نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد چهارم، شماره سوم، ۱۳۹۳
http://ejsms.gau.ac.ir

ارزیابی اثرات علف‌کش‌های تریفلورالین، متری‌بیوزین و ایمازتاپیر بر رشد جدایه‌های *Bradyrhizobium japonicum*

*ناصر باقرانی[۱]، سراله گالشی[۲]، ابراهیم زینلی[۳] و محمدحسین ارزانش[۴]
[۱]دانشجوی دکتری گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استاد گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار پژوهشی بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان
تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۷

چکیده

رشد جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف علف‌کش‌های مورد استفاده در سویا در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های B_1، B_6 و B_{43} و غلظت‌های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸ و ١٦ برابر مقدار توصیه شده از علف‌کش‌های تریفلورالین، متری‌بیوزین و ایمازتاپیر به‌عنوان فاکتورهای آزمایش در نظر گرفته شدند. روند تغییرات جمعیت هر جدایه در طی زمان با استفاده از مدل گومپرتز سه‌پارامتری و جمعیت جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف هر علف‌کش با استفاده از معادله دز- پاسخ لجستیک چهار پارامتری برازش داده شد. نتایج نشان داد که حداکثر جمعیت جدایه‌های B_1، B_6 و B_{43} در محیط کشت YMB و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب به $۴/۷۷\times۱۰^{۹}$، $۴/۵۴\times۱۰^{۹}$ و $۴/۴۳\times۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت رسید. همچنین، جمعیت در جدایه‌های نام‌برده به‌ترتیب در ۱۰/۷٦، ۱۱/۵۵ و ۱۲/۵۱ ساعت ۲ برابر و باکتری‌ها طی مدت ۲٦/۱٤، ۲۵/۷۲ و ۲۷/۲۰ ساعت به میانه دوره رشد نمایی خود رسیدند. استفاده از تابع چهار پارامتری لجستیک دز- پاسخ در این آزمایش نشان داد که علف‌کش‌های متری‌بیوزین > تریفلورالین > ایمازتاپیر به‌ترتیب بیش‌ترین تأثیر را روی جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* داشتند. میانگین غلظت تریفلورالین، متری‌بیوزین و ایمازتاپیر مورد نیاز برای ایجاد ۵۰ درصد کاهش در جمعیت جدایه‌ها حدود ۱۳، ۷ و ٤ میلی‌گرم در لیتر برآورد گردید که ۱۰-٦ برابر مقدار توصیه شده آن‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: منحنی رشد، دز- پاسخ، باکتری همزیست سویا

* مسئول مکاتبه: bagherani@yahoo.com

مقدمه

سویا [*Glycine max* (L.) Merrill] با داشتن ۱۸ درصد روغن و ۳۸ درصد پروتئین نقش ویژه‌ای در خوراک انسان و دام دارد (برد و کاهلون، ۲۰۱۱). داشتن این اندازه پروتئین، به‌دلیل توانایی گیاه در تثبیت زیستی نیتروژن است. مقدار زیادی از نیاز نیتروژنی سویا در دوره رشد از راه همزیستی با باکتری *Bradyrihzobium japonicum* برآورده می‌گردد (کوئیو و چانگ، ۲۰۱۰). از سویی، کاربرد علف‌کش‌ها در سامانه‌های کشاورزی می‌تواند بر ریزجانداران خاک تأثیر گذاشته و ساختار جمعیت میکروبی را تغییر دهد (تراپ و همکاران، ۱۹۸٤). علف‌کش‌های تریفلورالین، متری‌بیوزین و ایمازتاپیر به‌صورت خاک مصرف برای مهار علف‌های‌هرز در مزارع سویا استفاده می‌شوند. این علف‌کش‌ها به‌ترتیب تقسیم سلولی، فتوسنتز و کارایی آنزیم استوهیدروکسی‌اسیدسنتاز را در گیاهان حساس مختل می‌نمایند (شیخی‌گرجان، ۲۰۱۲). گونزالز و همکاران (۱۹۹٦) گزارش کرده‌اند که وجود محل هدف یکسان در لگوم و باکتری همزیست آن، خطر سمیت علف‌کش را برای باکتری افزایش می‌دهد و شدت بروز اثرات زیانبار، به غلظت علف‌کش به‌کار رفته بستگی دارد. امروزه بیش‌تر این محل‌های هدف، آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود در گیاه هستند. به‌عنوان مثال، آنزیم استولاکتات‌سنتاز، ساخت اسیدهای آمینه والین، لوسین و ایزولوسین را در علف‌هرز و باکتری ریزوبیوم هدایت می‌نماید (رویوالا وهمکاران، ۱۹۹۸). علف‌کش‌های خانواده سولفونیل‌اوره قادر هستند عملکرد این آنزیم را هم در گونه علف‌هرز و هم باکتری مختل نمایند (پرادر و همکاران، ۲۰۰۰).

علف‌کش تریفلورالین یکی از سموم پرکاربرد در سویا به‌شمار می‌رود. گائور (۱۹۸۰) یافته‌های سایر پژوهشگران را درباره اثر آفت‌کش‌ها بر تثبیت زیستی نیتروژن بررسی نموده و نتیجه می‌گیرد که تریفلورالین می‌تواند روی جمعیت ریزوبیوم‌ها و کارایی آن‌ها مؤثر باشد. بولیچ و همکاران (۱۹۸۸) نیز اثر کاهنده تریفلورالین بر ساخت گره در سویا را گزارش نموده‌اند.

متری‌بیوزین با اختلال در انتقال الکترون در سیستم نوری II فتوسنتز مانع تامین انرژی مورد نیاز برای تثبیت دی‌اکسیدکربن می‌گردد. کاهش انتقال کربوهیدرات‌ها به ریشه موجب آسیب به کارایی همزیستی گیاه می‌شود (خان و همکاران، ۲۰۰٦). بورگز و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که از ۵۰ جدایه باکتری *B. japonicum* که در معرض علف‌کش متری‌بیوزین گذاشته شدند، تعداد ۸ جدایه نتوانستند غلظت‌های بیش از ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر این علف‌کش را تحمل نمایند. هاینونن- تانسکی و همکاران (۱۹۸۲) نیز گزارش کردند که علف‌کش‌های بازدارنده فتوسنتز مانند متری‌بیوزین بر

جمعیت و فعالیت ریزوبیوم تأثیر زیان‌بار می‌گذارند. با این‌حال، نتایج آزمایش مورمن (۱۹۸٦) نشان داد که حتی ۲ برابر مقادیر توصیه شده علف‌کش‌های تریفلورالین و متری‌بیوزین، تغییر معنی‌داری بر جمعیت دو جدایه از باکتری *R. japonicum* ایجاد نکردند.

