محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تاثیر مقدار لیگنین و گونه‌های ترموفیل باکتری بر تنفس میکروبی طی فرآیند کمپوست شدن

آرش همتی[۱*]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، رضا خاکور[۳]

[۱] فارغ التحصیل دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

فرآیند معمولی تولید کمپوست زمان زیادی برای تجزیه نیاز دارد. این زمان می‌تواند با تلقیح میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه مواد سخت را دارند سریع تر انجام گیرد. از جمله این روش‌ها استفاده از میکروب‌هایی است که توانایی تجزیه لیگنین و سلولز را دارند. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر گونه‌های مختلف باکتریایی (سه جدایه *P. validus* 1VC، *P. koreensis* 12C و *B. nealsonii* 104C) در تجزیه مواد لیگنینی در درصدهای مختلف لیگنین انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار تنفس میکروبی به عنوان معیار اصلی فعالیت زیستی اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که بیشترین تنفس در هفته‌های اول مربوط به تیمارهای شاهد بدون باکتری بود ولی با گذشت زمان تیمارهای شاهد بیشترین کاهش تنفس را داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین، در چهار هفته بیشترین تنفس در تیمارهای لیگنین پایین مشاهده شد ولی بعد از چهار هفته اول و تقریبا تا پایان دوره کمپوست‌شدن، تیمارهای لیگنین بالا تنفس بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند. در بین گونه‌های باکتریایی استفاده شده، در بستر لیگنین پایین گونه 104C و کنسرسیوم بیشترین و تیمار شاهد کمترین تنفس و در بین تیمارهای لیگنین بالا گونه‌های 1VC و کنسرسیوم باکتریایی بیشترین و شاهد کمترین تنفس را در اوج دوره تنفس داشتند. در هر دو بستر لیگنینی تیمارهای باکتریایی در دوره ترموفیلی تنفس بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که نشان دهنده کارایی تیمارهای ترموفیلی باکتریایی در زنده‌مانی میکروبی بود.

کلمات کلیدی: کمپوست، ترموفیل، تنفس، باکتری، لیگنین

مقدمه

کمپوست‌شدن، تجزیه بیولوژیکی و تغییر شکل مواد آلی در شرایط ویژه‌ای از لحاظ رطوبت و تهویه می‌باشد که با تولید حرارت (شرایط ترموفیلیک) محصول نهایی تثبیت گردیده و عاری از عوامل بیماری‌زا و بذور گیاهان می‌شود. دیواره‌سلولی بقایای گیاهی از سه قسمت اصلی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین تشکیل شده است. ساختار سلولزی باعث شده است که تعداد اندکی آنزیم برای تجزیه آن کفایت کند. لیگنین یک پلیمر پیچیده از فنیل‌پروپان می‌باشد که پیچیده بودن ترکیب آن و داشتن حلقه‌های فنلی باعث شده است تا تجزیه بیوشیمیایی (آنزیمی) آن بسیار مشکل باشد (کلوژک- تورپینن و همکاران، ۲۰۰۳).

فرآیند معمولی تولید کمپوست زمان زیادی برای تجزیه نیاز دارد. این زمان می‌تواند با تلقیح میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه مواد سخت را دارند سریع تر انجام گیرد. از جمله این روش‌ها استفاده از میکروب‌هایی است که توانایی تجزیه لیگنین و سلولز را دارند. تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از این میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی و ترکیبات مقاوم به تجزیه موثر باشند و همچنین خصوصیات کیفی و کمی کمپوست را نیز بهبود بخشند (وارگاس-گراسیا، ۲۰۱۰).

با توجه به مسائل مطرح شده اگر از سویه‌های ترموفیلیک که توان بالایی در تجزیه ترکیبات مقاوم آلی و بهبود کیفیت کمپوست نهایی دارند، استفاده شود ضمن تسریع در روند کمپوست‌شدن، موجب بهبود کیفیت فرآورده نهایی نیز خواهند شد. در این زمینه تحقیقات زیادی در کشورهای دیگر انجام شده و تعداد محدودی از این میکروارگانیسم‌ها را معرفی نموده اند که اکثراً به صورت ثبت اختراع بوده و برای خرید آن‌ها باید مبالغ هنگفتی پرداخت شود. از طرفی نیز با توجه به متفاوت بودن شرایط آب و هوایی ایران با کشورهای دیگر و همچنین افزایش روز افزون پسماندهای شهری، لزوم تحقیقاتی جامع و کامل برای یافتن میکروارگانیسم‌های بومی که توانایی تجزیه مواد سخت تجزیه شونده (لیگنین) را داشته باشند و بکارگیری از آن‌ها در تسریع روند تجزیه پسماندهای شهری، بیش از پیش احساس می‌شود. با توجه به موارد مطرح شده، این تحقیق به منظور بررسی تاثیر گونه‌های مختلف

* ایمیل نویسنده مسئول: Hemati.arash@yahoo.com

باکتریایی در تجزیه مواد لیگنینی در درصدهای مختلف لیگنین انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار تنفس میکروبی به عنوان معیار اصلی فعالیت زیستی اندازه گیری گردید.

