اثر ورمی‌کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان فراهمی فسفر و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در یک خاک آهکی

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

چکیده

پایین بودن قابلیت استفاده از فسفر توسط گیاهان در خاک های آهکی یکی از عوامل اصلی محدود کننده رشد است. استفاده از باکتری های حل کننده فسفات می تواند سبب افزایش حلالیت فسفر شود. به‌منظور بررسی اثر ورمی کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل‌کنندگی فسفات با توان های مختلف بر فعالیت آنزیم فسفاتاز و فراهمی فسفر آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتور وری کمپوست غنی شده در ۹ سطح [ورمی کمپوست + *Pseudomonas aeruqinosa* V53 (T_1)، ورمی کمپوست + *Kluyvera cryocrescens* V22 (T_2)، ورمی کمپوست + *Serratia marcescens* V38 (T_3)، ورمی کمپوست + *Pseudomonas aeruginosa* V62 (T_4)، ورمی کمپوست + *Bacillus thuringiensis* V57 (T_5)، *Serratia marcescens* V38 (T_6)، کود سوپر فسفات تریپل (T_7)، ورمی کمپوست (T_8) و شاهد منفی (T_9)] و فاکتور مدت زمان انکوباسیون در دو سطح (۰ و ۳۰ روز) و سه تکرار طراحی و اجرا گردید. بعد از اعمال تیمارها در زمان‌های صفر و سی روز بعد از انکوباسیون در دمای ۲۹ درجه سلسیوس، فسفر قابل‌جذب و فسفاتاز قلیایی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش دوره انکوباسیون فعالیت آنزیم فسفاتاز و فراهمی فسفر خاک افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: غنی‌سازی ورمی کمپوست، فراهمی فسفر، فسفاتاز قلیایی

مقدمه

خاک‌های نواحی خشک و نیمه‌خشک، به دلیل کمبود پوشش گیاهی و عدم بازگشت این پوشش گیاهی به خاک، حاوی ماده آلی کمی هستند. این خاک‌ها اغلب آهکی هستند، بنابراین اغلب این خاک‌ها با مشکل تغذیه‌ای، بخصوص عناصر پرمصرف روبه‌رو هستند (Karami et al., 2009). اما مطالعات نشان داده است که به دلیل پیچیدگی خاصیت شیمیایی فسفر در خاک‌های آهکی و اسیدی، تنها کمتر از ۲۰٪ کود فسفرِ مصرفی توسط گیاه برداشت می‌شود و بقیه آن در خاک تثبیت و یا تغییر شکل یافته و به شکل غیرقابل جذب درمی‌آید (Vance et al.2003). این در حالی است که مطالعات نشان می‌دهد که منابع سهل‌الوصول کودهای فسفاتِ 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 ازنظر فسفر قابل‌جذب زیر حد بحرانی (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار دارند (طهرانی و همکاران، ۱۳۹۱). ازجمله روش‌های افزایش مقدار قابل‌جذب این عنصر استفاده از مواد آلی است (Karami et al., 2009). از مهم‌ترین کودهای زیستی شناخته‌شده تاکنون ورمی کمپوست را می‌توان بیان کرد. ورمی کمپوست موادی یکنواخت و شبیه پیت هستند که به‌وسیله فرایندی غیر از گرمادهی درنتیجه تعامل بین کرم‌ها و ریز موجودات منجر به اکسیداسیون زیستی و تثبیت ماده آلی می‌شود در واقع ورمی کمپوست می‌تواند کیفیت ماده آلی را بدون درخطر انداختن ایمنی آن‌ها بهبود ببخشد (Hanc et al.2008). یکی از راه‌های افزایش فسفر نامحلول استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات ازجمله باکتری‌ها است که موجب حل شدن فسفات‌ها نامحلول و درنتیجه سبب افزایش فسفر قابل‌دسترس برای گیاه می‌شود(Kumar and Narula, 1999). افزایش دسترسی زیستی فسفر توسط این میکروارگانیسم‌ها با تولید اسید آلی صورت می‌گیرد که فسفر معدنی را قابل‌جذب می‌سازد از طرف دیگر معدنی کردن فرم آلی فسفر توسط آنزیم‌های فسفاتاز صورت می‌گیرد که با تبدیل فرم آلی و غیرقابل جذب فسفر به یون‌های قابل‌جذب فسفات توسط میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات انجام می‌گیرد(Tabatabai, 2003). در مطالعات گذشته مشخص‌شده که استفاده

