اثر ورمی کمپوست غنی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان pH و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در یک خاک آهکی

فائزه پرستش[۱]، حسن اعتصامی[۲]، حسینعلی علیخانی [۳]
به ترتیب دانشجوی ارشد، استادیار و استاد گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(faeze.parasetsh@ut.ac.ir)

چکیده

به منظور بررسی اثر ورمی کمپوست غنی‌سازی با باکتری‌های حل‌کنندگی فسفات بر pH و فعالیت آنزیم دهیدروژناز آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتور ورمی‌کمپوست غنی شده در ۹ سطح [ورمی کمپوست + *Pseudomonas aeruqinosa* V53 (T_1)، ورمی‌کمپوست + *Kluyvera cryocrescens* V22 (T_2)، ورمی‌کمپوست + *Serratia marcescens* V38 (T_3)، ورمی کمپوست + *Pseudomonas aeruginosa* V62 (T_4)، ورمی‌کمپوست + *Bacillus thuringiensis* V57 (T_5)، *Serratia marcescens* V38 (T_6)، کود سوپر فسفات تریپل (T_7)، ورمی‌کمپوست (T_8) و شاهد منفی (T_9)] و فاکتور مدت زمان انکوباسیون در دو سطح (۰ و ۳۰ روز) با سه تکرار طراحی و اجرا گردید. بعد از اعمال تیمارها در زمان‌های صفر و سی روز پس از انکوبه کردن در دمای ۲۹ C° ، pH و فعالیت آنزیم دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش دوره انکوباسیون فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک افزایش و pH خاک کاهش یافت.

کلمات کلیدی: ورمی‌کمپوست غنی‌سازی ، pH ، فعالیت آنزیم دهیدروژناز

مقدمه:

عنصر فسفر موقعیت مهمی را در رشد گیاه و بیولوژی خاک دارد. این عنصر در ساختمان ترکیب های آلی و غیر آلی خاک، گیاهان و میکروارگانیسم ها وجود دارد. نقش اصلی و فیزیولوژیک آن تجمع و آزاد کردن انرژی در طی متابولیسم سلولی است. مطالعات نشان می‌دهد که منابع سهل‌الوصول کودهای فسفاته در دنیا رو به کاهش است و طی ۷۰-۸۰ سال آینده به اتمام می‌رسد. طبق آمار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، بیش از ۷۰ درصد از کل خاک‌های ایران از نظر فسفر قابل‌جذب زیر حد بحرانی (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار دارند (طهرانی و همکاران، ۱۳۹۱). امروزه استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی که کاربرد آنها موجب آسیب‌های زیست‌محیطی فراوانی می‌گردد، توصیه می‌شود و روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. ورمی‌کمپوست محصول نهایی فرآیند تجزیه مواد آلی در حضور کرم های خاکی کمپوست-ساز می‌باشد و به دلیل کاهش سطح آلاینده‌ها و داشتن سطح بالای جمعیت میکروبی و عناصر غذایی، در حال حاضر به عنوان یکی از بهترین کودهای زیستی مطرح شده است (Hanc et al., 2008).

مشخص شده است که غنی‌سازی ورمی‌کمپوست با باکتری های حل کننده فسفات، می‌تواند موجب افزایش فسفر قابل جذب و جمعیت میکروبی در ورمی کمپوست شود (کوشیک و همکاران ۲۰۰۸، بوزاتو و همکاران ۲۰۱۲). علاوه براین، گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد باکتری‌های با توان مختلف حل‌کنندگی فسفات اثرهای متفاوتی روی فراهمی فسفر و متعاقبا جمعیت میکروبی خواهند داشت. به عنوان مثال باشان و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که یک باکتری با توان حل کنندگی فسفات بالا نسبت به باکتری دیگر با توان حل کنندگی فسفات کم منجر به فراهمی کمتر فسفر برای گیاه شده است (Bashan et al., 2013).