مواد و روش‌ها

سه جدایه ترموفیل P. validus 1VC، P. koreensis 12C و B. nealsonii 104C، که در روند قبلی تحقیقات به عنوان باکتری‌های برتر تجزیه کننده لیگنینوسلولاز شناسایی و خالص سازی شده بودند (همتی، ۱۳۹۷)، ابتدا از طریق کشت بر روی پلیت خالص‌سازی شدند. تک کلنی حاصله برای تکثیر وارد محیط کشت نوترینت براث (NB) گردید. جمعیت زادمایه کشت تازه هر جدایه باکتری در محیط کشت NB در حدود cfu.ml-1 ۴×۱۰۹ تنظیم شد (بوزاتو و همکاران، ۲۰۱۲).

برای تولید کمپوست از ضایعات بخش کشاورزی استفاده شد. برای این منظور دو بستر به شرح زیر انتخاب گردید:

بستر اول مربوط به ضایعات بخش کشاورزی با درصد لیگنین کم (در حدود ۲۰-۱۵ درصد) بود. برای این منظور از چند ماده آلی با درصدهای مختلف استفاده شد (جدول ۱).

بستر دوم مربوط به ضایعات چوب با درصد لیگنین زیاد (درحدود ۳۰- ۲۵ درصد) بود. برای این منظور از کارگاه‌های تولید چوب، ضایعات جمع‌آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب مواد استفاده شده در ایجاد تل‌های کمپوست

	برگ سیب	بقایای تر گوجه فرنگی	بقایای تر سیب زمینی	خاک اره
لیگنین کم	۳۲	۳۳	۳۲	۳
لیگنین زیاد	۵	۵	۵	۸۵

کلیه مواد مورد استفاده برای کمپوست‌شدن، در ابعاد زیر دو سانتی‌متر پودر شد. مقدار کربن و نیتروژن از تجزیه CHNSO با دستگاه آنالایزر تعیین و از حدود ۴۰ کیلوگرم اوره برای تنظیم C/N در حدود ۲۵ در تیمارهای لیگنین زیاد استفاده گردید. با استفاده از موادی که قبلا ذکر شد اقدام به تل زنی شد. تل‌ها با ۳ متر طول ۱/۵ متر عرض و ۱ متر ارتفاع با وزن تقریبی ۲۲۵۰ کیلوگرم ایجاد شدند.

هر ۵ لیتر زادمایه تهیه شده، به یک درصد از بسترهای مورد استفاده (خشک) اضافه گردید و بعد از سه روز به تل‌های مورد آزمایش اضافه و مخلوط گردید. رطوبت در طول کمپوست‌شدن در ۵۰ تا ۵۵ درصد وزنی به صورت دستی نگه‌داری شد. هوادهی نیز هر هفته یکبار با هم‌زدن انجام پذیرفت.

این تحقیق با طرح آشیانه‌ای فاکتوریل در جایگاه کمپوست شهرستان مراغه به مدت ۶ ماه اجرا شد. برای این منظور فاکتور اول شامل دو بستر آلی (بستر با درصد لیگنین زیاد و بستر با درصد لیگنین کم) و فاکتور دوم شامل جدایه‌های باکتری (سه جدایه تنها P. validus 1VC، P. koreensis 12C و B. nealsonii 104C، مخلوط سه جدایه و شاهد بدون تلقیح) بود. تیمارها با یک تکرار مجموعاً با ۱۰ تیمار انجام پذیرفت.

نتایج حاصله به کمک نرم افزار SAS تجزیه و جداول تجزیه واریانس مربوطه تهیه گردید. هم چنین مقایسه میانگین داده‌ها، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار MSTAT-C انجام شد. نمودارها به کمک نرم افزار Excel ترسیم شد.

