پیامد کاربرد آفت‌کش کلروپیروفوس بر فراوانی برخی ریزجانداران خاک در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه امانی[1]، علی اکبر صفری سنجانی، فیروز ابراهیمی و شهرام نظریان

دانشجوی دکتری، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان؛ **amani.fatemeh@gmail.com**

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان؛ **aa-safari@basu.ac.ir**

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران؛ **febrhimi@ihu.ac.ir**

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران؛ **nazarian56@gmail.com**

دریافت: **96/4/31** و پذیرش: **96/12/22**

چکیده

کلروپیروفوس یکی از آفت‌کش‌هایی است که به میزان فراوانی در کشاورزی کاربرد دارد و می‌تواند بر ریزجانداران خاک اثرات بازدارنده داشته باشد. در این پژوهش آزمایشگاهی پیامد کاربرد سم کلروپیروفوس در غلظت‌های 0، 4، 12، 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک بر لگاریتم فراوانی ریزجانداران خاک در محیط کشت قارچ‌ها، *اکتینومیست‌ها*، *سودوموناس‌ها*، باکتری‌های روده‌ای و *ازتوباکتر* در زمان‌های 2، 4، 7، ۱۰، ۲۰، 30 و 40 روز در غالب تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های تکراری بررسی شد. پیامد این آفت‌کش ارگانوفسفره بر تنوع زیستی جانداران یاد شده نیز بررسی شد. براساس برآوردهای آزمایش، کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس منجر به کاهش فراوانی *ازتوباکتر* و *اکتینومیست‌ها* و افزایش فراوانی *سودوموناس‌ها* گردید. در این غلظت از کلروپیروفوس، لگاریتم فراوانی قارچ‌ها و باکتری‌های روده‌ای تفاوت معنی‌داری در مقایسه با نمونه خاک کنترل نداشتند. کاربرد 12و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم از کلروپیروفوس در خاک سبب کاهش بیشتر گروه‌های ریزجانداران قابل کشت شد. غنای گروهی ریزجانداران بررسی شده در تیمار 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس بیش از کنترل و در 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داشت. همچنین کاربرد تیمارهای 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک منجر به کاهش تنوع و یکنواختی گروهی و افزایش شناسه چیرگی (غلبه) زیستی ریز جانداران بررسی شده در برابر نمونه کنترل در خاک شد. بنابراین سم کلروپیروفوس در بازه زمانی40 روز به ویژه زمانی که بیش از اندازه پیشنهاد شده به خاک افزوده شود، بر فراوانی و شناسه‌های تنوع ریزجانداران کشت‌پذیر خاک پیامد بازدارنده معنی‌دار دارد.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست، باکتری، خاک آلوده، کلروپیروفوس، قارچ

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: فاطمه امانی، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاوزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

مقدمه

کارکرد گیاهان کشاورزی در آب و هوای گوناگون بستگی به آسیب بیماریزاها و آفت‌ها دارد. برای جلوگیری از این آسیب‌ها، از سم‌های گوناگونی مانند آفت‌کشها که از دید شیمیایی دارای یک پیوند ارگانوفسفره هستند، بهره‌گیری می‌شود (چو و همکاران، 2002). این آفت‌کش‌ها با کاربرد در کشتزارها سرانجام به خاک می‌رسند و مایه از دست رفتن برخی از گونه‌ها و یا دگرگونی زیستی در بوم‌سازه‌ها می‌شوند. بنابراین هماهنگی و تراز گونه‌ها را دگرگون می‌کنند و چه بسا تنوع زیستی بوم سازه آسیب ببیند که سرانجام پیامد بازدارنده‌ای بر رشد گیاه و کشاورزی پایدار دارد. کاربرد آفت‌کش‌ها امروزه چالش و تهدیدی بزرگ برای پایداری خاک‌های کشاورزی به شمار می‌آید (فنگ و همکاران، 2006).

گاهی آفت‌کش در آغاز بر توده‌های ریزجانداران خاک پیامد افزاینده یا کاهنده و برگشت‌پذیر دارد که با گذشت زمان زندگی در خاک به همان‌گونه پیشین بازمی‌گردد و گاهی این پیامد افزاینده یا کاهنده برگشت‌ناپذیر است که نشان‌دهنده توان آفت‌کش در تغییر سوخت و ساز (کاتابولیکی)، افزایش فراوانی و یا دگرگونی توده ریزجانداران خاک است (حاسین و همکاران، 2009).

کلروپیروفوس[1] (O, O-diethyl O-(3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate) یک حشره‌کش ارگانوفسفره است که به فراوانی برای مهار حشرات جونده و مکنده در کشتزارها، باغ‌های میوه و سبزی‌کاری‌ها بهره‌گیری می‌شود (فنگ و همکاران، 2006، سلمن و همکاران، 2014). نیمه عمر کلروپیروفوس در شرایط استاندارد آزمایشگاهی از دو تا 1575 روز است (سلمن و همکاران، 2014) و گزارش‌های بسیاری نشان‌دهنده آلودگی بوم‌سازه‌ها و سمی بودن آن برای مردم پس از استفاده نادرست آنها در دنیا شده است (سینگ و همکان، 2009؛ آبهیلش و سینگ، 2009؛ بندی و تنجدا، 2007).

پژوهش‌های انجام شده نیز نشانگر پیامد معنی‌دار کلروپیروفوس بر ویژگیهای زیستی خاک مانند کربن زیتوده و نیتروژن خاک، تنفس ریزجانداران، فعالیت‌های آنزیمی و چرخه نیتروژن است. گزارش شده است که زیتوده ریزجانداران خاک پس از کاربرد کلروپیروفوس در غلظت‌های 10 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب 25 و 50 درصد کاهش یافته است (ویسچدی و همکاران، 2007). منن و همکاران (2004) گزارش کرده‌اند که کانی شدن نیتروژن در خاک به گونه معنی‌داری پس از کاربرد کلروپیروفوس کاهش یافته است. شان و همکاران (2006) گزارش کرده‌اند که توده باکتری‌ها، قارچ‌ها و *اکتینومیست*‌های خاک با کاربرد غلظت 10 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس کاهش یافته است. در این راستا گزارش شده است که پس از دو هفته از زمان کاربرد کلروپیروفوس در خاک، تنوع گروه‌های کارکردی ریزجانداران در خاک کاهش یافت و این پیامد بازدارنده با افزایش کاربرد کلروپیروفوس افزایش یافت (فنگ و همکاران، 2006).

آفت‌کش ارگانوفسفره کلروپیروفوس در کشور ما کاربرد فراوانی دارد و کارهای اندکی در باره پیامد این آفت‌کش در خاک‌های ایران انجام شده است. بنابراین پژوهش کنونی با هدف ارزیابی پیامد این آفت‌کش بر فراوانی برخی از گروه‌های ریزجانداران خاک و تنوع زیستی آنها انجام شد. زیرا بیشتر فرایندهای زیستی در خاک بر پایه فعالیت این ریزجانداران انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

آفت‌کش و مواد شیمیایی

سم کلروپیروفوس خالص (درصد خلوص 97%) از شرکت رازی شیمی خرم آماده شد. استونیتریل و همه مواد شیمیایی استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک (Merk Co.) می‌باشند. محیط کشت PDA از شرکت Sigma-aldrich آماده شد.

نمونه‌برداری خاک و بررسی ویژگی‌های آن

برای انجام این پژوهش از خاک رویین (2-5 سانتی متر) باغ‌های سربندان در پیرامون شهر دماوند در استان تهران با عرض جغرافیایی "4/347 '38° 35 و طول جغرافیایی "16/2936 '18° 52 نمونه‌برداری شد. خاک‌ها به گونه‌ای برگزیده شدند که در پنج سال گذشته از سم ارگانوفسفره کلروپیروفوس در آنها استفاده نشده بود. نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌ها از الک 2 میلی‌متری گذرانده شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بر پایه دستورکارهای استاندارد بررسی شدند (سویفت و اسپارکس، 1996).