تنفس و زیتوده میکروبی، معدنی شدن نیتروژن در خاک و فعالیت آنزیمی خاک برخی از شاخص های زیستی خاک می باشند. از میان این شاخص ها، فعالیت آنزیمی خاک سهم قابل ملاحظه ای در تجزیه مواد آلی خاک دارد (Renella, 2005). فعالیت آنزیم های خاک به وسیله ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و سیاست‌های مدیریتی متاثر می‌شود و اغلب به عنوان شاخص فعالیت میکروبی و حاصلخیزی خاک در نظر گرفته می شوند (Alvarez & Guerrero, 2000 Bandick & Dick,

1999) ، زیرا این فعالیت های آنزیمی خاک ارتباط نزدیکی با چرخه عناصر غذایی در خاک دارند. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنزیم های خاک مهم‌ترین شاخص تعیین کیفیت و سلامت خاک به شمار می‌آیند. سنجش فعالیت آنزیمی حساس ترین شاخص به تاثیر فاکتورهای محیطی بر عملکرد میکروبی است زیرا در چرخه عناصر غذایی موثر است (Trasar, 2008). دهیدروژنازها متعلق به اکسیدو رودکتازها و انتقال‌دهنده هیدروژن هستند. فعالیت دهیدروژناز به عنوان شاخصی برای سیستم زیستی اکسایش و کاهش بوده و چون فقط در سلول های زنده میکروبی وجود دارد، نشانگر مقیاس مناسبی برای فعالیت میکروبی و اندازه گیری شدت متابولیسم میکروبی در خاک محسوب می شود (Nannipieri,2002). با توجه به موارد ذکر شده، هدف از این پژوهش، اثر ورمی‌کمپوست غنی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات با توان های مختلف بر میزان pH و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در یک خاک آهکی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری ورمی کمپوست و خاک: برای انجام این تحقیق نمونه ورمی‌کمپوست از مرکز تحقیقات ورمی‌کمپوست پردیس کشاورزی دانشگاه تهران برداشته شد. نمونه‌برداری خاک، از خاک حاوی مقدار فسفر کم و آهکی واقع در منطقه اشتهارد (ارتفاع از سطح دریا ۱۱۸۱ متر، طول جغرافیایی ۱۹ʻ ۵۰ ˚ شرقی و عرض جغرافیایی ʼ ۴۴ ˚ ۳۵ شمالی) انجام شد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی کمپوست به روش های استاندارد تعیین شدند. (Nelson and Sommers1989; Olsen and Sommers,1982; Gee and Bauder1986;) (جدول ۱).

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات: برای این منظور ابتدا از ورمی کمپوست سری رقت های مختلف تهیه و سپس به محیط کشت نوتریت آگار منتقل گردید. بعد از آن کلیه جدایه های باکتری موجود در ورمی کمپوست به محیط کشت اسپربر (Sperber, 1953) منتقل شد و توانایی انحلال فسفر معدنی آن‌ها بررسی گردید و در نهایت قطر هاله به کلنی آن‌ها اندازه‌گیری شد (MacFadine; 1980).

شناسایی باکتری‌های جداسازی شده: پس از رشد کلنی باکتری ها، ۵ جدایه از باکتری‌های با توان مختلف انحلال فسفات نامحلول معدنی انتخاب و شناسایی با استفاده از روش توالی یابی ناحیه 16S rDNA انجام شد (Cáceres et al., 2009).

اجرای آزمایش: آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتور وری کمپوست غنی شده در ۹ سطح شامل :

T_1- ورمی کمپوست + باکتری با توان متوسط V53 *Pseudomonas aeruqinosa*

T_2- ورمی کمپوست + باکتری با توان نسبتاً بالا V22 *Kluyvera cryocrescens*

T3- ورمی کمپوست + باکتری با توان بالا V38 *Serratia marcescens*

T4- ورمی کمپوست + باکتری با توان نسبتا متوسطV62 *Pseudomonas aeruginosa*

T5- ورمی کمپوست + باکتری بدون توان V57 *Bacillus thuringiensis*

T6- باکتری با توان بالا V38 *Serratia marcescens*

T7- کود سوپر فسفات تریپل (شاهد مثبت)

T8- ورمی کمپوست

T_9- شاهد منفی و فاکتور مدت زمان انکوباسیون (۰ و ۳۰ روز) با سه تکرار اجرا گردید. بدین منظور مخلوط ۴ کیلوگرم خاک و ورمی کمپوست به نسبت ۱۰:۱ درون گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. سپس مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از زاد مایه باکتری‌های مورد نظر با جمعیت 4×10^9 CFU ml^{-1} به تمام گلدان‌ها افزوده شد. گلدان‌ها در دمای ۲۹ درجه سیلیسوس و تهویه مناسب به

مدت ۳۰ روز نگه داری شدند. در طول دوره انکوباسیون رطوبت گلدان ها در دامنه ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به روش وزنی حفظ گردید.