تنفس میکروبی به روش تیتراسیون در یک ماه اول به صورت هفتگی و تا پایان کمپوست‌شدن (حدودا ۶ ماه) به صورت ماهیانه براساس زمان‌بندی فوق‌الذکر اندازه‌گیری شد (علی‌اصغرزاد، ۱۳۸۵).

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس نشان داد تاثیر نوع باکتری در سطح پنج درصد، میزان لیگنین، زمان، تاثیر متقابل باکتری*زمان، باکتری*لیگنین، باکتری*لیگنین*زمان در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). از لحاظ آماری هفته چهارم بیشترین و زمان شروع کمترین مقدار تنفس را داشت (شکل ۱). تیمارهای لیگنین بالا تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند (شکل ۲). در بین گونه‌های باکتری به جز تیمار

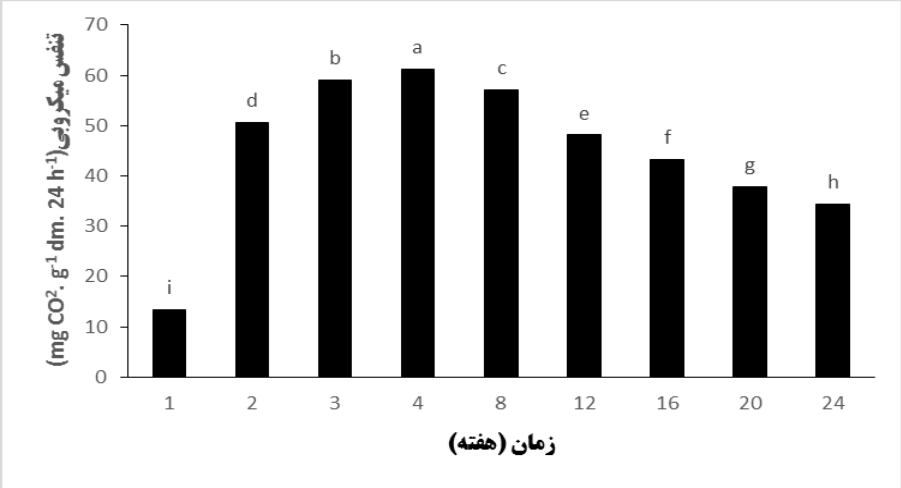
شاهد بدون باکتری لیگنین پایین بقیه تیمارها باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین تنفس در هفته‌های اول مربوط به تیمارهای شاهد بدون باکتری بود ولی با گذشت زمان تیمارهای شاهد بیشترین کاهش تنفس را داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین، در چهار هفته بیشترین تنفس در تیمارهای لیگنین پایین مشاهده شد ولی بعد از چهار هفته اول و تقریبا تا پایان دوره کمپوست‌شدن، تیمارهای لیگنین بالا تنفس بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین داشتند. در بین گونه‌های باکتریایی استفاده شده، در بستر لیگنین پایین گونه 104C و کنسرسیوم بیشترین و تیمار شاهد کمترین تنفس و در بین تیمارهای لیگنین بالا گونه‌های 1VC و کنسرسیوم باکتریایی بیشترین و شاهد کمترین تنفس را در اوج دوره تنفس داشتند (شکل ۴). بعد از هفته چهار در همه تیمارها کاهش معنی‌داری در مقدار تنفس مشاهده شد. افزایش محیط کشت (NB) به تیمارهای شاهد می‌تواند عامل اصلی افزایش جمعیت میکروبی در این تیمارها باشد. گرچه محیط کشت به همه تیمارها اضافه شده بود ولی با توجه به استفاده محیط کشت توسط باکتری‌ها در تیمارهای باکتریایی و عدم مصرف در تیمار شاهد (عناصر غذایی در محیط کشت به صورت محلول و در دسترس میکروارگانیسم‌ها قرار داشت) موجب افزایش تنفس در این تیمارها شده است. در چهار هفته نخست همانطور که الگوی دمایی نیز تایید می کند افزایش فعالیت میکروبی موجب افزایش دما شده و با افزایش دما تا مرحله ترموفیلی اکثر میکروارگانیسم‌های مزوفیل از بین رفته و موجب افت شدید تنفس بعد از هفته چهار شده است. تیمارهایی که در آن‌ها میکروارگانیسم ترموفیل به تل‌ها اضافه شده بودند نسبت به شاهد دارای تنفس بیشتری بعد از هفته چهار بود که نشان از توانایی تحمل این میکروارگانیسم‌ها و از بین نرفتن آن‌ها در این دما می‌باشد. با توجه به اینکه در تیمارهای لیگنین بالا از هفته چهار به بعد هنوز ماده آلی زیادی نسبت به تیمارهای لیگنین پایین وجود داشت، احتمالاً غذای کافی در این تیمارها وجود داشته که هنوز فعالیت میکروب‌ها کاهش نیافته است.

