و به مقدار ۷-۱۰ مرتبه در آب استریل رقیق و از هر رقت ۰/۱ میلی لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت نوترینت آگار با غلظت ۱۵ گرم در لیتر انجام گردید(۲۳). برای جلوگیری از رشد قارچ ها، ۵۰ میلی گرم بر لیتر نیستاین به محیط کشت باکتری اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس شمارش کلونی ها انجام و میانگین آن ها در نظر گرفته شد(۹). برای شمارش کل قارچ های خاک ۱۰ گرم خاک به ۹۰ میلی لیتر آب استریل افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر(۱۲۰ دور در دقیقه) مخلوط گردید. از این سوسپانسیون رقت های مختلف ۳-۱۰ تا ۸-۱۰ تهیه و از هر رقت مقدار ۰/۱ میلی لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت مارتین آگار شامل رزبنگال و استرپتومایسین(پپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۵ گرم، گلوکز ۱۰ گرم، دی هیدروژن مونوپتاسیم فسفات ۰/۵ گرم، آگار ۱۵ گرم، رزبنگال ۰/۱۴ گرم و استرپتومایسین ۰/۰۶ گرم در هر لیتر محیط کشت) اضافه و پتری دیش های محیط کشت به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباتور شدند(۳۲). پس از گذشت این زمان، کلونی-های منفرد شمارش شده و میانگین آن ها در نظر گرفته شد. برای بررسی تولیدمثل در کل اکتینوباکتری-ها از سوسپانسیون۱-۱۰ آماده شده، رقت های مختلف

۶-۱۰ تا ۸-۱۰ تهیه و از هر رقت در ۵ تکرار مقدار ۰/۱ میلی لیتر بر روی محیط کشت گلیسرول آرژنین آگار(GAA) ۶ میلی لیتر گلیسرول خالص، ۰/۵ گرم آرژنین، ۱ گرم گلوکز، ۰/۳ گرم دی هیدروژن مونوپتاسیم فسفات، ۰/۲ سولفات منیزیم ۷ آبه، ۰/۳ گرم کلرور سدیم، ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب دیونیزه) قرار گرفت. برای جلوگیری از رشد قارچ ها، ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر نیستاتین به محیط کشت اضافه گردید. برای جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی ۵۰ میلی گرم بر لیتر نالیدیکسیک اسید به محیط کشت اضافه گردید. برای جلوگیری از رشد سایر میکروارگانیسم ها نیز پیش تیمار دمایی یا دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت اعمال شد. محیط-های کشت به مدت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس انکوباسیون و کلونی هایی با ظاهر خشک، شکننده و پودری به عنوان اکتینوباکتری ها شمارش گردیدند(۳۱).

تولید مثل کرم خاکی

برای بررسی تاثیر اسیدهای آلی و معدنی بر رشد و تولیدمثل کرم خاکی یک آزمایش جداگانه طراحی شد. بدین منظور نمونه های خاک به وزن ۲ کیلوگرم و نمونه کود گاوی تازه به وزن ۰/۵ کیلوگرم به ظرف-های مخصوص اضافه شده و تیمارهای آزمایشی اعمال شده و پس از رساندن رطوبت در حد ظرفیت مزرعه، نمونه ها با کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* تلقیح شدند. بدین منظور ۲۵ عدد کرم خاکی به وزن کل ۱۲/۵ گرم به هر ظرف اضافه گردید. همه ظرف ها در یک اتاق تاریک و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با رطوبت ۷۵ درصد ظرفیت نگهداری آب به مدت ۵۶ روز قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان برای بررسی تولید مثل، تعداد کل کرم های نوزاد، کرم های بالغ و کوکون های تولید شده شمارش گردیدند. هم چنین برای بررسی رشد، وزن کل کرم ها از هر نمونه سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و میانگین سه تکرار گزارش شده اندازه گیری گردید.

نتایج

فیزیولوژی تولید مثل کرم خاکی

تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر تولیدمثل و رشد کرم خاکی در جدول ۱ دیده می شود. تعداد کوکون ها و نوزادان، میزان زادآوری کرم های خاکی را تعیین می کند. تعداد کوکون ها نشان دهنده تمایل کرم های خاکی به تولید مثل می باشد. هر چقدر شرایط محیطی برای کرم های خاکی مناسب تر باشد تمایل آن ها به تولید کوکون بیشتر شده و در نتیجه کوکون بیشتری تولید می کنند. بیشترین تعداد کوکون در تیمار اسید فسفریک با ۸۲ عدد و کمترین تعداد کوکون نیز در تیمار اسید سولفوریک با تعداد ۴۸ عدد دیده شد. کاربرد اسید سیتریک در غلظت ۵ میلی‌مولار نیز موجب افزایش تعداد کوکون ها نسبت به شاهد گردید، ولی با افزایش غلظت آن به ده میلی مولار، تعداد کوکون ها نسبت به تیمار شاهد کمتر شد. به نظر می رسد اسید سیتریک با غلظت پایین روی تمایل کرم‌های خاکی برای تولید مثل تاثیرگذار باشد. در سایر تیمارها کاربرد اسیدها موجب کاهش تعداد کوکون ها گردیده که نشان می دهد تغییرات ناشی از pH روی تولیدمثل کرم خاکی موثر می باشد. تعداد کرم های نوزاد نیز نشان دهنده مناسب بون شرایط موجود در بستر برای تبدیل کوکون ها به کرم های خاکی می باشد. کاربرد اسیدها در همه تیمارها به جز تیمار با اسید سیتریک موجب کاهش تعداد نوزادان نسبت به تیمار شاهد شده است. تعداد نوزادان در تیمار خاک با اسید سیتریک در غلظت ۱۰ میلی مولار بیشتر از ۵ میلی مولار است. تعداد کرم های بالغ نیز متاثر از تعداد نوزادان در تیمار با اسیدها کاهش پیدا می نماید.