ساویکا و سلوت (۱۹۹۸) در یک آزمایش مزرعه‌ای پیامد کاربرد ۹۰ گرم در هکتار ماده مؤثره ایمازتاپیر را بر ریزجانداران خاک مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که جمعیت قارچ‌ها در بخشی که علف‌کش به‌کار رفته بود افزایش و جمعیت باکتری‌ها کاهش یافت. بررسی درویین و همکاران (۲۰۱۰) در مورد پیامد کاربرد ۸ علف‌کش بر ۱۲۲ جدایه از جنس‌های مختلف ریزوبیوم نشان داد که هیچ‌یک از پارامترهای رشد باکتری با کاربرد ۰/۳٦۷ کیلوگرم در هکتار علف‌کش ایمازتاپیر تحت‌تأثیر قرار نگرفت؛ ولی کاربرد ۳/٦۷ کیلوگرم در هکتار (۱۰ برابر مقدار معمول) آن‌ها، بر رشد باکتری پیامدهای زیان‌باری داشت.

باکتری‌های همزیست سویا به تنش‌های محیطی و کاربرد آفت‌کش‌ها حساسیت زیادی دارند. با این وجود، پژوهش‌های اندکی در این باره در کشور به انجام رسیده است. هدف از این آزمایش بررسی اثرات برخی از علف‌کش‌های مورد استفاده در کشت سویا بر جدایه‌های *B. japonicum* به‌عنوان نخستین حلقه زنجیره فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های باکتری و محیط کشت آن‌ها: جدایه‌های *Bradyrhizobium japonicum* مورد نیاز از آزمایشگاه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی خاک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان تهیه شد. این جدایه‌ها پس از جداسازی از درون گره‌های سویا در مناطق گنبد، مینودشت و بندرگز استان گلستان تحت عنوان B_1، B_6 و B_{43} نام‌گذاری و تا زمان استفاده به‌صورت اسلنت در دمای ٤ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه زادمایه باکتری، بسته به آزمایش، از محیط‌های کشت YMA[1] و YMB[2] استفاده شد. محیط‌ها طبق روش سوماسگاران و هوبن (۱۹۸۵) آماده و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۱ اتمسفر اتوکلاو شدند. شمارش جمعیت باکتری‌ها روی محیط YMA + CR[3] و به روش Plate count صورت گرفت (شوکلا و همکاران، ۲۰۱۰).

1- Yeast Mannitol Agar
2- Yeast Mannitol Broth
3- Congo Red

آزمایش تعیین روند رشد جدایه‌ها: روند رشد جدایه‌های باکتری *B. japonicum* در طی زمان‌های مختلف در محیط کشت YMB بررسی گردید. به این منظور در ٣ ارلن‌مایر ٢٥٠ میلی‌لیتری به اندازه ١٠٠ میلی‌لیتر از محیط کشت YMB اتوکلاو شد و سپس در هر ظرف یکی از جدایه‌ها مایه‌زنی گردید. ظروف ارلن برای ٧٢ ساعت (سوماسگاران و هوبن، ١٩٨٥) روی دستگاه شیکر- بن‌ماری با دوران ١٢٠ دور در دقیقه و دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد (مورمن، ١٩٨٦) انکوبه شدند. پس از این زمان، مقدار ١ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ارلن‌های شامل ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت YMB منتقل شد. ارلن‌های مایه‌زنی شده روی دستگاه شیکر- بن‌ماری با دوران ١٢٠ دور در دقیقه و دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. در دامنه زمانی ٨٠-٠ ساعت، هر ٨ ساعت و بعد از آن تا پایان آزمایش (١٤٤ ساعت) هر ٢٤ ساعت، میزان جذب در طول موج ٦٠٠ نانومتر (OD_{600})[1] توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV-1800 اندازه‌گیری گردید (درویین و همکاران، ٢٠١٠). برای شمارش تعداد باکتری‌های زنده در همین زمان‌ها، از روش سری‌های رقت و Plate count استفاده شد (شوکلا و همکاران، ٢٠١٠). از دو لوله آخر آزمایش رقت به‌میزان ٠/١ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری در مرکز تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت YMA استریل قرار داده شد و توسط میله شیشه‌ای خمیده استریل به‌طور یکنواخت روی محیط کشت نام‌برده پخش گردید. پتری‌ها به‌مدت ٧٢ ساعت در انکوباتور و دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت، تعداد کلنی تشکیل شده باکتری[2] شمارش گردید. ارتباط جمعیت با میزان جذب (OD_{600}) در ساعاتی که تکثیر باکتری به‌صورت خطی انجام گردید (٧٢-١٦ ساعت پس از تلقیح)، با استفاده از معادله خطی (رابطه ١) برآورد گردید (تیلور، ٢٠٠٨).

$$y = a + bx \qquad (١)$$

که در آن، y: جمعیت باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت YMB، x: میزان جذب در ٦٠٠ نانومتر، b: شیب خط و a: جمعیت اولیه باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت YMB می‌باشد.

روند تغییرات جمعیت هر جدایه در طی زمان با استفاده از مدل سه‌پارامتری گومپرتز (رابطه ٢) برازش شد (مک‌کی و کریج، ١٩٩٨؛ زویترینگ و همکاران، ١٩٩٠).

1- Optical Density
2- Colony Forming Unit (CFU)

$$y = G\max . e^{-e^{-((x-t_{50})/b))}} \quad (۲)$$

کـه در آن، y: تغییـرات جمعیـت بـاکتری در میلـی‌لیتـر محـیط کـشت YMB، x: زمـان (سـاعت)، G_{max}: حداکثر جمعیت باکتری (تعداد باکتری در میلی‌لیتر)، t_{50}: زمان لازم برای رسیدن بـه میانـه دوره رشد نمایی (ساعت) و b: شیب خط در میانه دوره رشد نمایی می‌باشد.