تیمارهای باکتریایی با داشتن حداکثر تنفس، نشان دادند که توانایی بیشتری در رشد و تکثیر و همچنین استفاده از منبع کربنی در بسترهای آلی را دارا هستند. تنفس به تعادل بین سرعت ورود کربن از طریق مواد آلی و سرعت خروج آن توسط تجزیه‌کنندگان موجود بستگی دارد (ادل، ۲۰۰۳). مطابق گزارشات قبلی، احتمالاً دلیل عدم افزایش جمعیت میکروبی با شیب قبلی بعد از هفته چهار، محدودیت در کربن آلی بستر، همچنین کمبود مواد غذایی می‌باشد، بعلاوه گزارش شده که بعد از این مرحله بدلیل کمبود منابع تغذیه، جمعیت باکتریایی کاهش و یا وارد دوره استراحت (کمون) می‌شوند (تیواری و همکاران، ۱۹۹۳ و کوشیک و همکاران، ۲۰۰۸).

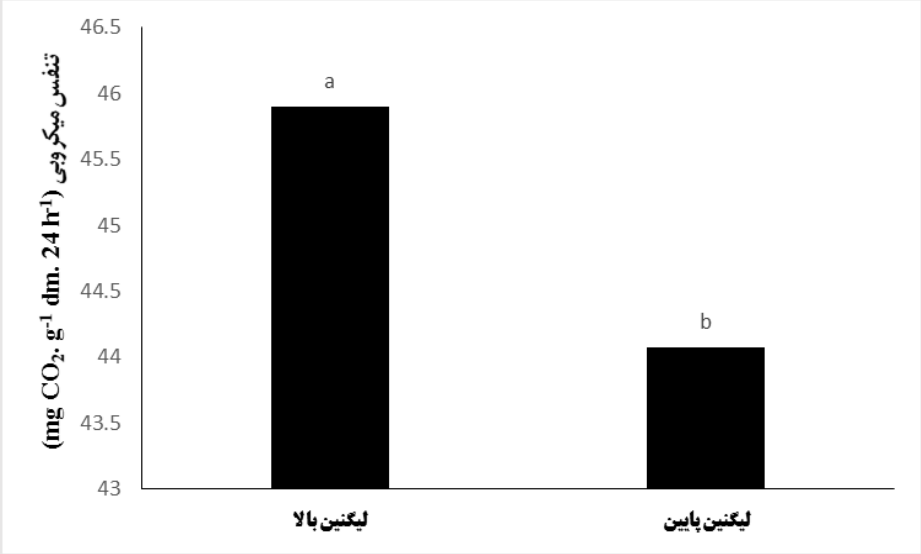
جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر تنفس میکروبی و کربن آلی

منبع تغییر	df	میانگین مربعات
		تنفس
باکتری	۴	۱۷/۳۴*
لیگنین	۱	۲۰۹/۶۸**
زمان	۸	۶۸۱۷/۰۵**
باکتری*زمان	۳۲	۵۲/۵۰**
باکتری*لیگنین	۴	۶/۷۶ns
باکتری*لیگنین*زمان	۴۰	۳۹/۵۹**
تکرار	۲	۱۴۵/۰۰**
خطا	۱۷۶	۶/۳۰
CV.	-	۵/۵۸

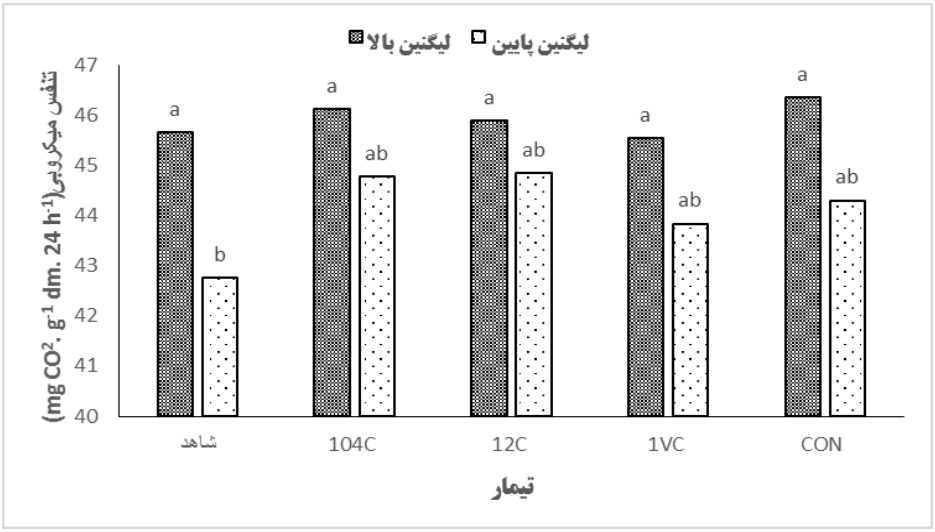
**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد *معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ns غیر معنی‌دار