میزان pH خاک به روش عصاره گل اشباع (Mclean, 1982) و فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک نیز به روش اولینگر (Elinger, 1996) در دو زمان صفر و ۳۰ روز برای همه تیمارها اندازه‌گیری شدند. در نهایت تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و رسم نمودار با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث:

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مورداستفاده در جدول۱ ارائه شده است. خاک مورد استفاده آهکی، دارای pH قلیایی و از نظر فسفر قابل دسترس زیر سطح بحرانی (۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بود.

توانایی کیفی باکتری‌های مختلف حل‌کننده فسفات معدنی: توانایی انحلال فسفات نامحلول معدنی (قطر هاله به کلونی) برای جدایه های V38، V22، V53، V62 و V57 به ترتیب ۳/۵، ۲/۹، ۲/۴، ۱/۹ و صفر اندازه گیری شد که بیشترین میزان انحلال فسفر معدنی مربوط به جدایه V38 با قطر هاله به کلونی ۳/۵ و کمترین توان مربوط به جدایه V57 بدون توان انحلال فسفات نامحلول معدنی بود.

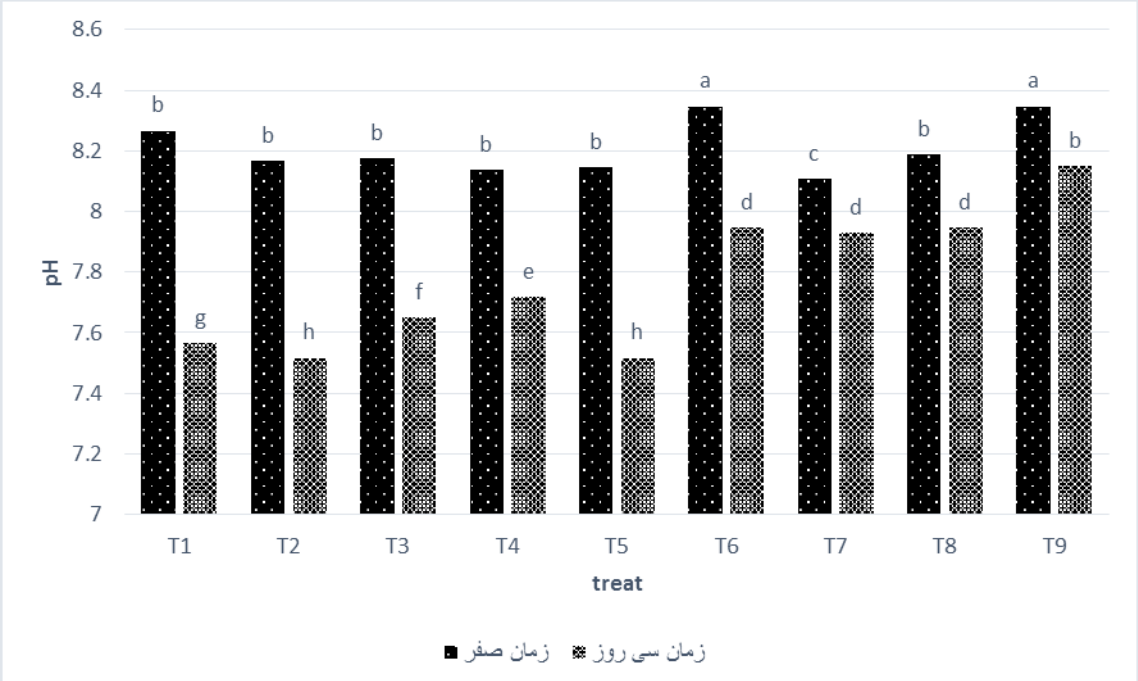
شناسایی باکتری: نتایج حاصل از توالی ژن 16S rDNA نشان داد که جدایه V22 با شباهت ۹۹ درصد به گونه *Kluyvera cryocrescens*، جدایه V38 با شباهت ۱۰۰درصد به گونه *Serratia marcescens*، جدایه V57 با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه *Bacillus thuringiensis*، سویه شماره ۶۲ با شباهت ۱۰۰ درصد به گونه *Pseudomonas aeruginosa* و جدایه شماره ۵۳ با شباهت ۸۹ درصد به گونه *Pseudomonas aeruqinosa* تعلق دارند. در مطالعات گذشته چنین باکتری‌هایی به عنوان حل کنندهای فسفات نیز گزارش شده است (Bashan et al., 2013)

