نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد 23 شماره 3/ سال 1392

غنی سازی ورمی کمپوست با برخی باکتری های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن

آرش همتی[1]، حسینعلی علیخانی[2*]، احمدعلی پوربابایی[2] و غلام باقری مرندی[2]

تاریخ دریافت: 91/3/3 تاریخ پذیرش: پذیرش 91/12/6

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

2- به ترتیب دانشیار و استادیاران گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

* مسئول مکاتبه Email: Halikhan@ut.ac.ir

چکیده

تغییر جمعیت میکروارگانیسم ها در ورمی کمپوست در جهت بهبود کیفیت آن یکی از موضوعات مطالعات جدید در زمینه تولید کودهای زیستی می باشد. تحقیق حاضر نیز با هدف امکان تغییر در مقادیر نیتروژن و فسفر در ورمی کمپوست و تعیین برخی از ویژگی های کیفی ورمی کمپوست انجام گرفته است. به منظور انجام این هدف پس از تولید ورمی کمپوست، زادمایه هایی از باکتری های جنس *سودوموناس* و *ازتوباکتر* تهیه شد و بعد از تلقیح باکتری ها به بستر ورمی کمپوست به مدت 60 روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری و در روزهای 0 ،20، 40 و 60 فاکتورهای بیولوژیکی و شیمیایی ورمی کمپوست اندازه گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش طول زمان انکوباسیون جمعیت باکتری ها، مقادیر نیتروژن، فسفر قابل جذب، اسید هیومیک و خاکستر افزایش و مقدار کربن آلی، EC و pH کاهش یافت. طی انکوباسیون تیمارهای *ازتوباکتر* و *سودوموناس* به ترتیب افزایش حدود 80 و 20 درصدی نیتروژن و 25 و 40درصدی فسفر قابل جذب را داشتند. طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق انکوباسیون به مدت 45 الی 60 روز می تواند نتایج بسیار مثبتی بر روی خصوصیات شیمیایی و بیولوژیکی ورمی کمپوست داشته باشد ولی سودمندی ناشی از انکوباسیون در مدت کمتر از 40 روز و بیشتر از 60 روز قابل ملاحظه نیست. باکتری های مورد استفاده در این تحقیق دارای تاثیرات مفید و متفاوتی بودند و بسته به نیاز می توان از این باکتری ها برای غنی سازی ورمی کمپوست بهره گرفت.

واژه های کلیدی: اسید هیومیک، ازتوباکتر کروکوکوم، سودوموناس فلورسنس، ورمی کمپوست

Enriching Vermicompost by Nitrogen Fixing and Phosphate Solubilizing Bacteria

A Hemati[1], HA Alikhani[2*], AA Pourbabaee[2] and G Bagheri Marandi[2]

Received: 2012/5/23 Accepted: 2013/2/24
[1]MSc. Student, Dept of Soil Science Engineering , Campus of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Tehran University, Iran
[2]Assoc Prof and Assists Proudest of Soil Sciences Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Tehran University, Iran
*Corresponding author: E-mail: Halikhan@ut.ac.ir

Abstract

Changes in populations of microorganisms in the vermicompost in order to improving its quality has been the novel study topics in the field of organic fertilizer production. Present study was performed with aimed to possibility of changing in the content of nitrogen and phosphorus in the vermicompost and to determine some quality characteristics in vermicompost. In order to accomplish this goal, after the production of vermicompost, inoculums from *Pseudomonas* and *Azotobacter* bacteria genera were prepared, then bacteria inoculated to vermicompost beds, for 60 days at a temperature of 28 ° C storage, and biological and chemical factors were measured on days 0, 20, 40 and 60 in vermicompost. Results showed that with increasing incubation time, the population of bacteria, nitrogen, available phosphorus, ash and humic acid increased, and the amount of organic carbon, EC and pH decreased. During incubation, *Azotobacter* and *Pseudomonas* treatments increased N content about 80 and 20 percent and P content about 25 and 40 percent, respectively. According to results of this study, 45 to 60 day incubation period could have very good results on the chemical and biological properties in vermicompost, but this effect is not significant in less than 40 days and more than 60 days. Bacteria which used in the present study had beneficial and different effects and depending the requirement could be used for vermicompost enrichment.