تعداد کرم های خاکی در همه تیمارها کمتر از تیمار شاهد است. کمترین تعداد کرم خاکی در تیمار اسید سولفوریک با تعداد ۱۸ کرم دیده شد. در تیمار خاک با اسید سیتریک نیز تعداد کرم های خاکی کاهش یافت. بیشترین وزن کل کرم ها نیز در تیمار با اسید فسفریک دیده شد. وزن کل کرم ها در این تیمار ۱۵/۴ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد داشت. در سایر تیمارها حضور اسیدهای آلی و معدنی منجر به کاهش وزن کرم ها نسبت به تیمار شاهد شد. کمترین وزن کرم در تیمار اسید سولفوریک دیده شد.

شکل ۱- کرم خاکی پرورش یافته در ظرف های مخصوص در تیمار شاهد

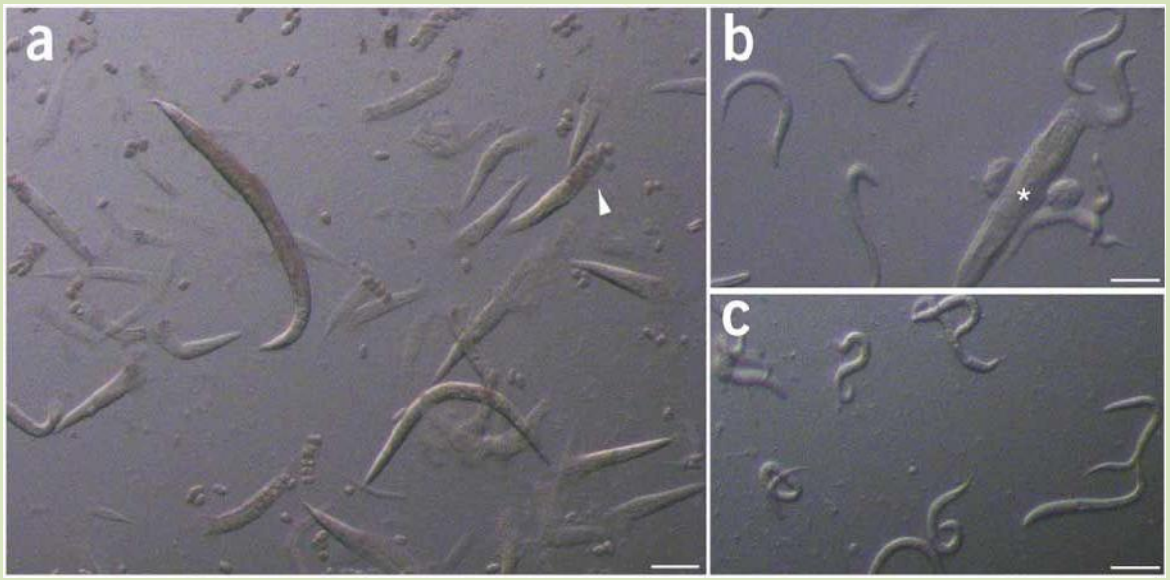
جدول ۱- تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر برخی ویژگی‌های مرتبط با فیزیولوژی تولید مثل و رشد کرم خاکی

تیمار	تعداد کوکون	تعداد کرم نوزاد	تعداد کرم بالغ	وزن کرم‌ها($g\ pot^{-1}$)
Control	۶۸ ±۷/۴^{c}	۲۰۸ ±۲۳/۱ ^{b}	۲۸ ±۷/۷ ^{a}	۳۰/۵ ±۸/۷ ^{b}
C_5	۷۸ ±۸/۳^{b}	۱۹۹ ±۲۱/۳ ^{c}	۲۲ ±۶/۳ ^{bc}	۲۴/۷ ±۵/۳ ^{cde}
C_{10}	۵۰ ±۵/۱^{g}	۲۴۸ ±۱۷/۸ ^{a}	۲۴ ±۵/۶ ^{b}	۳۰/۴ ±۷/۱ ^{b}
A_5	۶۱ ±۹/۱^{e}	۱۸۶ ±۲۵/۱ ^{d}	۲۰ ±۷/۱ ^{c}	۲۲/۹ ±۸/۲ ^{fe}
A_{10}	۴۳ ±۱۰/۱^{i}	۱۵۴ ±۲۷/۷ ^{f}	۲۱ ±۷/۷ ^{c}	۲۳/۵ ±۶/۷ ^{fe}
O_5	۶۶ ±۸/۹^{d}	۱۸۳ ±۱۶/۴ ^{d}	۲۳ ±۳/۶ ^{b}	۲۵/۸ ±۴/۶ ^{cd}
O_{10}	۶۰ ±۷/۳^{f}	۱۷۴ ±۱۴/۱ ^{e}	۲۳ ±۴/۱ ^{b}	۲۶/۲ ±۵/۸ ^{c}
Mix	۶۱ ±۹/۵^{fe}	۱۷۱ ±۲۹/۰ ^{e}	۲۴ ±۴/۵ ^{b}	۲۶/۴ ±۸/۸ ^{c}
P	۸۲ ±۱۱/۷^{a}	۱۸۵ ±۲۷/۳ ^{d}	۲۴ ±۳/۳ ^{b}	۳۵/۲ ±۹/۲ ^{a}
S	۴۸ ±۸/۰^{h}	۱۸۵ ±۲۹/۹ ^{d}	۱۸ ±۳/۱ ^{d}	۲۱/۴ ±۷/۲ ^{f}

حروف یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نیستند.

تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر جمعیت ریزجانوران خاک در جدول ۲ مشاهده می گردد. کاربرد اسیدهای آلی و معدنی موجب کاهش تولیدمثل و کاهش جمعیت نماتدها نسبت به تیمار شاهد شد. بیشترین تاثیر منفی و کم‌ترین تعداد نماتدها در تیمار اسید فسفریک مشاهده گردید. در این تیمار تعداد نماتدها ۳۰/۸ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. تیمار اسیدهای آلی در غلظت ۵ میلی مولار تاثیر کمتری نسبت به غلظت ۱۰ میلی مولار بر جمعیت نماتدها داشت. تیمار با اسید سیتریک ۵ میلی مولار با

۱۰/۶ درصد کاهش نسبت به تیمار شاهد کم‌ترین تاثیرگذاری را بر جمعیت نماتدهای خاک داشت.