ویژگی‌های فیزیکی، بافت و دانه‌بندی خاک به روش هیدرومتر اندازه‌گیری شد. از ویژگی‌های شیمیایی pH خاک با دستگاه pHسنج مدل متراهم[2] 744، رسانندگی

[1] chlorpyrifos

[2] Metrohm

الکتریکی (EC) با رسانایی سنج الکتریکی مدل دبلیوتی‌دبلیو[1] 720، هر دو در نسبت 1 به 2 خاک به آب، درصد کربنات کلسیم معادل (ECC[2]) به روش خنثی کردن با اسید کلریدریک، درصد کربن آلی به روش اکسایش تر (والکلی و بلک[3])، اندازه‌گیری نیتروژن به روش کجلدال[4]، پتاسیم با استفاده از اسید کلریدریک 2 نرمال و دستگاه فلیم‌فوتومتر[5] و فسفر به روش اسپکتروفتومتری[6] اندازه‌گیری شدند (سویفت و اسپارکس، 1996).

آماده‌سازی تیمارها

150 گرم از نمونه‌های خاک آماده شده با کلروپیروفوس همراه با آب سترون تیمار شدند، به گونه‌ای که غلظت کلروپیروفوس در نمونه‌های خاک به ترتیب صفر (کنترل آزمایش)، 4، 12و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. نمونه‌های خاک درون پتری دیش با استفاده از قاشق پلاستیکی سترون با کلروپیروفوس به خوبی آمیخته شد و سپس از الک دو میلی‌متری گذرانده شد تا آفت‌کش بکاررفته به گونه‌ای یکنواخت پخش شود. سپس نمونه‌ها با فویل‌های آلومینیومی برای جلوگیری از تجزیه نوری و جلوگیری از آلودگی گرد و خاک پوشانده شدند.

از آغاز تا پایان دوره نگهداری خاک رطوبت در 60 درصد گنجایش نگهداری آب به روش وزنی، با افزودن آب سترون در خاک نگهداری شد. نمونه‌های کنترل (خاک بدون کلروپیروفوس)، نیز اندازه برابری آب به همان گونه تیمارها دریافت کردند. هر نمونه در دمای 25-26 °C در تاریکی گرماگذاری شد و در زمان‌های 2، 4، 7، 10، ۲۰،۳۰و 40 روز برای اندازه‌گیری کلروپیروفوس مانده در خاک و کشت ریزجانداران گوناگون در پلیت با استفاده از یک آگر دو سانتی متری، 3 گرم از هر نمونه خاک برداشته شد.

محیط کشت ریزجانداران و شمارش آنها

برای کشت و شمارش قارچ‌ها از محیط کشت آماده PDA[7] و برای کشت و شمارش باکتری‌های روده‌ای از محیط کشت آماده EMB[8] استفاده شد. برای ساخت محیط کشت‌های *اکتینومیست‌ها* (RBSCNA[9])، با افزودن 10 g starch، g Casein (Difco, vitamin-free)، 0/3 g KNO_3، 2 g NaCl، 2g K_2HPO_4، 0/05g $MgSO_4.7H_2O$، 0/002-/001g $CaCl_2$، 0/002-/001 g Rose Bengal ، 0/035 g $FeSO_4$. 15g agar، برای کشت *سودوموناس‌ها*[10] با افزودن g Peptone (gelatin) 20، 10 g K_2SO_4، 1/4 g $MgSO_4.7H_2O$، 10 ml glycerol، 15g agar، 0/025g Irgasan، برای کشت *ازتوباکترها*[11] 20g sucrose، 0/05g K_2HPO_4، 0/15g KH_2PO_4، 0/2 g $MgSO_4.7H_2O$، 1 g $CaCO_3$، 0/01g $FeCl_3$، 0/002 g Na_2MoO_4، 2 ml برموتیمول بلوی 5 درصد در اتانول، 15g agar در یک لیتر آب حل شد. سپس pH به 7/2 رسانده و سترون شدند. پس از سترون کردن به محیط کشت سودوموناس آنتی بیوتیک ایرگاسان افزوده شد و برای محیط کشت *اکتینومیست* رزبنگال که یک ماده بازدارنده (باکترواستاتیک) برای باکتری‌ها است و از رشد قارچ‌ها هم جلوگیری می‌کند، افزوده شد.

برای آماده‌سازی سوسپانسیون از خاک یک گرم آن را در ارلن دارای 99 میلی‌لیتر آب سترون ریخته و ارلن برای 15 دقیقه با سرعت 120 دور در دقیقه تکان داده شد و سری‌های رقت تهیه شد. از هر رقت به اندازه 100 میکرولیتر به کمک پیپت سترون برداشته و بر محیط کشت پخش شد. از هر رقت سه تکرار در سه پتری مایه‌زنی شد. سپس پتری دیش‌ها را به گونه وارونه در گرم‌خانه در دمای 28±2 °C قرار داده شد. در این بررسی بهترین رقت‌ها برای شمارش قارچ‌ها 10^{-4}، برای *اکتینومیست‌ها* 10^{-4}، برای *سودوموناس‌ها* 10^{-5}، برای باکتری‌های روده‌ای 10^{-4} و برای *ازتوباکترها* 10^{-2} بود. *اکتینومیست‌ها* به ریخت پرگنه‌های کوچک خشک، گرد، پودری، صورتی و یا سپید آشکار شد. *سودوموناس‌ها* به ریخت پرگنه‌های گرد و سفید شیری رنگ مایل به کرمی دیده شد. در محیط کشت EMB پرگنه‌های *اشریشیاکولی* که تخمیرکننده لاکتوز هستند به رنگ سبز با جلای فلزی و باکتری‌های ناتخمیری مانند *سالمونلا* و *شیگلا* بی‌رنگ تا ارغوانی دیده شدند، *ازتوباکترها* به ریخت پرگنه‌های سپید، آبکی و لزج آشکار شد که پس از سه تا شش روز از سپیدی به رنگ قهوه‌ای، قهوه‌ای تیره تا سیاه و لزج دیده شدند. فراوانی پرگنه‌هایی با ویژگی‌های یاد شده در سه پتری (سه تکرار) در هر رقت پس از 5 روز و فراوانی *اکتینومیست‌ها* پس از 9 روز شمارش شد (صفری سنجانی و همکاران، 2010).

1. WTW
2. Equivalent calcium carbonate
3. Walkly and Black
4. Kjeldahl
5. Flame photometer
6. Spectrophotometer
7. Potato Dextrose Agar
8. Eosin methylene blue
9. Rose Bengal starch casein nitrate agar
10. PSI
11. LG

جداسازی و اندازه‌گیری کلروپیروفوس خاک

یک گرم خاک نمونه‌برداری شده در هریک از تیمارهای آزمایش را با دقت وزن کرده و در یک تیوپ پنجاه میلی‌لیتری سانتریفیوژ ریخته شد و سپس خاک با استفاده از پنج میلی‌لیتر استونیتریل برای مدت سی دقیقه به سرعت 250 دور بر دقیقه تکان داده شد. سپس پنج دقیقه در دور 3500 بر دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول بالایی (عصاره استونیتریل) در آغاز از کاغذ صافی (واتمن 0/48 mm) و سپس از فیلتر 0/45 میکرون برای پالایش بهتر گذرانده شد. پس از آن 5 میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله سانتریفیوژ ده میلی‌لیتری ریخته شد. 50 میکرولیتر تترا کلرید کربن (فاز جداکننده) به یک میلی‌لیتر از استونیتریل گردآوری شده (در گام نخست) افزوده شد. پس از آن آمیخته به دست آمده، بی‌درنگ در لوله سانتریفیوژ دارای آب با استفاده از سرنگ پنج میلی‌لیتری افزوده شد. نمونه برای یک دقیقه تکان داده شد. محلول ابری (استونیتریل و آب و تتراکلریدکربن) در لوله سانتریفیوژ دارای قطره‌های ریز تتراکلریدکربن همراه با کلروپیروفوس است. برای جداسازی فاز آلی از مایع برای پنج دقیقه در دور 4000 بر دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز تتراکلریدکربن در کف مخروطی لوله گردآوری شد. آن را با یک میکروسرنگ (سرنگ همیلتون) برداشته و در یک تیوپ کوچک تا نزدیک نقطه خشک شدن نگه داشته شد و دوباره در یک حجم ویژه استون حل شد و به دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) تزریق شد (ینگ و همکاران، 2012).