اثر تیمارها بر میزان pH : اثر تیماری مختلف روی pH خاک معنی دار ($p < 0.05$) بود. نتایج مقایسه میانگین بین همه تیمارها نشان داد که با افزایش زمان انکوباسیون تا ۳۰ روز، میزان pH در خاک در همه تیمارها کاهش یافته که بیشترین کاهش مربوط به تیمار T2 و T5 که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ بود که بر طبق مطالعات گذشته می تواند ناشی از افزایش فعالیت باکتری های حل کننده فسفات به دلیل ترشح اسید و انحلال فسفر و در نهایت کاهش pH خاک باشد (Bashan;2013)(شکل ۱).

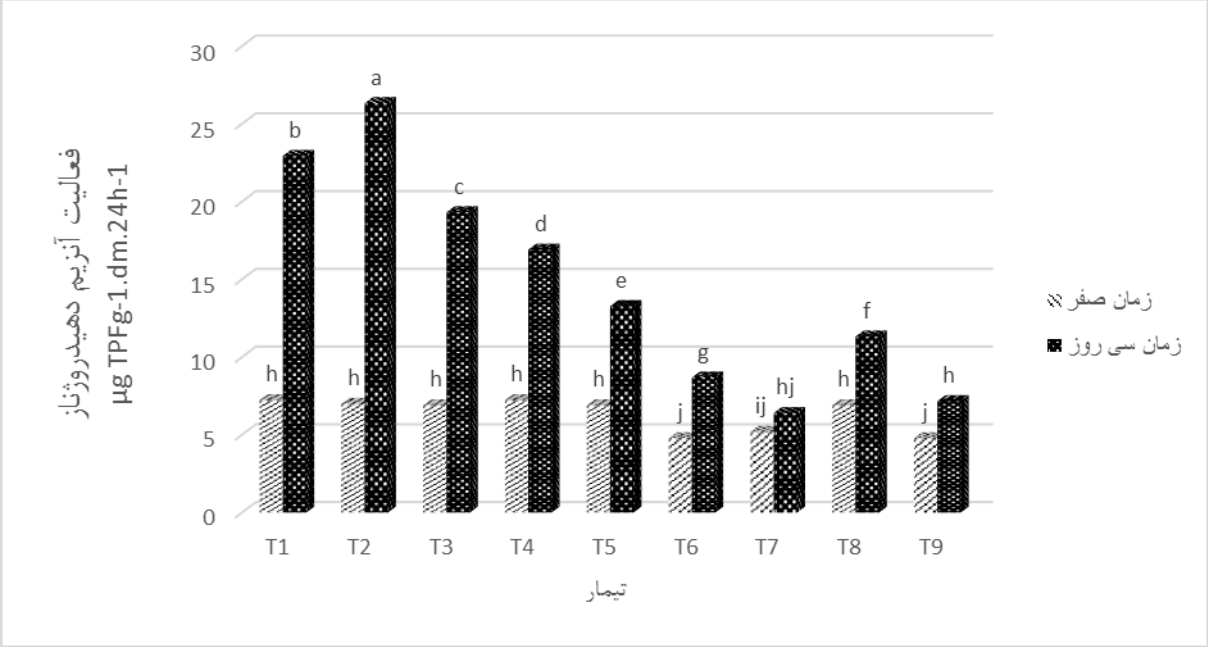
اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز: در شروع دوره انکوباسیون با کاربرد ورمی کمپوست (T1، T2، T3، T4، T5 و T8) فعالیت آنزیم دهیدروژناز در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی و مثبت (T7 و T9) و تیمار حاوی باکتری به تنهایی (T6) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) (شکل ۲). فعالیت آنزیم دهیدروژناز در تیمارهای T1، T2 و T3 از ۷/۲۳، ۷ و ۶/۸۹ در زمان شروع به ترتیب به ۲۳، ۲۶، ۱۹ در پایان دوره انکوباسیون افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۲).