از باکتری‌های حل‌کننده فسفر با توان بالا لزوماً سبب افزایش فسفر قابل‌دسترس نمی‌شوند (Bashan et al.2012). با توجه به موارد ذکر شده، هدف از این پژوهش، اثر غنی‌سازی ورمی کمپوست با باکتری‌های با توان مختلف حل‌کنندگی فسفر بر میزان فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی خاک و فسفر قابل‌دسترس در خاک آهکی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری ورمی کمپوست و خاک

برای انجام این تحقیق نمونه ورمی کمپوست از مرکز تحقیقات ورمی کمپوست 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 ‘۱۹ °۵۰ شرقی و عرض جغرافیایی ’ ۴۴ °۳۵ شمالی) انجام شد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی کمپوست به روش های استاندارد تعیین شدند. (Olsen and Nelson and Sommers;1982,Gee and Bauder;1986 ;Sommers1982) (جدول۱).

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 منتقل تا توانایی انحلال فسفر معدنی آن‌ها بررسی سپس قطرهاله به کلنی آن‌ها اندازه‌گیری و جدایه های با توان انحلال فسفر معدنی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت (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 (Caceres et al., 2009).

اجرای آزمایش

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۳ تکرار و شامل تیمارهای:

T1- ورمی کمپوست + باکتری با توان متوسط V53 *Pseudomonas aeruqinosa*

T2- 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 متوسط V62 *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

T9- شاهد منفی

اجرا گردید. بدین منظور مخلوط ۴ کیلوگرم خاک و ورمی کمپوست به نسبت ۱۰:۱درون گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. سپس مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از زاد مایه باکتری‌های مورد نظر با جمعیت $CFU.ml^{-1}$ ۴×۱۰^{۹} 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 فسفر قابل‌دسترس به روش اولسن (Olsen and Sommers, 1982) و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز به روش طباطبائی (Tabatabai.1982) 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.

جدول۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی‌کمپوست مورداستفاده

ویژگی	خاک	ورمی کمپوست
رس (٪)	۲۱/۲	-
سیلت (٪)	۱۷/۵	
شن (٪)	۶۱/۳	
کلاس بافت خاک	لومی رسی شنی	
رطوبت ظرفیت مزرعه (٪)	۲۴/۲	
کربن آلی (٪)	۰/۴۱	۲۴/۳۸
کربنات کلسیم معادل (٪)	۱۵	
فسفر قابل‌جذب	۴/۸۷ (mg/kg)	۰/۸۷(٪)
پتاسیم قابل‌استخراج (mg/kg)	۴۲۰	۶/۵۲ درصد
ظرفیت تبادل کاتیونی (Cmol +/kg)	۱۷/۵	
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^{۳}	۲×۱۰^{۴}

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی کمپوست مورداستفاده در جدول۱ ارائه‌شده 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 جدایه‌های 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 باکتری هایی به عنوان حل کننده‌های فسفات نیز گزارش شده است (Bashan et al., 2013).