کلروپیروفوس جداسازی شده از خاک با استفاده از کروماتوگرافی (HPLC Cecil 1100) با ستون Zorbax SB-C18 column (250 × 4.6 mm 2- 5µm) اندازه‌گیری شد. دمای ستون 25 °C بود و فاز جابجاکننده آن ایزوکراتیک و آمیخته‌ای از استونیتریل/آب مقطر به نسبت 70 درصد استونیتریل و 30 درصد آب با نرخ جابجایی 2 ml/min بود. طول موج استفاده شده برای اندازه‌گیری کلروپیروفوس 290 nm و زمان نگهداشت آن در ستون 18 دقیقه بود.

داده‌پردازی و تجزیه و تحلیل آماری

فراوانی ریزجانداران خاک‌های تیمار شده در هر زمان و در هر تکرار با لگاریتم‌گیری در پایه ده نرمال سازی شد و سپس تجزیه واریانس انجام شد. آزمون آماری بکاررفته، تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های تکراری برای هر گروه از ریزجانداران شمارش شده در تیمارهای سم (0، 4، 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زمان‌های گرماگذاری 2، 4، 7، 18، 30 و 40 روز بود. آزمون میانگین پیامد ساده تیمار کلروپیروفوس، زمان گرماگذاری و برهمکنش این دو بر لگاریتم فراوانی هریک از ریزجانداران کشت شده با استفاده از روش دانکن در پایه آماری 5 درصد انجام شد.

در این پژوهش تنوع ریزجانداران، شناسه یکنواختی، شناسه چیرگی (غلبه) و غنای گروهی ریزجانداران کشت شده نیز برای هر خاک تیمار شده با کلروپیروفوس به روش‌های زیر برآورد و در تیمارهای سم (0، 4، 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) تحلیل واریانس یک سویه و سپس آزمون میانگین با استفاده از روش دانکن در پایه آماری 5 درصد انجام شد.

شناسه غنای گروهی نشان‌دهنده فراوانی گروه‌های گوناگون از ریزجانداران بررسی شده در خاک است. شمار گروه‌ها (R) همان غنای گروهی (S) است که در این پژوهش استفاده شده است.

$$S = R \qquad (1)$$

شناسه تنوع گروهی شانون-وینر (H) یکی از بهترین شناسه‌ها برای ارزیابی تنوع زیستی بوم‌سازه‌ها می‌باشد که از فرمول زیر برآورد می‌شود.

$$H' = \sum_{i=1}^{s}(p_i)(\log_2 Pi) \qquad (2)$$

که در آن H' شناسه تنوع شانون-وینر، S شمار گروه‌ها در نمونه و Pi نسبت فراوانی گروه iام به فراوانی همه گروه‌های بررسی شده است.

شناسه یکنواختی نیز پخش و فراوانی گروه‌ها را در خاک نشان می‌دهد، برای بررسی شناسه یکنواختی از شناسه یکنواختی شانون-وینر (فرمول 3) و شناسه یکنواختی سیمپسون (فرمول 4) استفاده شد.

$$E_H = \frac{H}{H_{Max}} = \frac{\sum_{i=1}^{S} p_i Ln(P_i)}{Ln(S)} \qquad (3)$$

$$E_D = 1/\sum_{i=1}^{S}(p_i)^2 \times S \qquad (4)$$

شناسه چیرگی: نشان دهنده فراوانی برخی از گروه‌ها در برابر دیگر گروه‌ها است. در این پژوهش از شناسه چیرگی سیمپسون (فرمول 5) استفاده شد. (شانون، 2001).

$$D_D = \sum_{i=1}^{S} P_i^2 \qquad (5)$$

داده‌پردازی با نرم افزار اکسل و همه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه آماری Statistica 6.0 انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های خاک

خاک آزمایش شده دارای رس 32/70% و سیلت 26/60% و شن 40/70% بود. بنابراین بافت خاک لوم رس[1] رس[1] بود. این خاک شور نبود و pH آن خنثی بود. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بکار رفته در جدول 1 آمده است.

پیامد کلروپیروفوس بر فراوانی قارچ‌ها

تحلیل واریانس داده‌های به دست آمده از شمارش پرگنه‌هایی با ویژگی‌های ظاهری قارچ‌های کشت‌پذیر بر محیط کشت PDA، در خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس در جدول 2 آمده است. همان گونه که دیده می‌شود، تنها پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس بر آنها از دیدگاه آماری معنی‌دار است. پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس بر زمان گرماگذاری و پیامد برهم کنش کلروپیروفوس-زمان بر این گروه از ریزجانداران خاک معنی‌دار نبود.

آزمون میانگین فراوانی قارچ‌ها (جدول 3) نشان داد که لگاریتم فراوانی قارچ‌ها در کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری از دیدگاه آماری با کنترل آزمایش نداشت که گمان می‌رود قارچ‌های خاک به این غلظت از سم پایدار هستند. کاربرد 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس مایه کاهش فراوانی قارچ‌ها در مقایسه با کنترل شد. تفاوت معنی‌داری میان لگاریتم فراوانی قارچ‌ها هنگام کاربرد دو غلظت 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده نشد.

در پژوهش ایسنهائر (2009) بهره‌گیری ازکلروپیروفوس مایه افزایش توده قارچ‌ها شد. چه بسا تجزیه شدن این سم به کمک باکتری‌های خاک مایه پیدایش ترکیب‌هایی در خاک شود که سرچشمه انرژی برای قارچ‌ها باشد. در پژوهش دیگری کاربرد کلروپیروفوس در دو غلظت 0/5 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب فراوان شدن شمار قارچ‌ها شد (دوتا و همکاران، 2010). در برابر آن در پژوهش شان و همکاران (2006) کاربرد کلروپیروفوس در غلظت 10 ppm مایه کاهش رشد قارچ‌ها شد. در پژوهش ونگ و همکاران (2008) نیز دیده شد که غلظت بالای متامیدوفوس[2] (ارگانوفسفره) سبب کاهش زیتوده قارچی و زیتوده کربن کل (C_{mic}) شد. برداشت آنها این بود که قارچ‌ها به این ماده سمی، بیشتر از دیگر ریزجانداران پاسخ دهنده بوده که باعث کاهش رشد و زیتوده آنها شده است.

بنابراین پژوهش‌ها پیامد کاربرد این سم بر فراوانی قارچ‌ها در خاک‌های گوناگون بسیار ناهمانند است و این بستگی به ویژگی‌های هر خاک و نوع قارچ‌های چیره موجود در آن مکان دارد.

پیامد کلروپیروفوس بر فراوانی *اکتینومیست‌ها*

تحلیل واریانس داده‌های بدست آمده از شمارش پرگنه‌هایی با ویژگی ظاهری *اکتینومیست‌های* کشت‌پذیر در خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس در جدول 2 آمده است. همان‌گونه که دیده می‌شود، پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس و زمان گرماگذاری بر این گروه از ریزجانداران خاک معنی‌دار بود، ولی پیامد برهم کنش کلروپیروفوس-زمان بر آنها از دیدگاه آماری معنی‌دار نبود.