شکل ۲- نماتدهای شمارش شده زیر میکروسکوپ در تیمارهای شاهد(a)، اسید فسفریک(b) و اسید اگزالیک پنج میلی مولار c)

تیمار خاک با اسیدهای آلی و معدنی منجر به کاهش جمعیت پرتوزوئرهای خاک شد. کم‌ترین جمعیت آمیب ها در تیمار اسید فسفریک با کاهش ۴۴ درصدی دیده شد. تیمارهای C_{10} و A_{10} نیز همراه با اسید فسفریک کم‌ترین جمعیت را به خود اختصاص دادند. در مژکداران کم‌ترین جمعیت در تیمار C_{10} و A_{10} با ۴۳ درصد کاهش نسبت به شاهد دیده شد. اسید اگزالیک کم‌ترین تاثیر را در بین همه تیمارها بر کاهش جمعیت مژکداران داشت. در تاژکداران کوچک اسیدهای معدنی و اسید استیک بیشترین تاثیر را بر کاهش جمعیت داشتند. اسید اگزالیک تاثیر کمتری نسبت به سایر اسیدها بر جمعیت آن‌ها داشت. در تاژکداران بزرگ نیز این روند تکرار شد. تاثیر کاربرد اسیدهای آلی معدنی بر جامعه میکروبی خاک در جدول ۳ دیده می‌شود. جمعیت باکتری‌های خاک در همه تیمارها به‌جز تیمار اسید سولفوریک و اسید استیک ۱۰ میلی‌مولار منجر به افزایش جمعیت باکتری-های خاک شده است. بیشترین جمعیت باکتری‌ها در تیمار اسید سیتریک ۵ میلی‌مولار شده شد که نسبت به تیمار شاهد ۴۱ درصد افزایش جمعیت داشت. از طرف دیگر تیمار با اسید سولفوریک باعث کاهش ۳۶ درصدی جمعیت باکتری‌ها نسبت به تیمار شاهد شده است. نتایج تاثیر تیمار خاک با اسیدهای آلی و معدنی نشان از افزایش معنی‌دار جمعیت اکتینوباکتری‌های خاک نسبت به تیمار شاهد داشت. در این مورد همه تیمارها حتی تیمار خاک با اسید سولفوریک نیز منجر به افزایش جمعیت اکتینوباکتری‌ها شد. با این حال افزایش جمعیت اکتینوباکتری‌ها نسبت به جمعیت سایر گروه‌های باکتریایی کمتر است. بیشترین افزایش جمعیت اکتینوباکتری‌ها با ۳۰/۸ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد در تیمار اسید سیتریک ۱۰ میلی‌مولار دیده شد. کم‌ترین افزایش نیز به تیمار اسید اگزالیک ۵ میلی‌مولار با ۴ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد تعلق داشت. نتایج حاصل از تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و

معدنی بر جمعیت قارچ‌های خاک نیز بیان‌گر افزایش جمعیت آن‌ها می‌باشد(جدول۳). بیشترین تاثیر در افزایش جمعیت قارچ‌ها در تیمار اسید سیتریک ۵ و ۱۰ میلی‌مولار با افزایش به ترتیب ۶۸ و ۱۰۰ درصدی نسبت به تیمار شاهد دیده شد. تیمار با سایر اسیدهای آلی نیز منجر به افزایش جمعیت قارچ‌ها، اسید سولفوریک تاثیر معنی‌دار بر جمعیت قارچ‌ها نداشت. هم‌چنین تیمار خاک با اسید فسفریک منجر به افزایش ۱۶ درصدی جمعیت قارچ‌های خاک نسبت به تیمار شاهد شد.

جدول ۲- تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر تولید مثل ریزجانوران خاک

تیمار	نماتدها (تعداد در ۱۰۰ گرم خاک)	تاژکداران کوچک ($\times10^3$)	تاژکداران بزرگ ($\times10^3$)	آمیب ها ($\times10^3$)	مژکداران ($\times10^2$)
شاهد	۹۴/۷ ±۱۰/۲ a	۴/۶۶ ±۱/۲۱ a	۲/۳۸ ±۱/۴۶ a	۳/۲۸ ±۱/۲۷ a	**۱/۸۳ ±۰/۳۷ a**
C_5	۸۴/۷ ±۱۲/۳ cb	۲/۷۴ ±۱/۳۲ d	۱/۴۶ ±۰/۸۹ ed	۲/۲۱ ±۰/۹۸ c	**۱/۱۹ ±۰/۴۱ c**
C_{10}	۸۱/۰ ±۹/۱ fed	۲/۰۲ ±۰/۸۷ e	۱/۱۶ ±۱/۰۳ ef	۱/۸۵ ±۱/۲۱ d	**۱/۰۵ ±۰/۶۹ d**
A_5	۸۴/۰ ±۹/۲ cbd	۲/۹۸ ±۱/۱۱ d	۱/۵۲ ±۱/۱۱ cd	۲/۴۱ ±۱/۱۷ b	**۱/۲۵ ±۰/۸۳ c**
A_{10}	۷۸/۱ ±۱۴/۷ f	۲/۳۴±۱/۶۵ e	۱/۰۰ ±۰/۶۱ f	۱/۹۳ ±۰/۷۹ d	**۱/۰۶ ±۰/۷۶ d**
O_5	۸۶/۳ ±۱۱/۶ b	۳/۸۵ ±۱/۷۸ b	۱/۹۰ ±۰/۸۷ b	۲/۳۸ ±۱/۱۸ b	**۱/۳۶ ±۰/۹۵ b**
O_{10}	۷۹/۶ ±۱۷/۵ fe	۳/۴۴ ±۱/۶۲ c	۱/۶۹ ±۰/۴۷ cb	۲/۲۹ ±۱/۴۷ cb	**۱/۳۶ ±۰/۸۸ b**
Mix	۸۱/۶ ±۱۰/۸ ced	۲/۹۲ ±۱/۰۷ d	۱/۴۳ ±۱/۰۱ d	۲/۱۷ ±۱/۴۸ c	**۱/۲۳ ±۰/۸۶ c**
P	۶۵/۵ ±۸/۰ h	۲/۲۲ ±۰/۹۳ e	۱/۱۳ ±۰/۵۹ ef	۱/۸۳ ±۰/۹۳ d	**۰/۹۷ ±۰/۲۲ e**
S	۷۰/۳ ±۱۴/۲ g	۲/۲۱ ±۱/۲۱ e	۱/۰۷ ±۰/۲۱ f	۱/۸۹ ±۰/۹۱ d	**۰/۹۸ ±۰/۳۳ e**

حروف یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نیستند.