جدول۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی کمپوست مورداستفاده

ویژگی	خاک	ورمی کمپوست
رس (درصد)	۲۱/۲	-
سیلت (درصد)	۱۷/۵	
شن (درصد)	۶۱/۳	
کلاس بافت خاک	لومی رسی شنی	
قابلیت هدایت الکتریکی(dS/m)	۳	۷/۸
رطوبت ظرفیت مزرعه (درصد)	۲۴/۲	
کربن آلی (درصد)	۰/۴۱	۲۴/۳۸
کربنات کلسیم معادل (٪)	۱۵	
فسفر قابل‌جذب	۴/۸۷ (میلی‌گرم در کیلوگرم)	۰/۸۷ (درصد)
پتاسیم قابل‌استخراج	۴۲۰ (میلی‌گرم در کیلوگرم)	۶/۵۲ (درصد)
pH (گل اشباع)	۸/۴	۸/۴
جمعیت میکروبی (CFU/g)	۹۳×۱۰^{۴}	۱۰۸×۱۰^{۶}
جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی (CFU/g)	۲×۱۰^{۴}	۲×۱۰^{۵}



شکل ۱- اثر متقابل تیمارها بر pH درابتدا و پایان دوره انکوباسیون. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می-باشد.



شکل ۲- اثر متقابل تیمارها بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز درابتدا و پایان دوره انکوباسیون. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

به‌طورکلی در تحقیق انجام شده باکتری های مختلف حل کننده فسفات نتایج متفاوت نشان دادند. استفاده از باکتری با توان بالای حل کنندگی فسفات معدنی بهترین اثر را در کاهش pH قابل دسترس و فعالیت آنزیم دهیدروژناز داشت.

منابع

Anderson, J.P.E., 1982. Soil respiration. In: Page, A.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 837–871.

McLean, E. O. (1982) Soil pH and lime requirement. In: Page, A. L. (ed): Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison, Wisconsin, USA. P: 199-224.

Nannipieri, P., Kandeler, E. and Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil.p. 1-33. In: Burns, R. G. and Dick, R. P. (ed.) Enzymes in the environment. Marcel Dekker, New York.

Trasar-Cepeda, C., M.C. Leiro, F. and Gil-Sotres. 2008. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. Soil Biology and Biochemistry 40:2146-2155.

Renella, G., Mench, M., Landi, L. and Nannipieri, P. 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 37: 133-139.

Muller, J. F. 1933. Some observations on base exchange in organic materials. Soil Science, 35: 229-238.

Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J. and Roig, A. 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. Bioresource Technology, 85: 1-8.

Somebroek, W. G. (1993). Amounts, dynamics and sequestering of carbon in tropical and subtropical soils. Ambio, 22, 417-426.

St. Arnaud, R.J. and Sephton, G.A., 1972. Contribution of clay and organic matter to cation-exchange capacity of Chernozemic soils. Canadian Journal of Soil Science, 52: 124-126.
Steiner, C., Teixeira, W. G., Lehmann, J., Nehls, T., de Macêdo, epJ. L. V., Blum, W. E. and Zech, W. 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. Plant and soil, 291: 275-290.
Stevenson, F.J. 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley and Sons, New York.

Effect of vermicompost enriched by phosphate solubilizing bacteria on pH and dehydrogenase enzyme activity in calcareous soil

F. Parastesh[1] H. Etesami [2] H. Alikhani[3]
Ms.c Student (faeze.parasetsh@ut.ac.ir), Assistant Professor, Professor respectively,
Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology,
University of Tehran, Iran

Abstract

To study the effect of vermicompost enriched by phosphate solvers bacteria on pH and activity of dehydrogenase, an factorial experiment in a completely randomized design includes 9 levels of enriched vermicompost [vermicompost + Pseudomonas aeruqinosa V53 (T1), vermicompost + V22 Kluyvera cryocrescens (T2), vermicompost + V38 Serratia marcescens (T3), vermicompost + V62 Pseudomonas aeruginosa (T4), vermicompost + V57 Bacillus thuringiensis (T5), Serratia marcescens V38 (T6), triple super phosphate (T7), vermicompost (T8) and a negative control (T9)] and two levels of incubation time (0 and 30 days) with three replications was performed. Dehydrogenase enzyme activity and pH were measured in first day and 30 days after beginning treatment at 29 Cº. The results showed that by increasing the incubation period dehydrogenase enzyme activity and increased soil pH in soil. The results showed that by increasing the incubation period up to 30 days, dehydrogenase enzyme activity increased and soil pH decreased.

Keywords: Vermicompost enriched, pH, Activity of dehydrogenase