آزمون میانگین فراوانی *اکتینومیست‌ها* (جدول 3) هنگام کاربرد کلروپیروفوس در غلظت‌های گوناگون نشان داد در کاربرد 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم لگاریتم فراوانی *اکتینومیست‌ها* کمتر از کنترل آزمایش بود. ولی میان این دو غلظت تفاوت معنی‌داری دیده نشد. کاربرد کلروپیروفوس در غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس بیشترین پیامد بازدارنده را بر لگاریتم فراوانی *اکتینومیست‌ها* داشت.

---

1. Caly loam
2. Methamidophos

جدول 1- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه برداری شده

خاک	بافت	N	P	K	pH	EC	OC	ECC
		%	ppm	ppm		(dS /m)	g/100g	
دماوند	لوم‌رس	1/3	23	720	7/86	0/89	1/1	9/55

*EC؛ رسانایی الکتریکی، pH؛ اسیدیته، هردو در عصاره 1 به 2 خاک به آب، OC؛ کربن آلی، ECC؛ کربنات کلسیم معادل. P، N، K به ترتیب فسفر، نیتروژن و پتاسیم در دسترس

جدول 2- تحلیل واریانس (میانگین مربعات) پیامد غلظت‌های گوناگون کلروپیروفوس و زمان‌های نمونه‌برداری بر فراوانی ریزجانداران خاک

	Df	قارچ	*اکتینومیست*	*سودوموناس*	باکتری‌روده‌ای	*ازتوباکتر*
غلظت	3	0/155**	0/698**	0/693**	0/64**	0/968**
خطا	8	0/006	0/006	0/001	0/003	0/004
زمان	6	0/004 ns	0/025**	0/036**	0/028**	0/036**
زمان*غلظت	18	0/002 ns	0/004 ns	0/013**	0/006*	0/011**
خطا	48	0/006	0/004	0/002	0/003	0/003

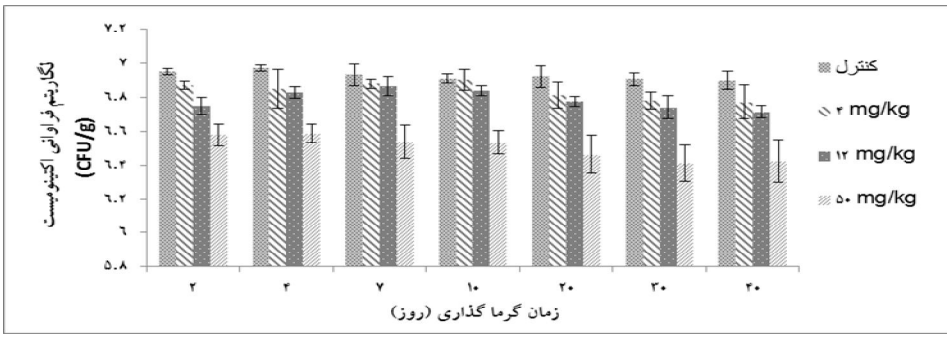
*: میانگین مربع تیمارها در پایه 0/05 معنی‌دار است. **: میانگین مربع تیمارها در پایه 0/01 معنی‌دار است. ns : میانگین مربع تیمارها معنی‌دار نیست. Df: درجه آزادی

جدول 3- آزمون میانگین لگاریتم فراوانی ریزجانداران (CFU/g) در کاربرد غلظت‌های گوناگون کلروپیروفوس (آزمون دانکن) در خاک

غلظت سم (mg/kg)	قارچ Log (f_i) (CFU/g)	*اکتینومیست* Log (f_i) (CFU/g)	*سودوموناس* Log (f_i) (CFU/g)	باکتری‌روده‌ای Log (f_i) (CFU/g)	*ازتوباکتر* Log (f_i) (CFU/g)
0	6/56(0±/06)a	6/93(0±/04)a	8/16(0±/04)b	6/78(±0/05)a	4/96(±0/05)a
4	6/54(0±/07)a	6/84(±0/08)b	8/25 (0±/02)a	6/77(±0/06)a	4/78(0±/008)b
12	6/43(0±/07)b	6/79(0±/07)b	8/14(0±/10)b	6/69 (±0/08)b	4/68 (0±/08)c
50	6/38(0±/08)b	6/51(0±/01)c	7/83 (0±/12)c	6/41(±0/09)c	4/44 (±0/11)d

*: میانگین‌های با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

آزمون میانگین کاربرد کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری نشان داد (شکل 1) که در کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و در بازه زمانی 4 تا 20 روز از آغاز گرماگذاری یک افزایش و برانگیختگی در فراوانی *اکتینومیست‌ها* دیده شد و پس از آن فراوانی کم و بیش به همان اندازه ماند. در هنگام کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم این برانگیختگی در فراوانی *اکتینومیست‌ها* باز هم دیده شد ولی کمتر بود. گمان می‌رود سم ارگانوفسفره در آغاز گرماگذاری بر این ریزجانداران کند رشد پیامد بازدارنده داشته ولی در میانه زمان گرماگذاری چون دیگر ریزجانداران فراوانی کمتری دارند و چه بسا با مرگ و میر دیگر جانداران، این دسته از ریزجانداران کند رشد خاک تا اندازه‌ای از رقابت با آنها بویژه باکتری‌های تند رشد رهایی یافته و فراوانی انها افزایش یافته است. از سوی دیگر کاربرد آفت‌کش و مرگ گروهی از ریزجانداران مایه فراهم‌شدن کربن آلی و عناصر غذایی برای *اکتینومیست‌ها* شده و سرانجام فراوانی آنها در خاک افزایش یافته است (داس و موکرجی، 2000). کاهش فراوانی *اکتینومیست‌ها* و بازگشت دوباره شمار آنها به پیش از تیمار در گزارش‌های دیگر نیز آمده است (تو، 1970 و 1972). که شاید به رها شدن کربن آلی و فراهم‌شدن سرچشمه انرژی و عنصرهای غذایی وابسته باشد (دو تا و همکاران، 2010).



شکل 1- میانگین لگاریتم فراوانی *اکتینومیست‌های* خاک تیمار شده با کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری

پیامد کلروپیروفوس بر فراوانی *سودوموناس‌ها*

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از شمارش پرگنه‌هایی با ویژگی ظاهری *سودوموناس* بر محیط کشت *سودوموناس‌ها* (PSI) و در خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس در جدول 2 آمده است. همان گونه که دیده می‌شود، پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس و زمان گرماگذاری و پیامد برهم‌کنش کلروپیروفوس-زمان از دیدگاه آماری بر این گروه از ریزجانداران خاک معنی‌دار بود.

آزمون میانگین فراوانی *سودوموناس‌ها* (جدول 3) در غلظت‌های گوناگون نشان داد که کاربرد کلروپیروفوس در غلظت 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک باعث افزایش فراوانی این گروه از ریزجانداران خاک در مقایسه با کنترل آزمایش شد. ولی کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم پیامدی بر فراوانی *سودوموناس‌ها* نداشت، به گونه‌ای که فراوانی *سودوموناس‌ها* هنگام کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس از دیدگاه آماری تفاوت معنی‌داری با کنترل آزمایش نداشت. پیامد کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس بیشترین پیامد بازدارنده را بر *سودوموناس‌های* کشت‌پذیر داشت و مایه کاهش معنی‌دار فراوانی *سودوموناس‌ها* در برابر کنترل آزمایش شد.

آزمون میانگین‌ها در میان زمان‌های گوناگون گرماگذاری نشان داد لگاریتم فراوانی سودوموناس‌ها در کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و در میان زمان‌های گوناگون گرماگذاری، تفاوت معنی‌داری را نداشت (شکل 2). هنگام کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس لگاریتم فراوانی *سودوموناس‌ها* در زمان‌های آغازین گرماگذاری بالاتر از دیگر زمان‌های گرماگذاری بود. در دو تیمار 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و در زمان‌های دومین، چهارمین و هفتمین روز گرماگذاری خاک، لگاریتم فراوانی سودموناس‌ها بیش از تیمارهای 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و کنترل آزمایش بود. هنگام کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس لگاریتم فراوانی *سودوموناس‌ها* در هفتمین روز گرماگذاری بیش از دیگر زمان‌های گرماگذاری در این تیمار بود.