جدول ۳- تاثیر کاربرد اسیدهای آلی و معدنی بر تولید مثل جامعه میکروبی خاک

تیمار	باکتری ($\times10^6$)	قارچ ($\times10^4$)	اکتینوباکتری ($\times10^5$)	pH	هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)
شاهد	۱/۶۷ ±۰/۲۸ e	۱/۶۵ ±۰/۲۱ g	۱/۲۳ ±۰/۳۲ f	۷/۷۹ ±۰/۲۳ a	**۴۷۴ ±۳۳/۲ j**
C_5	۲/۳۷ ±۰/۳۱ a	۲/۷۷ ±۱/۱۱ b	۱/۳۴ ±۰/۴۳ c	۷/۳۶ ±۰/۱۴ d	**۸۶۴ ±۲۷/۶ e**
C_{10}	۱/۸۶ ±۰/۳۲ d	۳/۳۷ ±۱/۰۵ a	۱/۴۳ ±۰/۲۷ b	۷/۱۱ ±۰/۱۸ g	**۱۱۴۶ ±۱۴/۸ c**
A_5	۱/۷۳ ±۰/۱۸ e	۱/۹۴ ±۰/۶۸ f	۱/۲۸ ±۰/۱۴ de	۷/۵۷ ±۰/۱۱ c	**۹۱۰ ±۲۵/۹ d**
A_{10}	۱/۵۱ ±۰/۱۹ f	۲/۴۳ ±۰/۹۳ d	۱/۳۵ ±۰/۴۷ c	۷/۳۸ ±۰/۱۶ d	**۱۱۷۸ ±۲۶/۲ b**
O_5	۱/۸۳ ±۰/۲۱ d	۲/۲۱ ±۰/۸۹ e	۱/۲۵ ±۰/۳۸ fe	۷/۶۲ ±۰/۱۴ b	**۵۱۱ ±۳۸/۴ i**
O_{10}	۱/۹۳ ±۰/۳۷ c	۲/۵۶ ±۰/۹۶ c	۱/۳۳ ±۰/۲۷ c	۷/۳۹ ±۰/۱۲ d	**۶۴۵ ±۳۲/۱ g**
Mix	۲/۱۶ ±۰/۲۹ b	۲/۴۳ ±۱/۰۶ d	۱/۳۴ ±۰/۱۱ c	۷/۲۶ ±۰/۰۷ e	**۸۱۰ ±۳۶/۰ f**
P	۱/۸۷ ±۰/۲۷ dc	۱/۹۲ ±۰/۸۱ f	۱/۶۱ ±۰/۲۶ a	۶/۹۴ ±۰/۱۱ h	**۵۹۴ ±۲۹/۳ h**
S	۱/۰۶ ±۰/۱۶ g	۱/۶۷ ±۰/۶۷ g	۱/۳۱ ±۰/۴۱ dc	۷/۱۶ ±۰/۲۳ f	**۱۳۸۴ ±۳۵/۷ a**

حروف یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نیستند.

بحث و نتیجه گیری

اعمال تیمارهای اسیدهای آلی و معدنی باعث کاهش مقدار pH و افزایش مقدار هدایت الکتریکی در خاک‌ها گردید(جدول ۳). بیشترین مقدار کاهش pH در اسید تیمار اسید فسفریک و کم‌ترین کاهش pH نیز در تیمار اسید اگزالیک ۵ میلی‌مولار دیده شد. بیشترین