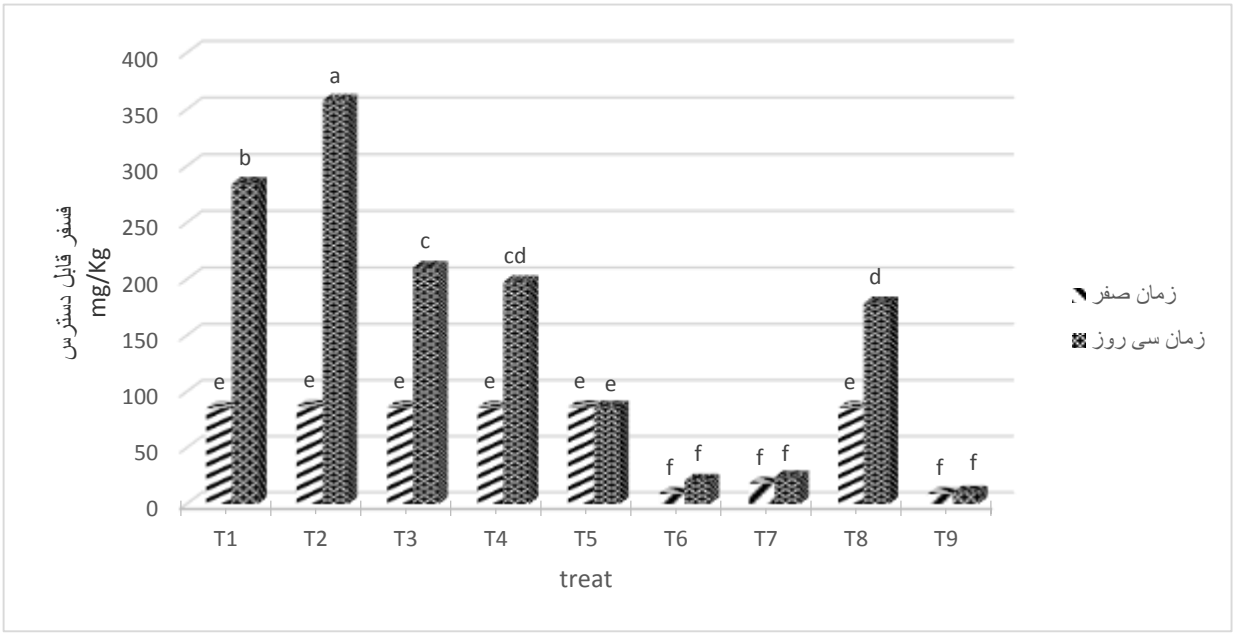
اثر تیمارها بر فراهمی فسفر

نتایج مقایسه میانگین بین همه تیمارها نشان داد که با افزایش زمان تا ۳۰ روز، میزان فسفر قابل‌دسترس در خاک در همه تیمارها به جز در تیمارهای T5 و T9 افزایش‌یافته که بیشترین افزایش مربوط به تیمار T2 که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ بود که این نتایج با نتایج همتی و همکاران (۲۰۱۲) یکسان بود (شکل۱). Scervino و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش دادند که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب افزایش فسفر قابل‌دسترس

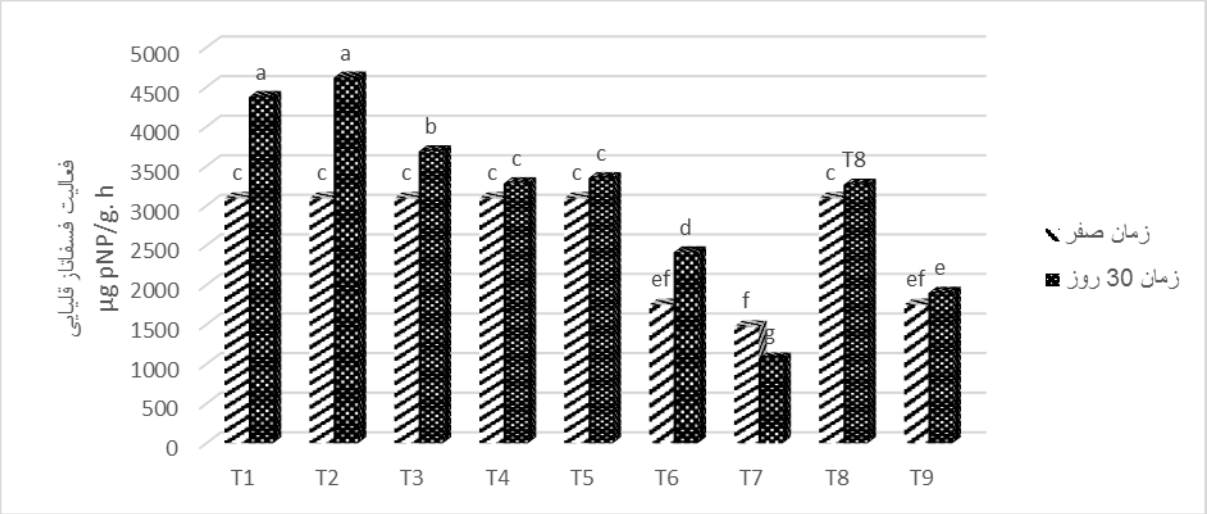
می‌شود که به دلیل ترشح اسیدهای آلی می‌باشد. Badanur و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که افزایش بسیار زیاد فسفر در صورت استفاده از مواد آلی به دلیل تجزیه این مواد و آزادسازی اسیدهای آلی است. Kumar و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که غنی‌سازی ورمی‌کمپوست با باکتری‌های حل‌کننده فسفات میزان فسفر قابل‌دسترس گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