این پژوهش نشان می‌دهد که پایداری *سودوموناس‌ها* در برابر آفت‌کش کلروپیروفوس از دیگر ریزجانداران بررسی شده بیشتر است. به گونه‌ای که کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس مایه برانگیختگی و افزایش فراوانی *سودوموناس‌ها* شد. غلظت 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز در آغاز همین پیامد را داشت که نشان‌دهنده پایداری خوب این گروه از ریزجانداران خاک در برابر این سم است.

ریزجانداران پایدار در برابر آفت‌کش‌ها از آنها همانند خاستگاه کربن و انرژی برای رشد خود بهره می‌گیرند که با تغییر و تجزیه این آمیزه‌های سمی خاک را به زیستگاه بهتری برای دیگر ریزجانداران تبدیل می‌کنند (فرانکو –اندرو، 2016). این یافته‌ها با پژوهش‌های انجام شده گواسوانی و همکاران (2013) هنگام بررسی زیتوده ریزجانداران پس از کاربرد سیپرمترین[1] سازگاری دارد. گزارش‌های بسیاری در دست است که نشان داده شده در خاک‌های آلوده به کلروپیروفوس ریزجانداران پایدار می‌توانند فراوان و کارا باشند ولی این پایداری و کارایی بستگی به اندازه آفت‌کش به کار رفته در خاک دارد (گمز و همکاران، 2014؛ ردیگرز-مرگادو، 2014؛ تجادا و همکاران، 2014؛ تجادا و همکاران، 2015)

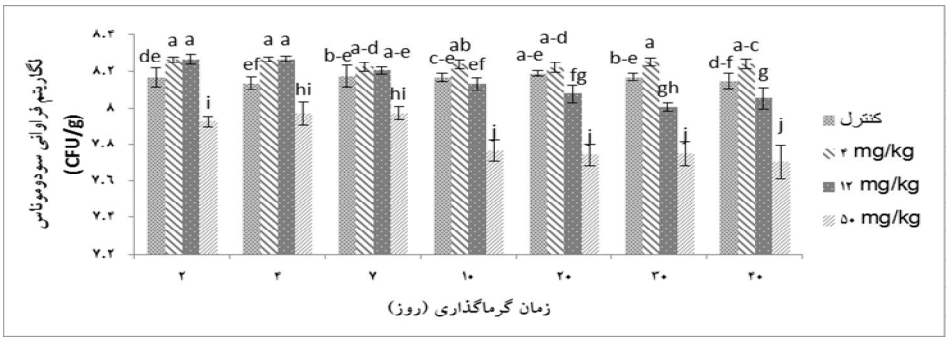
در این پژوهش هم دیده شد که اگرچه کاربرد غلظت‌های 4 و تا حدی 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم از این آفت‌کش فراوانی *سودوموناس‌ها* در خاک بیش از کنترل بود ولی افزایش آلودگی خاک در تیمار 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم به کاهش فراوانی آنها انجامید.

[1] cypermethrin

پیامد کلروپیروفوس بر جمعیت باکتری‌های روده‌ای EMB

تحلیل واریانس داده‌های بدست آمده از شمارش پرگنه‌هایی با ویژگی ظاهری باکتری‌های روده‌ای کشت‌پذیر در خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس بر محیط کشت‌های ویژه باکتری‌های روده‌ای (EMB) در جدول 2 آمده است. همان گونه که دیده می‌شود، پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس و زمان گرماگذاری و پیامد برهم‌کنش کلروپیروفوس-زمان بر این گروه از ریزجانداران خاک نیز از دیدگاه آماری معنی‌دار بود.

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی باکتری‌های روده‌ای (جدول 3) هنگام کاربرد کلروپیروفوس در غلظت‌های گوناگون نشان داد که فراوانی این گروه از باکتری‌ها هنگام کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت. ولی کاربرد 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس بر خاک مایه کاهش معنی‌دار این گروه از باکتری‌ها شد. پیامد کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک بر کاهش فراوانی این گروه از باکتری‌ها چشمگیرتر از 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.



شکل 2- میانگین لگاریتم فراوانی *سودوموناس* خاک تیمار شده با کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری
***میانگین‌های با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری با هم ندارند**

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی باکتری‌های روده‌ای در زمان‌های گوناگون گرماگذاری و در غلظت 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل 3). کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و در زمان‌های اغازین گرماگذاری فراوانی این باکتری‌ها بالا و با گذشت زمان گرماگذاری فراوانی این گروه از ریزجانداران خاک کاهش یافت، به گونه‌ای که در زمان‌های پایانی گرماگذاری تفاوت معنی‌داری در فراوانی آنها در برابر زمان آغازین گرماگذاری دیده شد. لگاریتم فراوانی باکتری‌های روده‌ای در کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس و در زمان‌های گوناگون گرماگذاری روندی کاهشی داشت، به گونه‌ای که در زمان 40 روز از آغاز گرماگذاری فراوانی باکتری‌ها به کمترین اندازه خود رسید.

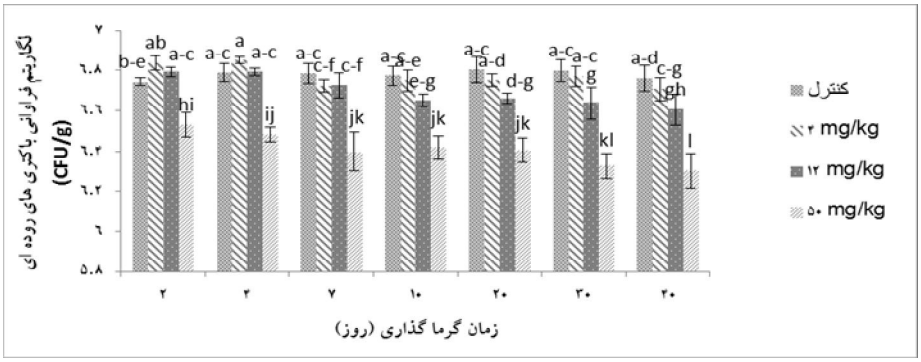
بنابراین غلظت 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس پیامد چندانی بر فراوانی باکتری‌های روده‌ای کشت‌پذیر نداشت، ولی در تیمار 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم با گذشت زمان گرماگذاری فراوانی این گروه از باکتری‌ها کاهش یافت و این کاهش در فراوانی با افزایش غلظت آفت‌کش در خاک نمایان‌تر بود. گزارش شده است که پس از کاربرد کلروپیروفوس در غلظت 4 لیتر بر هکتار توده باکتری‌های خاک کم شد ولی این پیامد بازدارنده کوتاه مدت بود و پس از چهل و پنج روز فراوانی آنها افزایش و به اندازه نخست خود بازگشت (پندی و سینگ، 2004).

پیامد کلروپیروفوس بر فراوانی *ازتوباکتر*

تحلیل واریانس داده‌های بدست آمده از شمارش پرگنه‌هایی با ویژگی ظاهری *ازتوباکترها* در خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس بر محیط کشت ویژه *ازتوباکتر* (LG) در جدول 2 آمده است. همان گونه که دیده می‌شود، پیامد ساده کاربرد کلروپیروفوس و زمان گرماگذاری و پیامد برهم‌کنش کلروپیروفوس-زمان بر آنها از دیدگاه آماری در خاک معنی‌دار بود.

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی *ازتوباکترها* (جدول 3) هنگام کاربرد کلروپیروفوس در غلظت‌های گوناگون نشان داد که کاربرد 4، 12 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس به ترتیب مایه پیامد بازدارنده بیشتری بر لگاریتم فراوانی *ازتوباکترهای* کشت‌پذیر شد. بنابراین هرچه غلظت کلروپیروفوس کاربردی بیشتر باشد

فراوانی *ازتوباکتر* نیز بیشتر کاهش می‌یابد. کاهش معنی‌دار فراوانی *ازتوباکترها* در تیمار آلودگی خاک به 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس نشان از ناپایداری و پاسخ‌دهندگی این گروه از ریزجانداران خاک دارد.