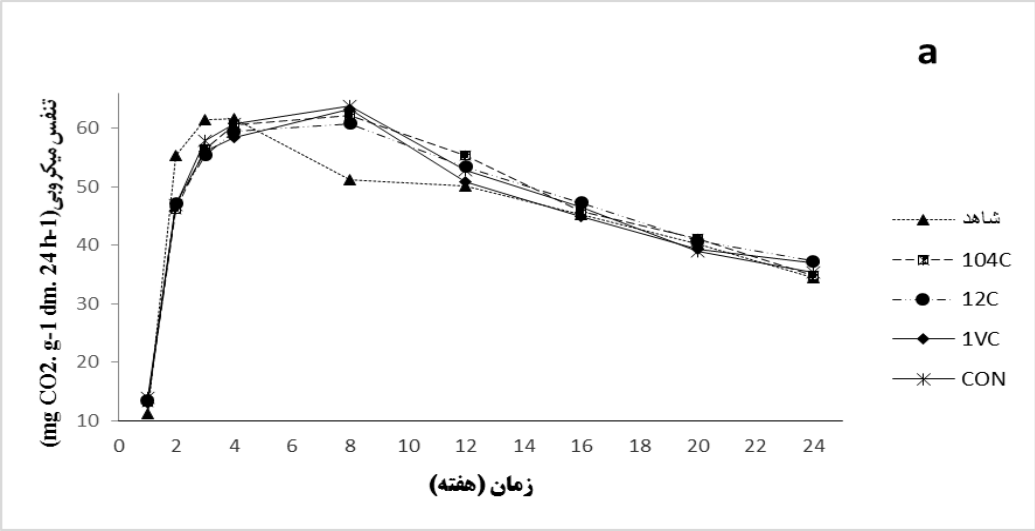
شکل۱- تاثیر زمان بر تنفس میکروبی در کمپوست

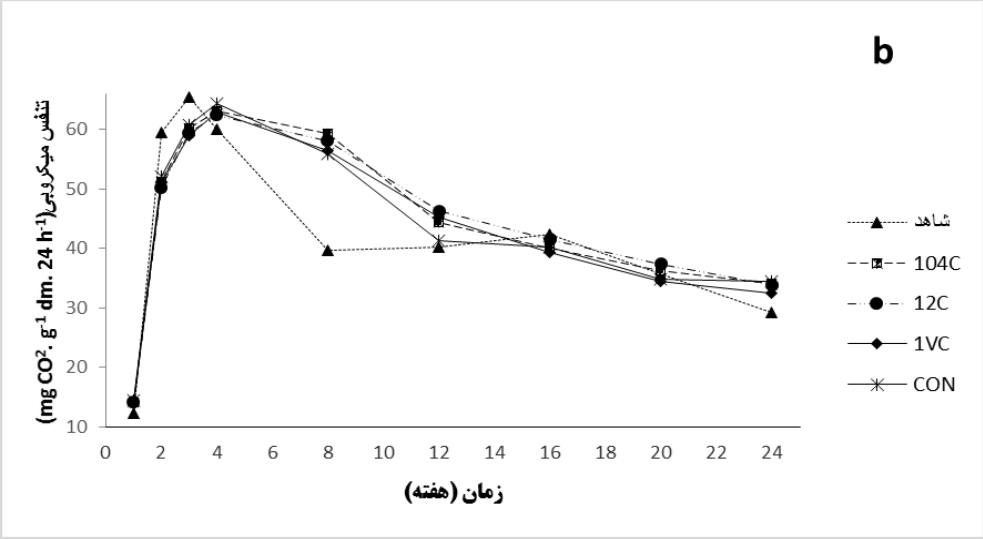


شکل۲- تاثیر میزان لیگنین اولیه بر تنفس میکروبی در کمپوست



شکل۳- تاثیر میزان لیگنین مواد اولیه و گونه باکتری بر تنفس میکروبی در کمپوست (شاهد بدون باکتری، جدایه 1VC: *Paenibacillus validus*، 12C: *Paenibacillus koreensis* و 104C: *Bacillus nealsonii*، CON: کنسرسیوم سه گونه باکتری)