آماده‌سازی علف‌کش: علف‌کش‌های مورد آزمایش برای کاربرد در سویا به ثبت رسیده (شیخی‌گرجان و همکاران، ۱۳۹۱) و به‌طور معمول توسط کشاورزان نیز استفاده می‌شوند. آن‌ها شامل علف‌کش‌هـای تریفلورالین، متری‌بیوزین و ایمازتاپیر بودند که در ایران با فرمولاسیون‌های تجاری تـرفلان ٤٨ درصـد امولسیون، سنکور ۷۰ درصد پودروتابل و پرسوئیت ۱۰ درصد مایع قابل‌حل در آب به ثبت رسیده‌انـد. مقدار توصیه شده علف‌کش‌های نام‌برده به‌ترتیـب ۰/۹٦، ۰/٤۲ و ۰/۱ کیلـوگرم مـاده مـؤثره آن‌هـا در هکتار است (زند و همکاران، ۱۳۸٦). در این آزمایش اثرات مقادیر صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸ و ۱٦ برابر مقدار توصیه شده بررسی گردید تا ضمن بررسی طیف گسترده‌ای از مقادیر علـف‌کـش، تعداد نقاط لازم برای برازش مطلوب معادله‌هـای مـورد اسـتفاده تـامین گـردد (سـیفلت و همکـاران، ۲۰۰۵). مقدار علف‌کش در محیط کشت بر پایه روش وبر و همکاران (۲۰۰۰) محاسبه گردید. در این روش با فرض نبود جذب سطحی، هر کیلوگرم سم در یک خاک لومی با محتوای رطوبتی ۲۵ درصد، غلظتی معادل ۲/٦ میلی‌گرم در لیتر (پی‌پی‌ام) در محلول خاک ایجاد می‌نمایـد. بـه‌عنـوان مثـال، ۰/۹٦ کیلوگرم در هکتار تریفلورالین معادل غلظت ۲/۵ میلی‌گرم از این علف‌کش در هر لیتر محلـول خـاک است و چون از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده گردید؛ بنابراین برای معادل‌سازی این حالت، مقدار ۰/۲۵ میلی‌گرم تریفلورالین در محیط کشت ریخته شد. مشابه این محاسبه‌ها برای علف‌کش‌های متری‌بیوزین و ایمازتاپیر نیز انجام گرفت.

آزمایش تعیین منحنی رشد جدایه‌ها در محیط علف‌کش: بررسی غلظـت‌هـای مختلـف علـف‌کـش می‌تواند اثر آن‌ها را در فاز محلول خاک بر رشد جدایه‌های باکتری نشان دهد. برای مطالعه این موضوع، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری‌های رویش‌یافته در محیط YMB با مقدار مورد نیاز از هر علف‌کش طوری آمیخته گردید که حجم نهایی آن‌ها به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد (سـینگ و اسمیت، ۲۰۰۲). ارلن‌ها در دستگاه شیکر- انکوباتور با دوران ۱۲۰ دور در دقیقـه و دمـای ۲۸ درجـه سانتی‌گراد قرار داده شدند. میزان جذب نور در طول موج ٦۰۰ نانومتر(OD_{600}) با دستگاه اسپکتروفتومتر

در ٧٢ ساعت پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. عدد جذب با استفاده از معادله خطی به جمعیت باکتری تبدیل گردید و روند تغییرات جمعیت در غلظت‌های مختلف هر علف‌کش با استفاده از معادله دز-پاسخ[1] لجستیک چهار پارامتری (رابطه ٣) برازش شد (سیفلت و همکاران، ١٩٩٥).

$$y = G_{\min} + \frac{G_{\max} - G_{\min}}{1 + (x / EC_{50})} \qquad (3)$$

که در آن، y: تغییرات جمعیت باکتری در یک میلی‌لیتر محیط کشت YMB، x: غلظت‌های مختلف علف‌کش (میلی‌گرم در لیتر)، G_{max}: حداکثر جمعیت موجود در محیط کشت (تعداد باکتری در میلی‌لیتر)، G_{min}: حداقل جمعیت موجود در محیط کشت (تعداد باکتری در میلی‌لیتر)، EC_{50}: غلظت علف‌کش مورد نیاز برای کاهش ٥٠ درصد از جمعیت باکتری (میلی‌گرم در لیتر) و b: شیب خط در نقطه EC_{50} و یا سرعت کاهش جمعیت می‌باشد.

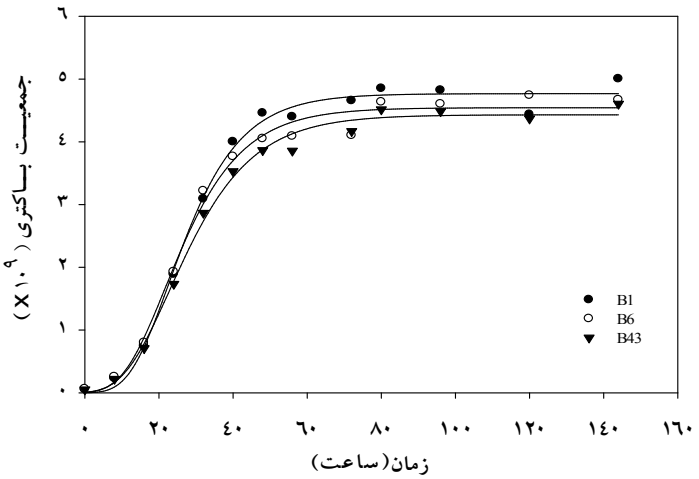
در مواردی که روند تغییرات از این تابع پیروی نمی‌کرد از روش تجزیه کلاسیک واریانس (ANOVA) استفاده شد. همه آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ٣ تکرار انجام گردید. سه جدایه *B. japonicum* و ٩ غلظت از هر علف‌کش به‌عنوان تیمارها (عامل‌های) آزمایش در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری Sigmaplot 12.5 و Statgraphics 16.1.11 انجام شدند.

نتایج و بحث

منحنی رشد جدایه‌های *B. japonicum*: بررسی روند تغییرات جمعیت باکتری‌ها براساس جذب نوری ممکن است به‌دلیل مرگ و میر باکتری‌ها و تولید اگزوپلی‌ساکاریدها توسط آن‌ها چندان دقیق نباشد. در این آزمایش، پس از اندازه‌گیری مقادیر جذب نوری در مراحل رشد جدایه‌ها، تعداد کلنی باکتری تشکیل شده در این زمان‌ها نیز شمارش و طبق توصیه تیلور (٢٠٠٨) با استفاده از معادله خطی به جمعیت هر جدایه تبدیل گردید. روند رشد جدایه‌های *B. japonicum* در محیط YMB درطی زمان و ضرایب معادله گومپرتز سه‌پارامتری مربوط به آن‌ها به‌ترتیب در شکل ١ و جدول ١ نشان داده شده است. حداکثر جمعیت در جدایه‌های B_1، B_6 و B_{43} به‌ترتیب $4/77\times10^9$، $4/54\times10^9$ و $4/43\times10^9$