شکل 3- میانگین لگاریتم فراوانی باکتری‌های روده‌ای خاک تیمار شده با کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری
***میانگین‌های با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری با هم ندارند**

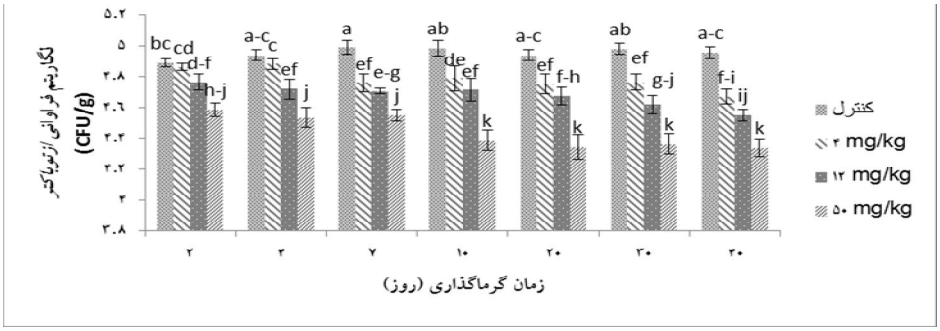
آزمون میانگین فراوانی *ازتوباکترها* در کاربرد کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری نشان داد (شکل 4) که هنگام کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس، یک روند کاهشی از چهارمین روز گرماگذاری دیده می‌شود و در چهلمین روز از آغاز گرماگذاری فراوانی *ازتوباکتر* کمترین است. روند کاهشی لگاریتم فراوانی *ازتوباکتر* در کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم از اغاز تا پایان زمان گرماگذاری نیز دیده شد. کاربرد غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک مایه کاهش معنی‌دار فراوانی *ازتوباکترها* از دهمین روز گرماگذاری در برابر زمان‌های آغازین گرماگذاری شد.

گزارش شده است که هنگام افزایش کلروپیروفوس در غلظت 10 تا 300 میلی‌گرم بر کیلوگرم به خاک شمار باکتریهای هوازی تثبیت کننده نیتروژن کاهش یافت (دو تا و همکاران، 2010). در پژوهش دیگری نیز کاربرد کلروپیروفوس در خاک زیست فراهمی نیتروژن و فسفر آن را کاهش داد که شاید وابسته به پیامد زیان بار این افت‌کش بر ریزجانداران تثبیت کننده نیتروژن باشد (سردار و کله، 2005). در این راستا مرکوواچی (2002) نشان داد که گلی فسات نه تنها از تثبیت نیتروژن جلوگیری کرد بلکه تنفس *ازتوباکتر کروکوکوم*[1] را به اندازه 60 درصد کاهش داد. کاستیلو و همکاران (2011) نیز گزارش کردند که کاربرد اندوسولفان در غلظت 2-10 میلی‌گرم بر لیترفعالیت نیتروژناز *ازتوباکتر کروکوکوم* را به اندازه 60 تا90 درصد کاهش داد.

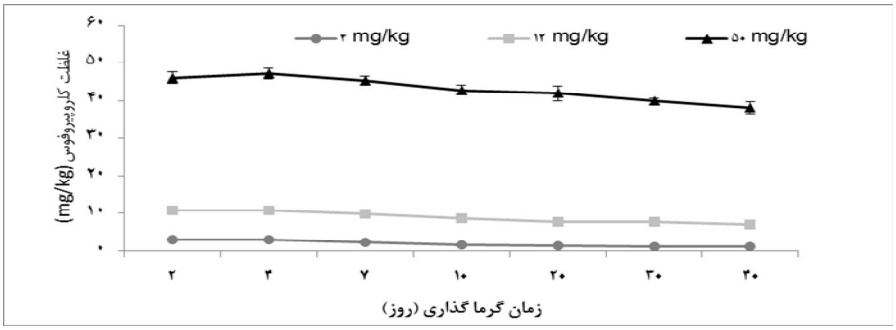
بازمانده کلروپیروفوس در خاک

تغییرات غلظت‌های گوناگون کلروپیروفوس افزوده شده به خاک در زمان گرماگذاری خاک در شکل 5 آمده است. یکی از راه‌های شکست و کاهش آلودگی کلروپیروفوس خاک، آب و انرژی نورانی است (زانگ و همکاران، 2011). از اینرو در این پژوهش گرماگذاری خاک‌های تیمار شده با کلروپیروفوس در تاریکی انجام شد. بنابراین دگرگونی و شکستن این آمیزه ارگانوفسفره در خاک و کاهش آلودگی آن در برابر زمان کم بود. از سوی دیگر شاید ریزجانداران تجزیه کننده این آمیزه ارگانوفسفره در خاک توان چندان بالایی برای شکستن این سم نداشته باشند. بنابراین اگر چه با گذشت زمان اندازه این آلاینده در خاک کاهش یافت ولی نرخ این کاهش چندان بزرگ نیست. این موضوع نشان دهنده پایداری بالای این آفت‌کش در خاک در این شرایط دارد.

[1] A. chroococcum



شکل 4- میانگین لگاریتم فراوانی *ازتوباکتر*های خاک تیمار شده با کلروپیروفوس در زمان‌های گوناگون گرماگذاری
***میانگین‌های با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری با هم ندارند**



شکل 5- غلظت کلروپیروفوس (mg/kg) در خاک در زمان گرماگذاری (روز)

پیامد کلروپیروفوس بر تنوع ریزجاندران کشت شده

تنوع زیستی یکی از شناسه‌های کارا برای سنجش و ارزیابی بزرگی آشفتگی‌های رخ داده شده در بوم سازه‌ها است (اسچینیر، 2012). در این پژوهش تنوع ریزجانداران یاد شده در خاک‌های تیمار شده با غلظت‌های گوناگون کلروپیروفوس بررسی شد. تحلیل واریانس شناسه‌های تنوع زیستی در کاربرد غلظت‌های کلروپیروفوس در جدول 4 آمده است. همانگونه که دیده می‌شود پیامد کاربرد این آفت‌کش بر همه شناسه‌های تنوع زیستی خاک از دیدگاه آماری در پایه 1 درصد معنی‌دار است ($P<0/01$).

شناسه غنای گروهی ریزجانداران یا شمار گروه‌های بررسی شده در خاک که با شمارش مستقیم آنها برآورد می‌شود، ساده‌ترین شناسه تنوع زیستی است (مرگران، 2013) که در این پژوهش کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس مایه فزونی معنی‌دار این شناسه شد. در برابر آن غنای گروهی ریزجانداران بررسی شده در غلظت 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری در برابر کنترل آزمایش نداشت. کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک سبب کاهش معنی‌دار غنای گروهی ریزجانداران بررسی شده خاک در برابر کنترل آزمایش شد (جدول 5).

آزمون میانگین شناسه تنوع شانون-وینر نشان داد (جدول 5) که کاربرد غلظت‌های 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک سبب کاهش معنی‌دار این شناسه در مقایسه با کنترل شد. ولی کاربرد غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش شناسه تنوع ریزجانداران مورد بررسی شد، به گونه‌ای که تفاوت معنی‌داری با خاک تیمار نشده (کنترل) نداشت.

یکی از خرده‌هایی که به شناسه تنوع شانون وینر گرفته می‌شود، توانایی این شناسه در جداسازی زیستگاه‌هایی است که غنای گروهی آنها به گونه معنی‌داری متفاوت است (مرگران، 2013). از آنجایی که میان غنای گروهی ریزجانداران بررسی شده در خاک تیمار نشده (کنترل آزمایش) و غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری دیده شد و شناسه شانون-وینر ریز جانداران بررسی شده در این دو تیمار تفاوت معنی‌داری از دیدگاه آماری نداشت، لذا گمان می‌رود که این شناسه توانایی خوبی در شناسایی تغییرات تنوع ریزجاندارن بررسی شده این دو تیمار را ندارد.