مقدار افزایش در هدایت الکتریکی خاک نیز در تیمار با اسید سولفوریک و کم‌ترین مقدار افزایش در هدایت الکتریکی در تیمارهای اسید اگزالیک ۵ میلی‌مولار و اسید فسفریک بود. به طورکلی اسیدها به دلیل افزایش انحلال ترکیبات نامحلول در خاک، هم‌چنین اضافه نمودن یون‌ها به خاک باعث افزایش هدایت الکتریکی محلول خاک‌ها می‌شوند. تیمار خاک با اسیدهای آلی تقریباً هم‌تراز با اسیدهای معدنی باعث کاهش مقدار pH خاک شد. تغییر در مقدار pH و هدایت الکتریکی خاک، از عوامل تاثیرگذاری هستند که قادرند بر جمعیت جانوران و جامعه میکروبی خاک موثر باشند. به نظر می‌رسد کاربرد اسیدهای آلی و معدنی با تاثیرات متفاوت بر رشد و تولید مثل کرم‌ها تاثیرگذار هستند. اضافه شدن فسفر به خاک در تیمار اسید فسفریک موجب تولیدمثل بیشتر در کرم‌ها شد اما در تبدیل آن‌ها به نوزاد چندان موثر نبوده و در ادامه به رشد بیشتر کرم خاکی کمک نمود. به نظر می‌رسد اسید فسفریک به عنوان یک عامل تغذیه‌ای به رشد و تولید مثل کرم‌ها کمک می‌کند اما هم‌زمان با کاهش pH خاک بر رشد و تولید مثل کرم‌ها تاثیر منفی می‌گذارد. اونبی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش نمودند که کاربرد منابع فسفری موجب بهبود رشد کرم خاکی می‌شود اما در صورتی‌که غلظت فسفر در بستر به مقدار زیادی بالا رود و موجب کاهش pH محیط شود باعث مرگ کرم‌ها می‌شود(۳۷). ادوارد(۱۹۸۸) گزارش داد که کرم‌های خاکی مقادیر pH بین ۴ تا ۷ را تحمل می‌کنند ولی این دامنه pH برای آن‌ها مطلوب نیست. وی pH خاک‌ها را با اسید هیدروکلریک کاهش داده و گزارش نمود که در همه خاک‌های با pH کمتر از ۶، مرگ و میر در کرم‌ها بین ۲۷ تا ۱۰۰ درصد رخ داد(۱۱). به نظر می‌رسد کاهش جمعیت کرم‌های خاکی در pH پایین به دلیل از دست دادن مقدار زیادی از الکترولیت ها ناشی از افزایش یون هیدروژن می‌باشد که از طریق محلول خاک جذب می شود(۴۱). افزایش هدایت الکتریکی ناشی از کاربرد اسیدها در خاک یکی دیگر از دلایل کاهش رشد و تولید مثل کرم‌ها می‌تواند باشد. گزیت و همکاران(۲۰۱۱) گزارش نمودند که با افزایش هدایت الکتریکی در محلول خاک، تعداد کوکون ها کاهش پیدا می نماید. هم‌چنین آنان گزارش نمودند که افزایش هدایت الکتریکی منجر به کاهش وزن کرم‌ها می شود(۱۸). به نظر می‌رسد با کاربرد اسیدها شرایط محیطی برای تبدیل کوکون ها به کرم های بالغ نامناسب می شود. کاهش pH و افزایش هدایت الکتریکی و برخی ویژگی های منحصر به فرد برخی اسیدها مانند استیک اسید بر این موضوع تاثیرگذار است. استیک اسید خاصیت ضد رشد داشته و موجب مرگ ارگانیسم ها می‌گردد. ممکن است این ترکیب منجر به مرگ برخی میکروارگانیسم های هم زیست با کرم خاکی شده و شرایط را برای تبدیل کوکون به نوزاد نامناسب کند. کاربرد اسیدهای آلی و معدنی موجب کاهش تولیدمثل و کاهش جمعیت نماتدها گردید. المیلیگی و نورتون(۱۹۷۳) گزارش نمودند که کاربرد برخی اسیدهای آلی از جمله اسید استیک، در خاک موجب کاهش جمعیت برخی گونه های نماتد در خاک می‌شود(۱۲). هم چنین دجیان و همکاران(۱۹۹۱) گزارش نمودند که اسید استیک موجب مرگ دو گونه نماتد پارازیت در محیط کشت مصنوعی شده است. آنان گزارش نمودند که فعالیت ضدنماتدی این اسید زمانی مشاهده گردید که گروه کربوکسیلیک اسید در حالت غیرتفکیکی خود قرار داشت(۱۰). در پژوهشی دیگر بیهان و همکاران(۲۰۱۶) گزارش نمودند که اسید استیک قادر به از بین بردن تخم های نماتد *Ascaris lumbricoides* می باشد(۲). به نظر می رسد سایر

اسیدهای آلی خاصیت نماتدکشی نیز دارند. جانگ و همکاران(۲۰۱۶) گزارش نمودند که تیمار نماتدها با اسید اگزالیک ۲ میلی مولار طی یک روز موجب مرگ همه نماتدهای جوان Meloidogyne شده و طی ۷ روز حدود ۹۵ درصد از تخم های آن نماتد از بین رفته است(۲۱). رادوان و همکاران(۲۰۱۵) نیز خاصیت ضد نماتدی اسید سیتریک و اسید اگزالیک را گزارش نمودند(۳۸). با توجه به همبستگی مثبت بین pH خاک و نماتدها(۰/۸۸) به نظر می‌رسد اسیدهای آلی با کاهش pH خاک موجب کاهش جمعیت نماتدها می‌شوند. بر اساس روابط همبستگی بین داده‌ها(جدول داده ها نمایش داده نشده است)، جمعیت همه گروه های ریزجانوران خاک با مقدار pH خاک همبستگی مثبت داشته(بیش از ۰/۸۸) و با کاهش مقدار pH، جمعیت پروتوزوئرهای خاک نیز کاهش یافته است. این موضوع نشان گر آن است که تولیدمثل نماتدها و پروتوزوئرهای خاک به شدت تحت تاثیر pH قرار می-گیرد و اسیدهای آلی با کاهش pH خاک، جمعیت ریزجانوران خاک را کاهش می دهند. همبستگی منفی معنی دار بین مقدار هدایت الکتریکی خاک و جمعیت تاژکداران کوچک(۰/۷۴-)، تاژکداران بزرگ(۰/۷۵-) و مژکداران(۰/۶۱-) نشان می‌دهد که اسیدهای آلی احتمالاً با افزایش مقدار هدایت الکتریکی خاک نیز باعث کاهش جمعیت پزوتوزوئرهای خاک می‌شوند. جمعیت باکتری های خاک در تیمار اسید سولفوریک و اسید استیک ۱۰ میلی مولار کاهش یافته است. به نظر می رسد تاثیر منفی اسید سولفوریک ناشی از تاثیر آن در کاهش pH، هم چنین ناشی از افزایش هدایت الکتریکی خاک ها باشد. تاثیر منفی کاهش pH بر جمعیت باکتری ها در پژوهش های قبلی محققان نیز گزارش شده است(۴۴، ۳۵). متیس و همکاران(۱۹۹۷) گزارش نمودند که جمعیت باکتری های قابل کشت خاک در یک محیط کشت اسیدی به سرعت کاهش یابد(۳۳). نکته قابل توجه در مورد تیمار اسید استیک آن است که در غلظت ۵ میلی مولار باعث افزایش جمعیت باکتری ها و در غلظت ۱۰ میلی مولار باعث کاهش جمعیت شده است. به نظر می رسد تاثیر منفی اسید استیک در جمعیت باکتری ها به دلیل تاثیر آن بر بالا رفتن هدایت الکتریکی خاک ها باشد. اگرچه همبستگی بین جمعیت باکتری های خاک با مقدار pH و هدایت الکتریکی خاک ها معنی‌دار نشده است ولی می توان این گونه برداشت نمود که اسیدهای آلی و اسید فسفریک افزون بر یک ماده کاهش دهنده pH، به عنوان یک ماده غذایی نیز مطرح هستند. اسیدهای آلی منبع ساده کربن برای جمعیت هتروتروف خاک بوده و اسید فسفریک نیز منبع مناسبی از فسفر می باشد. تیمار با اسید فسفریک بیشترین تاثیر را در کاهش pH خاک داشته است اما از یک طرف به عنوان یک ماده غذایی مهم مطرح بوده و از سمتی دیگر کم‌ترین تاثیر را در هدایت الکتریکی خاک داشته است. به نظر می رسد نقش این اسیدها به عنوان ماده غذایی و تاثیر آن ها بر هدایت الکتریکی خاک، در برخی موارد تاثیر منفی احتمالی آن ها در تغییر pH را خنثی کند. اگرچه کاهش pH خاک نیز می تواند باعث افزایش جمعیت برخی گروه های باکتریایی شود. در پژوهشی تعداد باکتری های شمارش شده به روش کشت در محیط کشت موجود در خاک اسیدی(pH=۵/۱) بیشتر از یک خاک بازی(pH=۷/۷) گزارش شد(۵). آنان هم چنین گزارش کردند که اگرچه pH پایین خاک منجر به کاهش جمعیت برخی گروه های باکتریایی مانند Protobsctria می شود اما جمعیت برخی گونه های دیگر مانند Bacteroidetes و Cyanobacteria افزایش می یابد. در پژوهشی لایوبر و همکاران(۲۰۰۹) با بررسی ۸۸ نمونه خاک از نقاط مختلف تاثیر pH بر