1- Dose-Response Curve

سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. همانند نتایج این آزمایش، تاکاتس (۱۹۸٦) نیز عـدد جـذب و تعداد سلول زنده جدایه I-110 بـاکتری *B. japonicum* را بـه‌ترتیـب ۰/۸ و ۳×۱۰^{۹} بـه‌دسـت آورد. مقادیر ضریب b در جدول ۱ نشان می‌دهد که جدایه‌های $B_۱$، $B_٦$ و $B_{٤۳}$ به‌ترتیب در ۱۰/۷٦، ۱۱/۵۵ و ۱۲/۵۱ ساعت ۲ برابر شده‌اند و از این جهت بین آن‌هـا اخـتلاف معنـی‌داری نبـوده اسـت. همچنـین، جدایه‌ها به‌ترتیب طی مدت ۲٦/۱٤، ۲۵/۷۲ و ۲۷/۲۰ ساعت به میانه دوره رشد نمـایی خـود رسـیدند (ضریب $t_{۵۰}$ در جدول ۱) که از این جهت نیز بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. دانستن طول دوره رشد نمایی دارای اهمیت است؛ زیرا برای تولید مایه تلقیح باید از باکتری‌های اواخر مرحله رشد نمایی استفاده شود (بهلول و اشمیت، ۱۹۸۰؛ سوماسگاران و هوبن، ۱۹۹٤). روند رشد جمعیت جدایه‌ها در این آزمایش از مدل گومپرتز تبعیت نمود. ساتو وسوگاوارا (۱۹۹۸) بیان می‌دارند کـه منحنـی رشـد مناسب‌ترین شاخص مقایسه خصوصیات رشدی باکتری‌ها محسوب می‌شود؛ زیرا براساس آن می‌توان دوره‌های متمایز رشد باکتری‌ها را با هم مقایسه نمود. هر چند معمولاً دلایل استفاده از یک مدل خاص ذکر نمی‌شوند (زویترینگ و همکاران، ۱۹۹۰)؛ اما جیبسون و همکاران (۱۹۸۸) دریافتند که در مقایسه با مدل‌های لجستیک، برازش داده‌های مربوط به روند رشد باکتری‌ها با استفاده از مدل گومپرتز نتایج بهتری خواهد داشت. زویترینگ و همکاران (۱۹۹۰) نیز استفاده از مدل گومپرتز سه‌پارامتری را به‌دلیل سهولت محاسبه، درجه آزادی بیش‌تر و تفسیر آسان‌تر بر مدل چهار پارامتری آن مرجح می‌دانند.



شکل ۱- روند تغییرات جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در زمان‌های مختلف در محیط کشت YMB.

جدول ١- ضرایب معادله گومپرتز سه‌پارامتری بـرای توصـیف تغییـرات جمعیـت جدایـه‌هـای *B. japonicum* در زمان‌های مختلف.

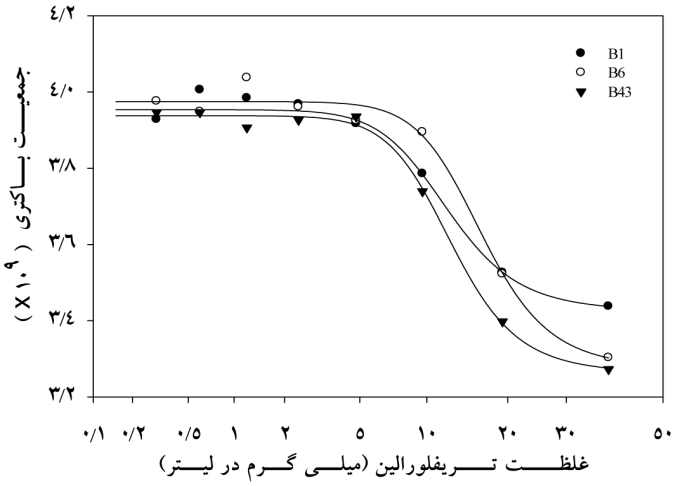
جدایه	ضرایب			$Adj\ R^2$	RMSE
	G_{max}	b	t_{50}		
	($\times 10^9$)				($\times 10^9$)
B_1	٤/٧٧ (٠/٠٧١)	١٠/٧٦(٠/٩١)	٢٦/١٤(١/٠٣)	٩٩	٠/٢٩٨
B_6	٤/٥٤ (٠/٠٨٢)	١١/٥٥(١/١٤)	٢٥/٧٢(٠/٩٦)	٩٩	٠/٣٤٣
B_{43}	٤/٤٣ (٠/٠٦٥)	١٢/٥١(٠/٩٥)	٢٧/٢٠(٠/٨٩)	٩٨	٠/٢٦١

اعداد داخل پرانتز مقادیر خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد.

G_{max}: بیش‌ترین جمعیت باکتری، b: شیب افزایش جمعیت باکتری در طی زمان و t_{50}: زمان مورد نیاز برای رسیدن جمعیت باکتری به میانه دوره رشد نمایی.

تأثیر تریفلورالین بر رشد جدایه‌هـای *B. japonicum*: تـأثیر علـف‌کـش تریفلـورالین بـر جمعیـت جدایه‌های *B. japonicum* در محیط کشت YMB به‌صورت منحنی دز- پاسخ در شکل ٢ و ضرایب معادله لجستیک چهار پارامتری مربوط به آن‌ها در جدول ٢ نشان داده شـده اسـت. میـانگین جمعیـت جدایه‌های B_1 و B_6 در تیمار شاهد (بدون مـصرف تریفلـورالین) بـه‌ترتیـب $3/95\times10^9$ و $3/57\times10^9$ باکتری در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود و تا مصرف ٥ میلی‌گرم در لیتر تریفلورالین (٢ برابـر غلظـت توصیه شده)، تغییر معنی‌داری در جمعیت این جدایه‌ها مشاهده نگردید. غلظت تریفلورالین لازم بـرای کاهش ١٠ و ٥٠ درصد جمعیت جدایه B_1 به‌ترتیب ٦/٠٣ و ١٢/٢٤ میلی‌گرم در لیتـر بـرآورد گردیـد. ضرایب EC_{10} و EC_{50} مربوط به جدایه B_6 نیز نشان داد که به‌ترتیب ٨/٨٩ و ١٦/٣٨ میلی‌گرم در لیتر تریفلورالین لازم است تا موجب ١٠ و ٥٠ درصد کاهش در جمعیت این جدایه شود که از این جهـت تفاوت معنی‌داری با جدایه B_1 نداشت (جدول ٢). عکس‌العمل جدایه B_{43} به تریفلورالین نیز مشابه دو جدایه دیگر بود؛ زیرا غلظت علف‌کش مورد نیاز برای ١٠ و ٥٠ درصد کـاهش جمعیـت ایـن جدایـه بدون اختلاف معنی‌دار با دو جدایه دیگر به‌ترتیب ٦/٦١ و ١٢/٦٣ میلی‌گرم در لیتر بـرآورد گردیـد. در مجموع، نتایج این بخش از آزمایش نشان داد که جمعیت هـیچ‌کـدام از جدایـه‌هـا حتـی در ١٦ برابـر غلظت توصیه شده نیز تحت‌تأثیر تریفلورالین قرار نگرفت. به این ترتیب، در شرایط مزرعه که عوامـل