شناسه یکنواختی نشان‌دهنده پخش یکسان توده‌ها و ریزجانداران در زیستگاه‌ها است (دبندیکتیس، 1973). آزمون میانگین شناسه یکنواختی ریزجانداران در جدول 5 نشان می‌دهد که کاربرد 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک مایه کاهش معنی‌دار این شناسه در برابر خاک کنترل و غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس شد. به هر گونه میان شناسه یکنواختی ریزجانداران در خاک کنترل و خاک تیمار شده با 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری دیده نشد. آزمون میانگین شناسه چیرگی گروهی ریزجانداران بررسی شده خاک در جدول 5 نشان می‌دهد که این شناسه در غلظت‌های 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم در برابر کنترل و غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس افزایش معنی‌دار داشت. بررسی این شناسه نشان می‌دهد کاربرد 4 و 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس در خاک مایه افزایش توده‌های ویژه‌ای از ریزجانداران بررسی شده در خاک و کاهش توده‌های دیگری در خاک شده است. این پدیده مایه چیرگی شماری از ریزجانداران خاک در این دو تیمار شده است. شناسه چیرگی ریزجانداران هنگام کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس تفاوت معنی‌داری با خاک کنترل نداشت که نشان از پیامد بازدارنده این اندازه آلودگی و سم بر همه گروه‌های ریزجانداران دارد که با نتایج به دست آمده از شناسه یکنواختی هم‌خوانی دارد.

پیامد تنوع ریزجانداران بر کارکرد خاک روشن نیست. برخی بر این باورند از آنجایی که گونه‌ها و فراوانی ریزجانداران با کارکرد همانند در بوم سازه خاک فراوان است، بنابراین آنها می‌توانند نقش یکدیگر را در خاک انجام دهند و از این رو کاهش در یکنواختی خاک پیامد اندکی بر کارکرد خاک دارد (جاکوبسن و هلمسو، 2014). بررسی‌های آزمایشگاهی نیز نشان داده است که در بعضی موارد فرایندهای مهم خاک مانند کانی‌شدن کربن، نیتروژن، فسفر و نیز تثبیت نیتروژن پیامد چندانی از این تیمارها نداشته و به این گونه از آلودگی‌های خاک پاسخ نمی‌دهند. ولی کاهش غنای گروهی زمانی که خاک در برابر یورش بیماریزاها و آفت‌ها است، می‌تواند آسیب‌زا باشد. زیرا یورش باکتری‌ها و جانداران بیماریزا از پس مانده‌ها و همچنین ترکیب‌های ویژه می‌تواند آب‌های زیرزمینی و روزمینی و همچنین کشتزارها را آلوده کند و نبود گروه‌های چند کارکردی ریزجانداران در این بوم‌سازه‌ها، مایه چیرگی بیماریزاها شده که به آسیب‌های فراوانی می‌انجامد (جاکوبسن و هلمسو، 2014).

جدول 4- تحلیل واریانس (میانگین مربعات) شناسه‌های تنوع گروهی ریزجانداران بررسی شده خاک در غلظت‌های گوناگون کلروپیروفوس

غلظت کلروپیروفوس	Df	غنای گروهی	تنوع شانون‌وینر	یکنواختی شانون‌وینر	یکنواختی سیمپسون	چیرگی گروهی
مقایسه بین گروهی	3	350746216980555580/00**	0/005**	0/002**	00/00**	0/001**
مقایسه درون گروهی	8	7262465726000000	00/00	00/00	00/00	00/00

**: میانگین مربع تیمارها در پایه 01 /0 معنی‌دار است. Df: درجه آزادی

این پژوهش نشان می‌دهد که افت‌کش کلروپیروفوس پیامد بدی بر تنوع ریزجانداران خاک داشته است، به ویژه زمانی که این افت‌کش بیش از اندازه پیشنهادی افزوده شود. یافته‌های به دست آمده با دستاوردهای دیگر پژوهشگران نیز هم‌خوانی دارد (کادیان و همکاران، 2012؛ گمز و همکاران، 2014؛ تجادا و همکاران، 2015). این پژوهشگران نیز پیامد بازدارنده کلروپیروفوس را بر کارکرد و تنوع ریزجانداران در خاک‌های آلوده را گزارش کرده اند. بر پایه این گزارش‌ها پیامد بازدارنده این آفت‌کش برروی توده‌های ریزجانداران مایه کاهش کارایی آنزیم‌های خاک می‌شود. از سوی دیگر این آمیزه‌ها با پوشاندن رویه دانه‌های آلی و کانی در خاک مایه کاهش برهمکنش میان جایگاه‌های پیوند آنزیم‌ها و بستره آنها می‌شود (فرانکو-اندرو، 2016). همچنین آفت‌کش‌ها می‌توانند رفتار فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی ریزجانداران خاک را تغییر و شاید این فرایندها دلیلی بر کاهش واکنش‌ها و کارکرد ریزجانداران در خاک‌های آلوده باشد.

جدول 5- آزمون میانگین شناسه‌های تنوع ریزجانداران بررسی شده در خاک در غلظت گوناگون کلروپیروفوس (mg/kg) (آزمون دانکن)

غلظت کلروپیروفوس (mg/kg)	غنای گروهی	تنوع شانون‌وینر	یکنواختی شانون‌وینر	یکنواختی سیمپسون	چیرگی گروهی
0	1155504333/00(±42747877/82) b	0/45(±/016) a	0/29(±/010) a	0/25(±/003) a	0/80(±/009) b
4	1350267000/00(±39188470/00) a	0/38(±/002) b	0/24(±/002) b	0/24(±/000) b	0/85(±/002) a
12	1102506666/67 (±14735836/00) b	0/39(±/006) b	0/25(±/004) b	0/24(±/001) b	0/83(±/003) a
50	552934666/67 (±7139383/00) c	0/47(±/006) a	0/28(±/004) a	0/25(±/001) a	0/80(±/003) b

*میانگین‌های با حروف یکسان تفاوت معنی‌دار با هم ندارند.

نتیجه‌گیری

پژوهش کنونی نشان می‌دهد کلروپیروفوس می‌تواند بر فراوانی و تنوع ریزجانداران بررسی شده خاک پیامد بازدارنده داشته باشد. گمان می‌رود کاربرد 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس بر برخی از ریزجانداران خاک پیامدی ندارد و باعث کاهش یا برانگیختگی گروهی دیگر از ریزجانداران خاک می‌شود. به هر گونه کاربرد این غلظت مایه افزایش فراوانی *سودوموناس*‌ها شد. پایداری *سودوموناس‌ها* در برابر افزایش کلروپیروفوس می‌تواند به توانایی آن در شکستن و تجزیه این آمیزه سمی و یا پایداری آنها به افزایش کلروپیروفوس در خاک وابسته باشد. کاربرد 12 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس مایه کاهش رشد بیشتر ریزجانداران کشت‌پذیر شد. کاربرد 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروپیروفوس پیامد بازدارنده معنی داری بر همه ریزجانداران بررسی‌شده در خاک داشت.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه بوعلی سینا برای فراهم‌کردن هزینه‌های پژوهش و از گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین برای فراهم کردن کروماتوگرافی مایع (HPLC) برای اندازه‌گیری این دو آفت‌کش در خاک سپاسگزاری می‌شود.