جمعیت باکتری های خاک را بسیار زیاد دانسته و از آن به عنوان عاملی که می توان ساختار میکروبی خاک را پیش بینی کرد یاد نموده اند(۲۶). با این وجود کاربرد اسید سولفوریک در خاک منجر به کاهش جمعیت باکتری ها شده است. به نظر می‌رسد اسید سولفوریک فاقد تاثیرات مثبت غذایی مانند سایر اسیدهای بکار رفته باشد. اسید سولفوریک تنها سولفات مورد نیاز برخی باکتری ها را می تواند تامین کند که با توجه به بالا بودن غلظت این یون در خاک های آهکی در مقایسه با کربن و فسفر، تاثیر اسید سولفوریک به عنوان ماده غذایی ناچیز می باشد. هم چنین اسید سولفوریک به عنوان یک اسید قوی مطرح بوده و در بین اسیدهای استفاده شده بیشترین تفکیک پروتون را دارد. با وجود این که خاک ها بافر قوی هستند اما اسید سولفوریک ممکن است به طور لحظه ای pH خاک را تا حد زیادی(تا ۳ واحد) کاهش دهد و شوک pH به آن وارد کند. این کاهش pH در مدت کوتاهی دوباره جبران می شود اما همان شوک لحظه ای ممکن است منجر به کاهش جمعیت باکتری ها به ویژه باکتری های سریع رشد شده باشد. در این بین تاثیر اسید سولفوریک در افزایش هدایت الکتریکی خاک نیز دیده می شود. اسید سولفوریک به انحلال برخی ترکیبات نامحلول کلسیمی و منیزیمی کمک نموده و با افزایش هدایت الکتریکی خاک می تواند جمعیت باکتری ها را تحت تاثیر قرار دهد. اکتینو باکتر ها، گروهی از باکتری های خاک هستند که برخی ویژگی های قارچی نیز از خود نشان می دهند و نقش مهمی در تجزیه برخی مواد آلی دیرتجزیه پذیر در خاک را دارند. اکتینوباکتر ها نسبت به تغییرات محیطی کمتر تحت تاثیر قرار گرفته و در دسته باکتری های کند رشد قرار دارند. کربن آلی خاک، شوری، رطوبت، دما، pH و نوع پوشش گیاهی بر روی جمعیت اکتینوباکتر های خاک موثر می-باشد(۳۴). با توجه به نتایج به دست آمده اکتینوباکتر ها همبستگی مثبت معنی دار در سطح یک درصد با مقدار pH خاک دارند به نحوی که با کاهش مقدار pH در اثر کاربرد اسید آلی، جمعیت آن ها افزایش یافته است. هم چنین دیده شد که جمعیت آن ها در غلظت های ۱۰ میلی مولار اسیدهای آلی نسبت به غلظت ۵ میلی-مولار بیشتر شده است. اگرچه قربانی نصرآبادی و همکاران(۲۰۱۳) گزارش نمودند که جمعیت اکتینوباکتر های خاک با مقدار pH در خاک های مرتعی همبستگی منفی دارد(۱۷). احتمالاً نقش اسیدهای آلی به عنوان یک منبع کربن در افزایش جمعیت این گروه از میکروارگانیسم ها موثرتر می-باشد. هم چنین نقش فسفر به عنوان یک ماده غذایی موثر در رشد میکروارگانیسم ها مطرح است. اکتینوباکتر ها به دلیل رشد و توسعه هیف ها و سایر نیازهای فیزیولوژیکی نسبت به سایر باکتری ها نیاز بیشتری به فسفر دارند. کاربرد اسیدهای آلی و معدنی منجر به افزایش جمعیت قارچ های خاک نیز می گردد. بیشترین تاثیر در افزایش جمعیت قارچ ها در اسید سیتریک دیده شده است. تیمار با سایر اسیدهای آلی نیز منجر به افزایش جمعیت قارچ ها شده و به نظر می-رسد اسید سیتریک منبع مناسب‌تری از کربن نسبت به سایر اسیدهای آلی برای قارچ ها باشد. در این میان اسید سولفوریک تاثیر معنی دار بر جمعیت قارچ ها ندارد. اسید سولفوریک باعث کاهش قابل توجه pH و هم چنین افزایش هدایت الکتریکی خاک شده، اما تاثیری بر جمعیت قارچ‌ها نداشته است. نقش تغذیه‌ای اسید سولفوریک نیز با توجه به غلظت مناسب سولفات در خاک های آهکی چندان موثر نیست. هم چنین تیمار خاک با اسید فسفریک منجر به افزایش جمعیت قارچ‌های خاک گردید. اسید فسفریک بیشترین تاثیر را بر pH خاک داشته است اما تاثیر آن بر جمعیت قارچ