متعدد دیگری نیز بر غلظت سم در محلول خاک دخیل می‌باشند، می‌توان از نقش تریفلورالین بر *B. japonicum* صرف‌نظر نمود. مشابه با این نتیجه، مورمن (۱۹۸٦) تأثیر ۱۳ علف‌کش مختلف در مقادیر معمول و ۱۰ برابر آن را بر رشد دو سوش باکتری *R. japonicum* آزمایش نمود و دریافت که رشد آن‌ها حتی در ۱۰ برابر مقدار معمول تریفلورالین نیز تغییری نیافت. دلایل متفاوتی برای توجیه علت تحمل *B. japonicum* به تریفلورالین ارایه شده است. گونزالز و همکاران (۱۹۸٦) بیان می‌دارند که ترکیبات موجود در محیط کشت می‌توانند اثرات بازدارنده علف‌کش را خنثی نمایند. در این رابطه، زاونیک و تومارو (۲۰۰۵) توصیه می‌نمایند که از محیط‌های ساده برای انجام آزمایش سمیت علف‌کش‌ها بر ریزجانداران استفاده شود؛ زیرا محیط‌های کشت پیچیده شامل موادی هستند که می‌تواند حساسیت باکتری به زنوبیوتیک‌ها را از بین ببرد. شولس و همکاران (۲۰۰۲) بیان می‌دارند که حلالیت علف‌کش می‌تواند مقدار تماس باکتری با آن را تحت‌تأثیر قرار دهد. در همین راستا، مورمن (۱۹۸٦) معتقد است که به‌دلیل حلالیت اندک تریفلورالین، مقداری از آن به دیواره شیشه‌ای ظرف آزمایش چسبیده و غلظت نهایی علف‌کش را در محیط کشت باکتری کاهش می‌دهد. مقاومت به تریفلورالین نیز می‌تواند یکی از دلایل توجیه تأثیر نداشتن این علف‌کش بر جدایه‌های *B. japonicum* باشد. از زمان ثبت تریفلورالین در سال ۱۳٤۸ (زند و همکاران، ۲۰۰۸)، هر ساله ده‌ها تن از این علف‌کش در محصولات مختلف استان گلستان مصرف شده است. با توجه به این‌که پسماندهای تریفلورالین حدود ۱۲ ماه در خاک دوام دارند (رائو، ۲۰۰۰)، استمرار تماس باکتری با علف‌کش و سرعت تکثیر بالای آن‌ها می‌تواند منجر به ظهور و ازدیاد جدایه‌هایی از *B. japonicum* شود که به تریفلورالین متحمل هستند. دروئین و همکاران (۲۰۱۰) تعداد ۱۲۲ ریزوبیوم را در معرض غلظت‌های مختلف ۸ علف‌کش، ٤ قارچ‌کش و ۵ حشره‌کش قرار داده و نتیجه گرفتند که هیچ‌یک از جدایه‌ها به مقادیر توصیه شده این ترکیبات حساسیت نشان نداد. آن‌ها علت این امر را فرآیند تکاملی بلندمدت ساختار ژنومی باکتری‌ها در جهت تحمل آفت‌کش (چیزی همانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها) عنوان نمودند.



شکل ٢- روند تغییرات جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف تریفلورالین.

جدول ٢- ضرایب معادله لجستیک چهار پارامتری برای توصیف جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف تریفلورالین.

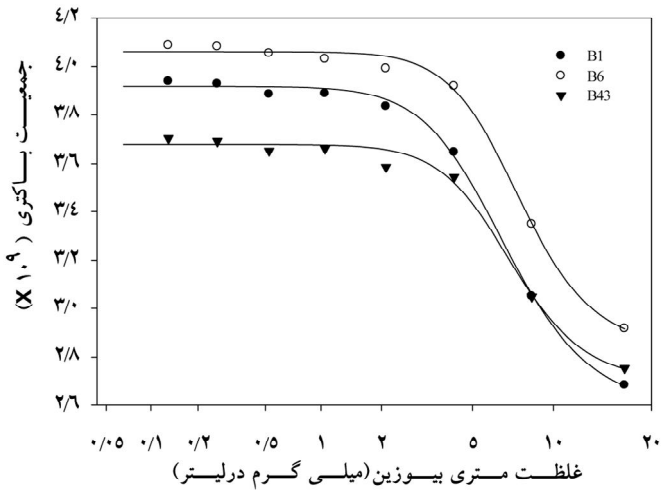
	ضرایب					$AdjR^2$	RMSE
	G_{min}	G_{max}	b	$EC_{١٠}$	$EC_{٥٠}$		
	(×١٠^٩)						(×١٠^٩)
$B_١$	٣/٤٢(٠/٠٤٣)	٣/٩٥(٠/١٤)	-٣/١٠(٠/٧٩)	٦/٠٣(٠/٩٨)	١٢/٢٤(١/٣١)	٨٩	٠/١١٨
$B_٦$	٣/٢٧(٠/٠٤٨)	٣/٥٧(٠/٨٥)	-٣/٠٦(٠/٧٢)	٨/٨٩(١/٢٦)	١٦/٣٨(١/١٤)	٩٥	٠/١١٤
$B_{٤٣}$	٣/٢٦(٠/٠٣٢)	٣/٥٩(٠/٦٥)	-٣/٣٩(٠/٤٧)	٦/٦١(٠/٧٣)	١٢/٦٣(١/٠٤)	٩٧	٠/٠٢٤

اعداد داخل پرانتز مقادیر خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد.

G_{max}: جمعیت باکتری در کم‌ترین غلظت علف‌کش، G_{min}: جمعیت باکتری در بیش‌ترین غلظت علف‌کش، b: شیب کاهش جمعیت باکتری، $EC_{١٠}$ و $EC_{٥٠}$ به‌ترتیب غلظت علف‌کش مورد نیاز برای ١٠ و ٥٠ درصد کاهش جمعیت باکتری.