در شروع دوره انکوباسیون با کاربرد ورمی کمپوست (T1، T2، T3، T4، T5 و T8) فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی و مثبت (T7 و T8) و تیمار حاوی باکتری به تنهایی (T6) به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمارهای T1، T2، T3 و T6 از ۳۰۹۷/۹۶، ۳۱۰۰/۶۷، ۳۱۰۲/۵۶، ۱۷۴۹/۵۹ در زمان شروع به ترتیب به ۴۳۷۲/۵۵، ۴۶۱۸/۷۵، ۳۶۸۵/۱۴، ۲۴۰۹/۶۳ (µg PNP/g.h) در پایان دوره انکوباسیون افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۲). فعایت آنزیم فسفاتاز پس از ۳۰ روز انکوباسون به دلیل افزایش و تحریک جامعه میکروبی افزایش یافت. در تحقیقی اثبات شده که با افزایش ماده آلی به خاک میزان فعالیت آنزیم های فسفاتاز افزایش می‌یابد (Martens و همکاران ۱۹۹۲) در مقابل این فعالیت در تیمار T7 که کود سوپر فسفات تریپل دریافت کرده بود در پایان دوره انکوباسیون به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۲). در تیمار T7 میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی کاهش‌یافته است که می‌تواند ناشی از استفاده کود شیمیایی و کاهش زیست‌توده میکروبی باشد. Nannipieri و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که از عوامل مهم توقف فعالیت آنزیم فسفاتاز ها افزایش فسفر معدنی به خاک است. Ghoularata و همکاران ۲۰۰۸ گزارش کردندکه با افزایش فسفر قابل‌دسترس میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز کاهش می‌یابد.



شکل ۱- اثرات متقابل تیمارهای مختلف بر میزان فسفر قابل‌دسترس خاک در ابتدا و انتهای دوره انکوباسیون. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشد.



شکل۲- اثرات متقابل تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.01$) 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 افزایش فسفر قابل دسترس و فعالیت آنزیم فسفاتاز داشت. در حالیکه با کاربرد کودسوپرفسفات تریپل به دلیل افزایش فراهمی فسفر در خاک، فعالیت آنزیم فسفاتاز کاهش یافت.

منابع

طهرانی، م.م. م.ر. بلالی، ف. مشیری، و ع. دریا شناس. ۱۳۹۱. توصیه و برآورد کود در ایران :چالش‌ها و راهکارها. مجله پژوهش خاک(علوم خاک و آب). ۲: ۲۶. ۱۳-۱۴.

Badanur, V. P., Poleshi, C. M., and Naik, B. K. (1990). Effect of organic matter on crop yield and physical and chemical properties of a vertisol. *Journal of the Indian Society of Soil Science.* 38(3), 426-429

Chapman, H.D. (1965). Cation exchange capacity. In Black, C.A., Evans, D.D., White, L.J., Ensminger, L.E., and Clark, F.E. (eds.), Methods of Soil Analysis. *American Society of Agronomy, Madison, WI*, pp. 891–901.