ها نسبت به اسیدهای آلی کمتر بوده و به نظر می رسد تاثیر مثبت اسید فسفریک بر جمعیت قارچ ها نه به دلیل کاهش pH بلکه به دلیل نقش تغذیه ای آن باشد. علاوه بر این دیده شد که جمعیت قارچ ها با مقدار pH و هدایت الکتریکی اندازه گیری شده همبستگی ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد تاثیر اسیدهای آلی و معدنی بر جمعیت قارچ ها، حداقل در زمان این آزمایش(۲۱ روز)، به نقش تغذیه ای آن ها وابستگی بیشتری داشته و چندان مرتبط با کاهش pH نباشد. در گزارشات سایر پژوهش گران نیز تاثیر pH خاک بر جمعیت قارچ ها اغلب مثبت و یا بی معنی بوده است. در گزارشی متیس و همکاران(۱۹۹۷) گزارش نمودند که با کاهش pH نسبت جمعیت قارچ-ها به باکتری ها افزایش می یابد. البته آنان این آزمایش را در محیط کشت مصنوعی انجام دادند که غنی از منابع غذایی کربن و فسفر بوده و صرفاً مقدار pH در آن متغیر بوده است(۳۳). به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که اسیدهای آلی سه نقش مهم در خاک را دارند. اولین نقش آن ها کاهش pH خاک می باشد، نقش دوم افزایش انحلال نمک ها و به دنبال آن افزایش هدایت الکتریکی خاک ها و سومین نقش نیز نیز به عنوان یک ماده غذایی قابل استفاده برای میکروارگانیسم ها و یا یک ماده ضد رشد برای برخی جانداران است. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد نقش تغذیه ای اسیدهای آلی و معدنی بر جامعه میکروبی خاک ها بیشتر از تاثیر آن ها بر pH و یا هدایت الکتریکی باشد و این در اغلب موارد منجر به افزایش جمعیت میکروارگانیسم های خاک شده است. اما در موردکرم های خاکی و جانوران خاک تاثیر آن ها بر pH و هدایت الکتریکی موجب کاهش تولیدمثل در آن ها می‌شود. تاثیر اسیدها بر جمعیت قارچ ها بیشتر از باکتری ها و اکتینوباکتر ی ها بود، که خود نشان دهنده قدرت بیشتر آن ها در تطبیق با شرایط محیطی و استفاده از امکانات موجود در خاک است. جمعیت باکتری ها نیز علی رغم مطالعات پیشین مبنی بر کاهش جمعیت در pH کمتر، تحت تاثیر کاربرد اسیدهای آلی در خاک افزایش یافت. اکتینوباکتر ها با وجود این که معروف به کند رشد بودن و استفاده از منابع دیر تجزیه‌پذیر هستند اما جمعیت آن ها تحت تاثیر اسیدهای آلی بیشتر بوده اگرچه این رشد جمعیتی نسبت به قارچ ها و باکتری ها کمتر است.

منابع

1.Adl, S.M., Coleman, D.C. (2005). Dynamics of soil protozoa using a direct count method. Biology and Fertility of Soils, 42(2); 168-171.

2.Beyhan, Y.E., Yilmaz, H., Hokelek, M. (2016). Effects of acetic acid on the viability of *Ascaris lumbricoides* eggs: Is vinegar reliable enough to clean the vegetables? Saudi Medical Journal, 37 (3); 288-292.

3.Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R. (2013). A review of earthworm impact on soil function andecosystem services. European Journal of Soil Science, 64; 161-182.

4.Brons, J.K., Van Elsas, J.D. (2008). Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. Applied and Environmental Microbiology, 74; 2717-2727.

5.Cho, S.J., Kim, M.H., Lee, Y.O. (2016). Effect of pH on soil bacterial diversity. Journal of Ecology and Environment, 40; 10.

6.Choudhary, M., Datta, A., Jat, H.S., Yadav, A.K., Gathala, M.K., Sapkota, T.B. (2018). Changes in soil biology under conservation agriculture based sustainable intensification of cereal systems in Indo-Gangetic Plains. Geoderma, 313; 193-204.

7.Cookson, W., Osman, M., Marschner, P ,. Abaye, D., Clark, I., Murphy, D. (2007). Controls on soil nitrogen cycling and

microbial community composition across land use and incubation temperature. Soil Biology and Biochemistry, 39; 744-756.

8.Cosín, D.J.D., Novo, M., Fernández, R. (2011). Reproduction of earthworms: sexual selection and parthenogenesis, Biology of Earthworms. Springer,69-86.

9.Davis, K.E., Joseph, S.J., Janssen, P.H. (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 71; 826-834.

10. Djian, C., Pijarowski, L., Ponchet, M., Arpin, N., Favre-Bonvin, J. (1991). Acetic acid: a selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Nematologica, 37; 101-112.

11. Edwards, C. (1988). Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. In: Earthworms in Waste and in Environment. SPB Academic Publishing, The Netherlands, 21-31.

12. Elmiligy, I.A., Norton, D. (1973). Survival and reproduction of some nematodes as affected by muck and organic acids. Journal of Nematology, 5(1); 50-54.

13.FAO, (1973). Calcareous Soils, Bulletin 21. Foodand Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

14. Fenchel, T. (2013). Ecology of protozoa: the biology of free-living phagotropic protists. Springer-Verlag.

15. Fierer, N., Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103; 626-631.

16. Geisen, S., Mitchell, E.A., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F. (2018). Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. FEMS microbiology reviews.

17. Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H., Hamedi, J., Yakhchali, B. (2013). Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 13; 223-236.

18. Guzyte, G., Sujetoviene, G., Zaltauskaite, J. (2011). Effects of salinity on earthworm (*Eiseniafetida*), Environmental Engineering. The 8th International Conference May, pp. 19-20.

19. Han, S.I., Cho, M.H., Whang, K.S. (2008). Comparison of phylogenetic characteristics of bacterial populations ina Quercus and pine humus forest soil. The Korean Journal of Microbiology, 44; 237-243.

20. Hartman, W.H., Richardson, C.J., Vilgalys, R., Bruland, G.L. (2008). Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. Proceedings of the National Academy of Sciences 105; 17842-17847.

21. Jang, J.Y., Choi, Y.H., Shin, T.S., Kim, T.H., Shin, K.-S., Park, H.W. (2016). Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 producing oxalic acid. PloS One, 11; e0156230.

22. Jones, D., Dennis, P., Owen, A., Van Hees, P. (2003). Organic acid behavior in soils–misconceptions and knowledge gaps. Plant and Soil, 248; 31-41.