تأثیر متری‌بیوزین بر رشد جدایه‌های *B. japonicum*: تأثیر علف‌کش متری‌بیوزین بر جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* به‌صورت منحنی دز- پاسخ در شکل ٣ و ضرایب معادله لجستیک چهار پارامتری مربوط به آن‌ها در جدول ٣ نشان داده شده است. میانگین جمعیت باکتری‌های

جدایه‌های B_1، B_6 و B_{43} در تیمار شاهد به‌ترتیب $3/91\times10^9$، $4/05\times10^9$ و $3/67\times10^9$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود که تا غلظت ۳/۸ میلی‌گرم در لیتر متری‌بیوزین (حدود ٤ برابر غلظت توصیه شده در مزرعه)، کاهش معنی‌داری در جمعیت مشاهده نشد. پس از آن، با افزایش غلظت سم تا بالاترین حد مصرف شده (١٦ برابر غلظت توصیه شده)، به‌طور متوسط ۳۰ درصد از جمعیت جدایه‌ها کاسته شد. ضرایب EC_{10} و EC_{50} نشان داد که به‌طور متوسط حدود ۳/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در لیتر متری‌بیوزین لازم است تا موجب ۱۰ و ۵۰ درصد کاهش در جمعیت جدایه‌ها شود. این مقادیر ۳/۳ و ٦/۸ برابر غلظت متری‌بیوزین توصیه شده در مزرعه می‌باشند. نتایج این آزمایش مشخص نمود با این‌که مقدار توصیه شده تریفلورالین حدود ۲ برابر متری‌بیوزین است، اثرات بازدارندگی آن بر جدایه‌های *B. japonicum* حدود نصف این علف‌کش می‌باشد. در مورد علت سمیت بیش‌تر متری‌بیوزن نسبت به تریفلورالین گزارشی ارایه نشده است؛ ولی سینگ و رایت (۲۰۰۲) میزان نفوذپذیری غشای خارجی سلول باکتری را در این امر دخیل می‌دانند. آن‌ها در آزمایش خود نشان دادند که برخی از علف‌کش‌ها مثل تربوترین روی *R. leguminosarum* سمیت بیش‌تری نسبت به علف‌کش‌های با مکانیزم عمل مشابه دارند. نتایج این آزمایش مطابق با مطالعه بورگز و همکاران (۱۹۹۰) می‌باشد؛ زیرا آن‌ها نیز نشان دادند که برخی از جدایه‌های *B. japonicum* به مقادیر بیش از ٤/۳ میلی‌گرم در لیتر متری‌بیوزین حساسیت داشته‌اند. اسپروت و همکاران (۱۹۹۱) گزارش نموده‌اند که ۲ برابر میزان توصیه شده متری‌بیوزین می‌تواند رشد سویه‌های 128C54 و 128C84 باکتری *R. leguminosarum* را در محیط کشت MYEM کاهش دهد. یک نظر محتمل دیگر، تشکیل بیوفیلم باکتریایی از پلی‌ساکاریدهای ترشح شده آن‌ها است (رینائودی و گوزانلز، ۲۰۰۹). بیوفیلم به‌طور معمول توسط باکتری‌ها تشکیل می‌شود؛ ولی آن‌ها با قدرت چسبندگی خود، کلنی باکتری را به اجزای جامد موجود در محیط کشت متصل می‌نمایند (لی و همکاران، ۲۰۱۰). این پدیده، ضمن کاهش جمعیت زنده باکتری، تخمین درستی از تعداد آن‌ها را در محیط YMA نمی‌دهد. این‌امر دلیل بیش‌تر بودن مقادیر EC_{10} و EC_{50} متری‌بیوزین را نسبت به تریفلورالین توجیه می‌نماید؛ زیرا وجود اجزای جامد موجود در فرمولاسیون متری‌بیوزین، بیوفیلم بیش‌تری را به‌خود جذب نموده است.



شکل ٣- روند تغییرات جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف متری‌بیوزین.

جدول ٣- ضرایب معادله لجستیک چهار پارامتری برای توصیف جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف متری‌بیوزین.

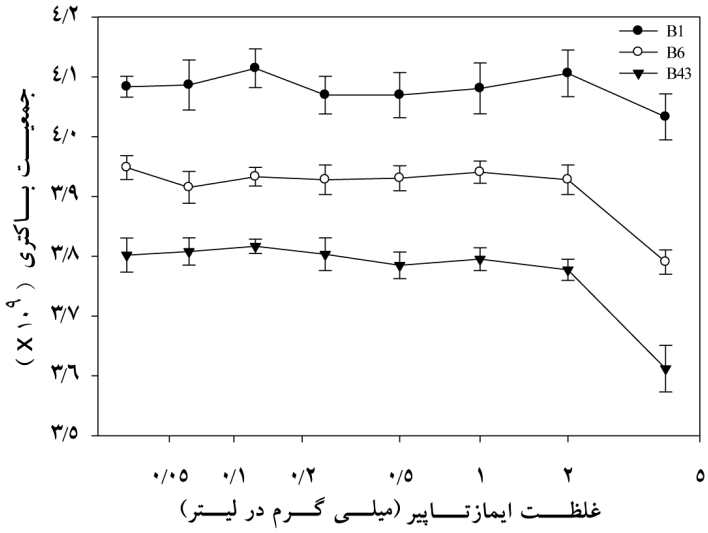
	ضرایب					AdjR^2	RMSE
	G_{min}	G_{max}	b	EC_{50}	EC_{10}		
	(×۱۰^۹)						(×۱۰^۹)
B_1	٢/٥٧(٠/٠٥٣)	٣/٩١ (٠/٠١١)	-٢/٦٨(٠/٢٦)	٣/٠١(٠/١٩)	٦/٨(٠/٣١)	٩٦	٠/٠٣٩
B_6	٢/٨٢(٠/٠٥١)	٤/٠٥ (٠/٠١٠)	-٣/٢٢(٠/٣٩)	٣/٨٨(٠/٢٧)	٧/٦٧(٠/٣١)	٩٢	٠/٠٣٧
B_{43}	٢/٦٨(٠/٠٤٧)	٣/٦٧ (٠/٠١١)	-٣/١٤(٠/٤٦)	٣/٥٣(٠/٣٢)	٧/١٠(٠/٣٤)	٩٩	٠/٠٤٥

اعداد داخل پرانتز مقادیر خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد.

G_{max}: جمعیت باکتری در کم‌ترین غلظت علف‌کش، G_{min}: جمعیت باکتری در بیش‌ترین غلظت علف‌کش، b: شیب کاهش جمعیت باکتری، EC_{10} و EC_{50} به‌ترتیب غلظت علف‌کش مورد نیاز برای ١٠ و ٥٠ درصد کاهش جمعیت باکتری.