شکل ۴- تغییرات تنفس میکروبی در طول کمپوست‌شدن در گونه‌های باکتریی مختلف (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

نتیجه‌گیری

با شروع فرآینده کمپوست شدن، تا هفته ۴ افزایش تنفس میکروبی مشاهده شد ولی بعد از هفته ۴ تنفس میکروبی کاهش یافت. در تیمارهای لیگنین پایین تنفس میکروبی بعد از هفته ۸ به شدت کاهش یافت درحالیکه در تیمارهای لیگنین بالا این کاهش بعد از هفته ۱۲ رخ داد. در کل تنفس میکروبی در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود که می‌تواند به دلیل تاخیر در تجزیه مواد لیگنینی و وجود مواد غذایی قابل تجزیه در این تیمارها باشد. تاثیر تیمارهای باکتریایی با توجه به نوع بستر لیگنینی متفاوت بود و در بستر لیگنین بالا 1VC و در بستر لیگنین پایین 104C بهتر از سایر گونه‌های باکتریایی عمل کردند. در هر نوع بستر لیگنینی تیمار کنسرسیوم باکتریایی موفق عمل نمود. در هر دو بستر تیمارهای باکتریایی در دوره ترموفیلی تنفس بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که نشان دهنده کارایی تیمارهای ترموفیلی باکتریایی در زنده مانی میکروبی بود.

منابع

علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روشهای آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. ترجمه. ۵۲۲ صفحه.

همتی، آ. ۱۳۹۷. جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست تجزیه‌کننده لیگنین برای تسریع تولید و بهبود کیفیت کمپوست. رساله دکتری تخصصی. مهندسی علوم خاک - بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک. دانشگاه تبریز.

Adl, S.M. 2003.The Ecology of Soil Decomposition. CAB International, Wallingford, UK.

Busato, J.G., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P. and Olivares, F.L. 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresour Technol. 110: 390–395.

Kaushik, P., Yadav, Y.K., Dilbaghi, N. and Garg, V.K. 2008. Enrichment of vermicomposts prepared from cow dung spiked solid textile mill sludge using nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. Environmentalist. 28:283–287.

Kluczek-Turpeinen, B., Tuomela, M., Hatakka, A. and Hofrichter, M. 2003. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete Paecilomyces inflatus. Appl Microbiol Biotechnol. 61:374–379

Tiwari, S.C. and Mishra, R.R. 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm cast and in uningested soil. Biol Fertil Soils. 16: 131–134.

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. and Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Manag. 30: 771-778.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Effect of lignin and thermophilic bacterial species on microbial respiration during composting

Arash. Hemati *[1], Nasser Aliasgharzad [2], Reza Khakvar [3]

[1] Ph.D. of Tabriz University Soil Biology Biotechnology

[2] Professor of Department of Soil Sciences, University of Tabriz

[3] Assistant Professor of Department of Plant Pathology, University of Tabriz

Abstract

The typical process of composting requires a lot of time to decompose. This time can be faster by inoculating microorganisms that can decompose hard materials. One of these methods is the use of microbes that can break down lignin and cellulose. This research was carried out to evaluate the effect of different bacterial species (three isolates of 1VC (*P. validus*), 12C (*P. koreensis*) and 104C (*B. nealsonii*)) on Lignin decomposition in different percentages of lignin. For this purpose, microbial respiration rate was measured as the main criterion for biological activity. The results showed that the highest respiration in the first weeks was related to the control without bacteria, but with time, the control treatments had the most decreased respiration. Among the high and low lignin treatments, the highest respiration was observed in low lignin treatments on the four weeks, but after the first four weeks and almost to the end of the composting period, high lignin treatments had higher respiration compared to low lignin treatments. Among the bacterial species, the low lignin bed was 104C and the consortium had the highest and control treatment had the least respiration. Among the high lignin treatments, 1VC species and bacterial consortium were highest, and control treatment had the lowest respiration at peak respiration. In both lignin beds, bacterial treatments had a higher respiration rate in the thermophilic period than control treatment, indicating the effectiveness of bacterial thermophilic treatments in microbial survival.

Keywords: Compost, thermophile, respiration, bacteria, lignin.

* Corresponding author, Email: Hemati.arash@yahoo.com