Gee, G.W., and Bauder, J.W. (1986). Particle- size analysis. In Klute, A. (ed.), Methods of Soil Analysis. Part1. Physical and Mineralogical Methods. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA*, pp. 383-411.

Ghoularata, M., Raeisi, F., and Nadian, H. 2008. Salinity and phosphorus interact growth yield and nutrient uptake by Berseem. Clover (*Trifolium alexandrinum* L.) Field Crops Res. 6: 117-126.

Hanč A, Tlustoš P, Szakova J and Balik J, 2008. The influence of organic fertilizers application on phosphorus and potassium bioavailability. Plant, Soil and Environment, 54 (6): 247–254

Karami, M., Afyuni, M., Rezaee Nejad, Y., and Khosh Goftarmanesh, A. (2009). Cumulative and Residual Effects of Sewage Sludge on Zinc and Copper Concentration in Soil and Wheat. *Journal of science and technology of agriculture and natural resources*, 12(46), 639-654.

Kumar V and Narula N, 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergance of wheat as a.ected by Azotobacter chroococcum. Biology and Fertility of Soils 28, 301-305.

IUSS, W. (2014). World Reference Base for Soil Resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps.*World Soil Resources Reports*, (106).

MacFadine J.F. 1980. Biochemical tests for identification of bacteria. Second edition. Williams and Wilkins publication USA. 527 page.

Makoi, J. H. J. R., and Ndakidemi, P. A. 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. Afr. J. Biotechnol. 7: 181-191.

Marschner, P., Z.M. Solaiman and Z. Rengel. 2005. Growth phosphorus uptake and rhizosphere microbial community composition of a phosphorus-efficient wheat cultivar in soils differing in pH. J. Plant Nutr. Soil Sci.168: 343-351.

Nelson, D.W., and Sommers, L.E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In:Page, A.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis. Part 2. 2nd Edition Agronomy. Monographs. 9. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA*, pp. 539-579.

Olsen, S.R., and Sommers, L.E. (1982). Phosphorus. In Klute, A. (ed.), Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and microbiological Methods. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA*, pp. 403-430.

Scervino JM, Mesa MP, Mńica ID, Recchi M, Moreno NS and Godeas A, 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol. Fertil. Soils 46, 755–763.

Subler, S., Edward, C. A and Metzger, J. D. 1998. Comparing vermicompost andcompost. Biocycle. J. 39: 63-68.

Tabatabai, M. A. (1982). Soil enzymes, in: Methods of Soil Analysis, part 2, *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA*, pp. 903-947.

Tabatabai, M. A. 2003. Enzymes: past, present and future. Second internationalconference on enzyme in the environment: Activity, Ecology and Application. Prague,Czech Republic. 14-17.

T. Cáceres, M. Megharaj, S. Malik, M. Beer, R. Naidu, Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by Microbacterium sp. in pure culture and groundwater, Bioresour. Technol. 100 (2009) 2732–2736.

Vance, C., C. Uhde-Stone and D.L. Allan. 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol. 157: 423-447.

Effect of vermicompost enriched by phosphate solubilizing bacteria on phosphorus availability and alkaline phosphatase activity in calcareous soil

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

Abstract:
Low availability of phosphorus by plants in calcareous soil is one of the main factors limiting growth. The use of phosphate solubilizing bacteria can increase the solubility of phosphorus. To investigate the effect of vermicompost enriched by phosphate solvers bacteria with the different activities on phosphatase activity and phosphorus availability, an factorial experiment in a completely randomized design includes vermicompost enriched in the 9 level [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), superphosphate fertilizer Triple (T7), vermicompost (T8) and a negative control (T9)] and two levels of incubation time (0 and 30 days) and three replications was designed. After 0 and 30 days incubation at 29 ° C, available phosphorous and alkaline phosphatase were measured. The results showed that by increasing the incubation period and phosphatase activity of soil phosphorus increases.
Keywords: Vermicompost enriched, Phosphorus, Alkaline phosphatase