تأثیر ایمازتاپیر بر جمعیت جدایه‌های *B. japonicum*: روند تغییرات جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف ایمازتاپیر در شکل ٤ نشان داده شده است. تغییر غلظت علف‌کش ایمازتاپیر در محیط کشت باکتری حتی تا ١٦ برابر مقدار معمول، تأثیری بر جمعیت

جدایه‌های B_1، B_6 و B_{43} نداشت. جمعیت این جدایه از $4/13\times10^9$ تا $4/03\times10^9$ سلول در نوسان بود که نشان می‌دهد ایمازتاپیر حتی در بالاترین غلظت نیز کم‌تر از ۱ درصد از جمعیت باکتری کاسته است. به این ترتیب، حساسیت جدایه‌ها به ایمازتاپیر به‌طور محسوسی کم‌تر از علف‌کش‌های تریفلورالین و متری‌بیوزین بود. پروکوپیو و همکاران (۲۰۰٤) تأثیر علف‌کش‌های مختلف از جمله ایمازتاپیر را بر گونه‌های *Bradyrhizobium* در محیط YMB آزمایش نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که جذب نوری تا ۲٤ ساعت اول پس از تماس باکتری با ایمازتأثیر تغییری نکرد؛ ولی در ٤۸ و ۷۲ ساعت بعدی به‌ترتیب ۲۰ و ۱۸ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. به هر حال، گونزالز و همکاران (۱۹۹٦) تأثیر ایمازتاپیر را بر *R. leuminosarum* آزمایش و گزارش نمودند که ۷۰۰ برابر مقدار معمول علف‌کش لازم است تا موجب اندکی تأثیر بر باکتری در محیط کشت آزمایشگاهی شود. مشخص شده است که سایر گونه‌های ریزوبیوم هم به مقادیر بالای بازدارنده‌های استوهیدروکسی‌اسیدستتاز متحمل هستند. فورلانی و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که اختلاف تحمل برخی از باکتری‌های ریزوبیوم به علف‌کش‌های خانواده ایمیدازولینون (مثل ایمازتاپیر) مربوط به تفاوت در محل حضور و میزان فعالیت آنزیم استوهیدروکسی‌اسیدستتاز موجود در آن‌ها است. براون (۱۹۹۰) گزارش نموده است که آنزیم استوهیدروکسی‌اسیدستتاز استخراج شده از گره‌های نخود خشک (*Cicer arietinum* L.) یعنی جایی که باکتروییدها وجود دارد، حدود ۱۰ برابر بیش‌تر از آنزیم استخراج شده از برگ‌های این گیاه می‌باشد. رویوالا و همکاران (۱۹۹۸) هم گزارش کردند که میزان آنزیم استوهیدروکسی‌اسیدستتاز موجود در *R. leguminosarum* حدود ۲۰ برابر بیش از میزان این آنزیم در برگ‌های نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) به‌عنوان گیاه همزیست باکتری می‌باشد. آنزیم استوهیدروکسی‌اسیدستتاز محل هدف علف‌کش ایمازتاپیر بوده و غلظت بالای آن می‌تواند اثرات بازدارندگی علف‌کش را جبران نماید (اسکارپونی و همکاران، ۱۹۹۵). مورمن (۱۹۸٦) نیز گزارش نموده است که محیط کشت YMB شامل اسیدهای آمینه است و می‌تواند اثرات منفی علف‌کش‌های بازدارنده ساخت آن‌ها (مانند ایمازتاپیر) را خنثی نماید.



شکل ٤- تغییرات جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* در غلظت‌های مختلف ایمازتاپیر (بارها مقادیر میانگین ± خطای استاندارد را نشان می‌دهد).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از مدل گومپرتز می‌تواند از طریق تخمین پارامترهای مهم رشد مانند حداکثر جمعیت تولید شده، سرعت ازدیاد و طول دوره رشد نمایی به درک نحوه رفتار *B. japonicum* در محیط کشت YMB کمک نماید. همچنین، استفاده از تابع لجستیک چهار پارامتری دز- پاسخ در این آزمایش نشان داد که علف‌کش‌های متری‌بیوزین > تریفلورالین > ایمازتاپیر به‌ترتیب بیش‌ترین تأثیر را روی جمعیت جدایه‌های *B. japonicum* داشتند. با این وجود، به‌نظر نمی‌رسد که رابطه‌های همزیستی سویا از این طریق تحت‌تأثیر قرار گیرد، چون تعداد باکتری باقی‌مانده خیلی بیش‌تر از مقدار مورد نیاز برای تشکیل تعداد کافی گره در سویا می‌باشد. تاکاتس (١٩٨٦) تعداد 10^5 تا 10^7 باکتری *B. japonicum* در میلی‌لیتر را برای تولید حداکثر گره در سویا کافی می‌داند که با نتایج پیرس و بوئر (١٩٨٣) نیز مطابق است.

منابع

1.Board, J.E., and Kahlon, C.S. 2011. Soybean yield formation: What controls it and how it can be improved. In: El-Shemy, H.A. (Ed.), Soybean physiology and biochemistry. In Tech Janeza Trdine Rijeka publication, Croatia.

2.Bohlool, B.B., and Schmidt, E.L. 1970. Immuno-fluorescence detection of *Rhizobium japonicum* in soil. Soil Sci. 110: 229-236.

3.Bollich, P.K., Dunigan, E.P., Kitchen, L.M., and Taylor, V. 1988. The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation, N_2 (C_2H_2) fixation, and seed yield of field grown soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. Weed Sci. 36: 15-19.

4.Borges, A.C., Guimarfies, W.V., Muchovej, R.M.C., and Gonzalez, G. 1990. Resistance of *Bradyrhizobium japonicum* strains to different fungicides and herbicides. World J. Mirob. Biotech. 6: 428-430.

5.Brown, H.M. 1990. Mode of action, crop selectivity and soil relations of sulfonylurea herbicides. Pestic. Sci. 29: 263-281.

6.Druin, P., Sellmani, M., Prevost, D., Fortin, J., and Antoun, H. 2010. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of *Rhizobiaceae*. J. Environ. Sci. Health. 45: 780-788.

7.Forlani, G., Mantelli, M., Branzoni, M., Nielsen, E., and Favilli, F. 1995. Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. Plant Soil. 176: 243-253.

8.Gaur, A.C. 1980. Effect of pesticides on symbiotic nitrogen fixation by legumes. Ind. J. Microbiol. 20: 362-370.

9.Gibson, A.M., Bratchell, N., and Roberts, T.A. 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int. J. Food Microbiol. 6: 155-178.

10.Gonzalez, A., Gonzalez-Murua, C., and Royuela, M. 1996. Influence of imazethapyr on Rhizobium growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). Weed Sci. 44: 31-37.

11.Heinonen-Tanski, H., Oros, G., and Kecskes, M. 1982. The effect on soil pesticides on the growth of red clover Rhizobia. Acta Agric. Scand. 32: 283-288.