فهرست منابع:

1. Abhilash, P. and Singh, N. 2009. Pesticide use and application: an Indian scenario. Journal of Hazardous Materials. 165(1): 1-12.
2. Bhanti, M. and Taneja, A. 2007. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. Chemosphere. 69(1): 63-68.
3. Castillo, J.M., Casas, J. and Romero, E. 2011. Isolation of an endosulfan degrading bacterium from a coffee farm soil: Persistence and inhibitory effect on its biological functions. Science of the Total Environment. 15: 20-27.
4. Cho, C.M.H., Mulchandani, A. and Chen, W. 2002. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. Applied and Environmental Microbiology. 68(4): 2026-2030.
5. Das, A. and Mukherjee, D. 2000. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. Applied Soil Ecology. 14(1): 55-62.
6. DeBenedictis, P.A. 1973. On the correlations between certain diversity indices. The American Naturalist. 107(954): 295-302.
7. Dutta, M., Sardar, D., Pal, R. and Kole, R.K. 2010. Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and activities in tropical clay loam soil. Environmental Monitoring and Assessment. 160(1): 385-391.
8. Eisenhauer, N., Klier, M., Partsch, S., Sabais, A.C., Scherber, C., Weisser, W.W. and Scheu, S. 2009. No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. Applied Soil Ecology. 42(1): 31-36.
9. Fang, H., Wang, X. and Shan, M. 2006. Dissipation of chlorpyrifos in pakchoi-vegetated soil in a greenhouse. Journal of Environmental Sciences. 18(4): 760-764.

10. Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T. and Tejada, M. 2016. Behavior of two pesticides in a soil subjected to severe drought. Effects on soil biology. Applied Soil Ecology. 105: 17-24.
11. Gómez, I., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., García, C., Hernández, T. and Tejada, M. 2014. Behavior of oxyfluorfen in soils amended with different sources of organic matter. Effects on soil biology. Journal of Hazardous Materials. 273: 207-214.
12. Goswami, M.R., Pati, U.K., Chowdhury, A. and Mukhopadhyay, A. 2013. Studies on the effect of cypermethrin on soil microbial biomass and its activity in an alluvial soil. International Journal of Agricultural and Food. 3(1): 1-9.
13. Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M. and Khalid, A. 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Advances in Agronomy. 102: 159-200.
14. Jacobsen, C.S. and Hjelmsø, M.H. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology. 27: 15-20.
15. Kadian, N., Malik, A., Satya, S. and Dureja, P. 2012. Effect of organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos contaminated soil. Journal of Environmental Management. 95: S199-S202.
16. Magurran, A.E. 2013. Measuring biological diversity. John Wiley & Sons, New York, USA.
17. Menon, P., Gopal, M. and Prasad, R. 2004. Influence of two insecticides, chlorpyrifos and quinalphos, on arginine ammonification and mineralizable nitrogen in two tropical soil types. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(24): 7370-7376.
18. Mrkovacki, N.B., Cacic, N.A. and Milic, V.M. 2002. Effects of Pesticides on Azotobacter chroococcum. Proceedings for Natural Sciences Zbornik Matice srpske za prirodne nauk.102: 23- 28.
19. Pandey, S. and Singh, D.K. 2004. Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (Arachis hypogaea L.) soil. Chemosphere. 55(2): 197-205.
20. Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J. and Tejada, M. 2014. Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. Environmental Science and Pollution Research. 21(18): 11027-11035.
21. Safari Sinegani, A.A., Sharifi, Z. and Safari Sinegani, M. (2010). Method in applied microbiology. Hamadan, Bu-Ali Sina, University Press.
22. Sardar, D. and Kole, R.K. 2005. Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients in soil. Chemosphere. 61(9): 1273-1280.
23. Scheiner, S.M. 2012. Biological diversity: Frontiers in measurement and assessment. In: Magurran. A.E. and McGill. B.J (ed). The Quarterly Review of Biology. 87(3): 254-254.
24. Shan, M., Fang, H., Wang, X., Feng, B., Chu, X.-q. and Yu, Y.-l. 2006. Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities. Journal of Environmental Sciences-Amsterdam. 18(1): 4-5.
25. Shannon, C.E. 2001. A mathematical theory of communication. ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review. 5(1): 3-55.
26. Singh, P., Sharma, S., Saini, H. and Chadha, B. 2009. Biosurfactant production by Pseudomonas sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. Letters in Applied Microbiology. 49(3): 378-383.
27. Solomon, K.R., Williams, W.M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J.M. and Giesy, J.P. (2014). Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States. 13-34.

28. Swift, R. and Sparks, D. 1996. Methods of soil analysis: Part 3: Chemical methods. Soil Science Society of America. Book Series. Madison, WI, USA.
29. Tejada, M., García, C., Hernández, T. and Gómez, I. 2015. Response of soil microbial activity and biodiversity in soils polluted with different concentrations of cypermethrin insecticide. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 69(1): 8-19.
30. Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I. and Parrado, J. 2014. Degradation of chlorpyrifos using different biostimulants/biofertilizers: Effects on soil biochemical properties and microbial community. Applied Soil Ecology. 84: 158-165.
31. Tu, C. 1970. Effect of four organophosphorus insecticides on microbial activities in soil. Applied Microbiology. 19(3): 479-484.
32. Tu, C. 1972. Effect of four nematocides on activities of microorganisms in soil. Applied Microbiology. 23(2): 398-401.
33. Vischetti, C., Coppola, L., Monaci, E., Cardinali, A. and Castillo, M.d.P. 2007. Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. Agronomy for Sustainable Development. 27(3): 267-272.
34. Wang, M-C., Liu, Y-H., Wang, Q., Gong, M., Hua, X-M., Pang, Y-J., Hu, S. and Yang, Y-H. 2008. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry. 40(3): 778-788.
35. Yang, Z., Liu, Y., Liu, D. and Zhou, Z. 2012. Determination of organophosphorus pesticides in soil by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography. Journal of Chromatographic Science. 50(1): 15-20.
36. Zhang, Y., Hou, Y., Chen, F., Xiao, Z., Zhang, J. and Hu, X. 2011. The degradation of chlorpyrifos and diazinon in aqueous solution by ultrasonic irradiation: effect of parameters and degradation pathway. Chemosphere. 82(8): 1109-1115

The Effect of Chlorpyrifos on Frequency of Some Microorganisms in Soil in the Laboratory Condition

F. Amani[1], A. A. Safari Sinegani, F. Ebrahimi, and S. Nazarian
PhD student. Soil Science College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;
E-mail: amani.fatemeh@gmail.com
Professor. Soil Science College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;
E-mail: aa- safari@basu.ac.ir
Assistant Professor. Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran;
E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir
Assistant Professor. Department of Biology Sciences, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran; E-mail: nazarian56@gmail.com
Received: July, 2017 & Accepted: March, 2018

Abstract

Chlorpyrifos is one of the most widely used pesticides in agriculture and may have a detrimental effect on soil microorganisms. In a laboratory research, the effect of different concentrations of chlorpyrifos (0, 4, 12, 50 mg/kg) on the log frequency of fungi, *actinomycete*, *pseudomonas*, intestinal bacteria and *azotobacter* during 2, 4, 7, 18, 30 and 40 days was considered as a repeated measures ANOVA. The effect of the organophosphorus pesticide also evaluated on biodiversity of the microorganisms. Result showed that after application of 4 mg/kg chlorpyrifos in the soil, the frequency of *actinomycete* and *azotobacter* decreased but *pseudomonas* frequency increased compared to control. Frequency of intestinal bacteria and fungi were similar to control. The log frequency of the most studied microorganisms decreased after 12 and 50 mg/kg chlorpyrifos application. In concentrations of 4 and 50 mg/kg chlorpyrifos, richness of the studied microorganism increased and decreased respectively, compared to the control. In 4 and 12 mg/kg chlorpyrifos concentrations, biological diversity and evenness decreased but dominance index increased in comparison with control treatment. Therefore, application of chlorpyrifos, especially more than the recommended dose, had inhibitory effect on the frequency and diversity of soil microorganisms, in the period of 40 days after application.

Keyword: Actinomycete, Bacteria, Chlorpyrifos, Fungi, Soil pollution

[1]. Corresponding author: Soil Science College of Agriculture Bu-Ali Sina University, Hamadan Iran