23. Jones, D.L. (1998). Organic acids in the rhizosphere–a critical review. Plantand Soil, 205; 25-44.

24. Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009). A comprehensive survey of soil acid bacterial diversity using pyro sequencing and clone library analyses. The ISME Journal, 3; 442-453.

25. Karaca, A. (2010). Biology of earthworms. Springer Science & Business Media.

26. Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology, 75; 5111-5120.

27. Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biology and Biochemistry, 40; 2407-2415.

28.Lee, E.Y., Lim, J.S., Oh, K.H., Lee, J.Y., Kim, S.K., Lee, Y.K. (2008). Removal of

heavy metals by an enriched consortium. The Journal of Microbiology, 46; 23-28.

29. Li, Q., Liang, W., Zhang, X., Mahamood, M. (2017). Soil nematodes of grasslands in northern china. Academic Press.

30. Liang, Y., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., He, Z., Wu, L., Zhang, X. (2011). Functional gene diversity of soil microbial communities from fiveoil-contaminated fields in China. The ISME Journal, 5; 403-413.

31. Liu, C., Jiang, Y., Wang, X., Chen, D., Chen, X., Wang, L. (2017). Diversity, antimicrobial activity, and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with lichen symbiosis. Microbial Ecology, 74(3);570-584.

32. Martin, J.P.(1950). Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Science, 69; 215-232.

33. Matthies, C., Erhard, H.P., Drake, H.L. (1997). Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils. Journal of Basic Microbiology, 37; 335-343.

34. McCarthy, A.J., Williams, S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. Gene, 115(1-2); 189-192.

35. Myrold, D.D., Nason, G.(1992). Effect of acid rain on soil microbial processes, In: Mitchell, R. (Ed.), Environmental Microbiology. Wiley-Liss, New York, 59–81.

36. Nilsson, L.O., Baath, E., Falkengren-Grerup, U., Wallander, H.(2007). Growth of *Ectomycorrhizal mycelia* and composition of soil microbial communities in oak forest soils along a nitrogen deposition gradient. Oecologia, 153(2); 375-384.

37. Ownby, D.R., Galvan, K.A., Lydy, M.J. (2005). Lead and zinc bioavailability to *Eiseniafetida* after phosphorus amendment to repository soils. Environmental Pollution, 136(2); 315-321.

38. Radwan, M., Abu-Elamayem, M., Farrag, S., Ahmed, N. (2017). Comparative suppressive effect of some organic acids against Meloidogyne. Pakistan Journal of Nematology, 35; 197-208.

39. Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C ,.Caporaso, J.G. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. The ISME Journal, 4; 1340-1351.

40. Rousk, J., Brookes, P.C., Baath, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. Applied and Environmental Microbiology, 75; 1589-1596.

41. Rusek, J., Marshall, V.G. (2000). Impacts of airborne pollutants on soil fauna. Annual Review of Ecology and Systematics, 31, 395-423.

42. Sessitsch ,A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Applied and Environmental Microbiology, 67; 4215-4224.

43. Springett, J., Syers, J. (1984). Effect of pH and calcium content of soil on earthworm cast production in the laboratory. Soil Biology and Biochemistry, 16; 185-189.

44. Tate, R.L. (1991). Microbial biomass measurement in acidic soil: effect of fungal; bacterial activity ratios and of soil amendment. Soil Science, 152; 220-225.

45. Whitehead, A., Hemming, J. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology, 55; 25-38.

The Effect of Organic and Inorganic Acids on the Physiology of Reproduction and Growth of Earthworms, Soil Fauna, and Microbial Communities in Calcareous Soils

A. Hassani[1], M. Etemadian[2], H. Khatibi[3]

1. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Zanjan, Zanjan. Iran. **Akbar.hassani@znu.ac.ir**

2. M.Sc. Graduate of Soil Science, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, ZAnjan. Iran.

3. M.Sc. Student of Soil Science, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, ZAnjan. Iran.

Received:2017.13. 12 **Accepted: 2018. 9.4**

Abstract

Inroduction & Objective: Organic and inorganic acids can affect the reproduction and growth of soil living organisms through the influence of some soil characteristics such as pH and electrical conductivity, or by changing the solubility of some solid soil compositions. Application of these acids as calcareous soil conditioner is commonplacein Iran.The purpose of this study was to investigate the effects of organic and inorganic acids on the physiology of reproduction and growth of earthworms, soil fauna, and microbial communities in calcareous soil.

Materials and Methods: This experiment was conducted in a laboratory on a calcareous soil in special containers in a completely randomized design with 10 treatments and 3 replications. Citric acid, acetic acid, oxalic acid at a concentration of 5 and 10 mM, a mixture of three organic acids, each with a concentration of 33.3 mM, sulfuric acid and phosphoric acid, each with a concentration of 5 mM was used. Containers containing 1 kg of soil were placed at room temperature for 20 days.At the end, the number of soil fauna and population of the microbial community were counted in each treatment.A separate experiment was designed to study the growth and reproduction of the earthworm.To the mixture of soil and fresh cow manure, treatments were applied and inoculated with earthworm and placed at room temperature for 56 days. At the end, the total number of juvenile worms, adult worms and cocoons and total worms were measured.

Results: According to the results, the use of acids reduced pH and increased electrical conductivity in soils. Phosphoric acid and citric acid increased the number of earthworm cocoons, but other acids decreased the number. Citric acid increased the number of juvenile worms, but other treatments reduced the number of juvenile worms. Phosphoric acid reduced the number of adult worms but increased their weight. In other treatments, the number and weight of earthworms decreased. The use of organic and inorganic acids reduced the reproduction of nematodes, amoebae, flagellates and ciliates. The population of bacteria and fungi in all acids increased, except for sulfuric acid.

Conclusion: The results showed that organic and inorganic acids, affect the population of earthworms, soil fauna and microbial communities by reducing the pH of the soil and increasing the dissolution of minerals or action as a nutrient or growth inhibitor, , which is different depending on the type of acids and their concentration.

Key word: Citric Acid, Phosphoric Acid, Soil Fauna, Sulfuric Acid.