12.Khan, M.S., Chaudhry, P., Wani, P.A., and Zaidi, A. 2006. Biotoxic effects of the herbicides on growth, seed yield and grain protein of greengram. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 10: 141-146.

13.Lee, Y.W., Jeong, S.Y., In, Y.H., Kim, K.Y., So, J.S., and Chang, W.S. 2010. Lack of O-polysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. Lett. Appl. Microbiol. 50: 452-546.

14.Mackey, B.M., and Kerridge, A.L. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *salmonella* in minced beef. Int. J. Food Microb. 6: 57-65.

15.Moorman, T.B. 1986. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. Weed Sci. 34: 628-633.

16. Pierce, M., and Bauer, W.D. 1983. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. Plant Physiol. 73: 286-290.
17. Prather, T.S., Ditomaso, J.M. and Holt, J.S. 2000. Herbicide resistance: Definition and management strategies. University of California-Division of Agriculture and Natural Resources [Online]. Available at: http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8012.pdf.
18. Procopio, S.O., Santos, J.B., Jacques, R.J.S., Kasuya, M.C.M., daSilva, A.A., and Werlang, R.C. 2004. Growth of *Bradyrhizobium* strains under the influence of herbicides glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr and carfentrazon-ethyl. Revista Ceres. 51: 178-188.
19. Qiu, L.J., and Chang, R.Z. 2010. The origin and history of soybean, P 1-3. In: Singh, G. (Ed.), the soybean: Botany, production and uses. CAB International.
20. Rao, V.S. 2000. Principles of weed science. Science Publisher Inc. 555p.
21. Rinaudi, L.V., and Gonzalez, J.E. 2009. The low-molecular weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. J. Bacteriol. 191: 7216-7224.
22. Royuela, M., Gonzalez, A., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.M., and Gonzalez-Murua, C. 1998. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. Pestic. Sci. 52: 372-380.
23. Sato, T., and Sugawara, S. 1988. Biochemical and serological characteristics of two similar soybean *Rhizobia*. Soil Sci. Plant Nutr. 34: 241-246.
24. Sawicka, A., and Selwet, M. 1998. Effect of active ingredients on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* legume dinitrogen fixation. Polish J. Environ. Studies. 7: 317-320.
25. Scarponi, L., Nemat-Ala, M.M., and Martinetti, L. 1995. Consequences on nitrogen metabolism in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] as a result of imazethapyr action on Acetohydroxy Acid Synthase. J. Agric. Food Chem. 43: 809-814.
26. Scholles, D., Mohrdieck, F.G., and Vargas, L.K. 2002. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. straines to different herbicides. Pesq. Agror. Gaucha. 8: 31-38.
27. Seefeldt, S.S., Jensen, J.E., and Fuerst, E.P. 1995. Log-Logistic analysis of herbicide dose-response relationships. Weed Technol. 9: 218-227.
28. Sheikhi-Gorjan, A., Najafi, H., Abbassi, S., Saber, F., and Rashid, M. 2012. A guideline for pesticides in Iran. Payetakht book publication, 395p.
29. Singh, G., and Wright, D. 2002. In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. Lett. App. Microbiol. 35: 12-16.
30. Somasegaran, P., and Hoben, H.J. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii. US Agency for International Development (USAID).

31. Somasegaran, P., and Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. NY. Springer-Verlag.
32. Sprouts, S.L., Nelson, L.M., and Germida, J.J. 1992. Influence of metribuzin on the *Rhizobium leguminosarum*-lentil (*Lens culinaris*) symbiosis. Can. J. Microbiol. 38: 343-349.
33. Takats, S.T. 1986. Suppression of nodulation in soybeans by superoptimal inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. Plant Physiol. 66: 669-673.
34. Taylor, A.D. 2008. The effects of herbicides on N_2 fixation in field pea (*Pisum sativum*) and chickpea (*Cicer arietinum*). M.Sc. Thesis. Department of Soil Science University of Saskatchewan, Saskatoon.
35. Trappe, J.M., Molina, R., and Castellano, M. 1984. Reaction of mycorrhiza fungi and mycorrhiza formation to pesticides. Ann. Rev. Phytopathology. 22: 331-359.
36. Weber, J.B., Wilkerson, G.G., Linker, H.M., Wilcut, J.W., Leidy, R.B., Senseman, S., Witt, W.W., Barrett, M., Vencill, W.K., Shaw, D.R., Mueller, T.C., Miller, D.K., Brecke, B.J., Talbert, R.E., and Peeper, T.F. 2000. A proposal to standardize soil/solution herbicide distribution coefficients. Weed Sci. 48: 75-88.
37. Zand, E., Mousavi, S.K., and Heidari, A. 2008. Herbicides and their application methods. Ferdowsi University Press, 280p.
38. Zawoznik, M.S., and Tomaro, M.L. 2005. Effect of chlorimuron ethyl on *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiosis with soybean. Pest Management Science. 61: 1003-1008.
39. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and VanTriet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1875-1881.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 4(3), 2014
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Evaluation of trifluralin, metribuzin and imazethapyr herbicides effects on *Bradyrhizobium japonicum* isolates growth

***N. Bagherani[1], S. Galeshi[2], E. Zeinali[3] and M.H. Arzanesh[4]**

[1]Ph.D. Student, Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Professor, Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Research Assistant Prof., Dept. of Soil and Water Research, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan province

Received: 07/10/2013; Accepted: 09/08/2013

Abstract

Growth of *B. japonicum* isolates at different concentrations of herbicide used in soybean was studied as factorial experiment arranged in a completely randomized design with three replications. Isolates B_1, B_6, B_{43} and 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 folded of the recommended doses of trifluralin, metribuzin and imazethapyr herbicides were considered as factors. Isolates population trends over time and colony forming unit (CFU) data at different herbicide concentrations were fitted using the Gompertz and four parameters logistic models, respectively. Results showed that Max. B_1, B_6 and B_{43} isolates population grown in YMB at 28 C were 4.77×10^9, 4.54×10^9 and 4.43×10^9 cell/ml, respectively. In addition to, isolates population doubled during 10.76, 11.55 and 12.51 hours and reached to their mid log phase in 26.14, 25.72 and 27.20 hours after incubation at 28 C. Using four parameters dose - response logistic models revealed metribuzin > trifluralin > and imazethapyr herbicides order affecting on *B. japonicum* population isolates. Mean estimated EC_{50} values for metribuzin, trifluralin and imazethapyr herbicides were 13, 7 and 4 $mg.L^{-1}$ which were 6 to 10 times more than herbicides recommended doses.

Keywords: Growth curve, Dose-response, Soybean symbiosis bacteria

* Corresponding Authors; Email: bagherani@yahoo.com