Keywords: Azotobacter chroococcum, humic acid, Pseudomonas fluorescens, Vermicompost

مقدمه

چرخه ی بقایای مواد آلی برای پایداری کشاورزی و همچنین کاهش آلاینده ها در محیط زیست ضروری می باشد. فرایند تولید ورمی کمپوست مجموعه واکنش-های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می باشد که تغییراتی را توسط کرم های خاکی در مواد آلی ایجاد می کند (آرانکون و همکاران 2004). ورمی کمپوست شدن، فرایند غیر گرماگرای بوده که تغذیه و جذب

عناصر غذایی از بقایای آلی را برای گیاه تسهیل کرده و وضعیت خاک را از نظر فیزیکی و بیوشیمیایی بهبود می بخشد. در طی این فرایند، با حضور کرم های خاکی، مواد آلی با افزایش تجزیه به ترکیبات پایدار (هوموس) تبدیل می شوند و محصول نهایی (ورمی کمپوست) سرشار از هوموس و فسفر قابل جذب می شود. گونه‌ی *Eisenia fetida* از مهم و فراوان ترین گونه های کرم های خاکی سطحی‌زی می باشد که در تولید ورمی کمپوست استفاده می شود (راینکه و همکاران 1992 الویرا و همکاران 1996و 1998).

کرم های خاکی در معدنی کردن و قابل جذب ساختن آلی و افزایش تنوع و فعالیت میکروارگانیسم ها توانا می باشند (له بایون و بینت 2006 و فراکچیا و همکاران 2006).

کیفیت ورمی کمپوست به چندین فاکتور بستگی دارد که به طور مختصر می توان به: نوع بستر اولیه (بقایای آلی)، تهویه، رطوبت، pH، دما و گونه ی کرم های خاکی اشاره کرد. بنابراین به منظور شناخت دینامیک فرایند تشکیل ورمی کمپوست، شرایط ویژه مثل ترکیب و فراوانی میکروارگانیسم ها، کربن آلی، نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم کل، اسید هیومیک و فعالیت آنزیمی ارزیابی می گردد (پرامانیک و همکاران 2007). اسید هیومیک بخش خاص و با ثباتی از مواد هوموسی است که دارای تعامل با طیف گسترده ای از مواد از جمله فلزات و آلاینده‌های آلی موجود در آب و خاک می باشد (یتس و همکاران 1997). مقدار اسید هیومیک استخراج شده به شیوه عصاره گیری، زمان استخراج، شرایط استخراج و نوع منبع استخراج بستگی دارد (استیونسون 1994). ورمی کمپوست یک حامل موثر و کارا، همچنین تقویت کننده موثر برای رشد باکتری ها می باشد و با اثر هم افزایی نقش باکتری های دی ازوتروف و میکوریزا، باعث افزایش رشد گیاهان می شود (گوتیرز-میسلی و همکاران 2008).

در برخی از تحقیقات اخیرا تغییر جمعیت میکروارگانیسم ها در ورمی کمپوست و بهبود کیفیت کودهای آلی مطالعه شده است (پادماواسیما و همکاران 2008). کمپوست کردن بقایای آلی همراه با کانی فسفات ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) و جامعه ی میکروبی موجب حل فسفات های نامحلول و در نتیجه باعث افزایش فسفر قابل جذب برای گیاهان می شود. برخی از باکتری های تثبیت کننده نیتروژن در کنار تثبیت نیتروژن، با تولید اسید های آلی فسفر را نیز حل می کنند (کومار و نارولا 1999). تعدادی از باکتری های دی ازوتروف مثل جنس های سودوموناس، بورخولدریا ، آگروباکتریوم، ازتوباکتر و اروینیا (*Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Agrobacterium* spp., *Azotobacter* spp. and *Erwinia* spp.) قادر به افزایش فسفات قابل جذب و تثبیت زیستی نیتروژن هستند. افزایش دسترسی زیستی فسفر توسط این میکروارگانیسم ها با تولید اسیدهای آلی صورت می گیرد که فسفر معدنی را قابل جذب می سازد (اسچروینو و همکاران 2010). از طرف دیگر معدنی کردن فرم آلی فسفر توسط آنزیم های فسفاتاز صورت می گیرد که با تبدیل فرم آلی و غیر قابل جذب فسفر به یون های قابل جذب فسفات توسط میکروارگانیسم های حل کننده فسفات انجام می گیرد (عیوضی و طباطبایی 1977).

ورمی کمپوست تلقیح شده با تیوباسیلوس تاثیرات مثبتی بر تبدیل فسفات معدنی به فسفر قابل جذب دارد و سویه های بورخولدریا و هرباسپیریلوم باعث افزایش فسفات قابل جذب می شوند (بوزاتو و همکاران 2012 و محمدی آریا و همکاران 2010). در تعدادی از آزمایش-ها با استفاده از میکروارگانیسم های آزاد زی تثبیت کننده نیتروژن، مقدار نیتروژن در ورمی کمپوست افزایش یافت و تلقیح میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات در ورمی کمپوست با حضور کانی حاوی فسفات و حتی بدون وجود آن، باعث افزایش فسفر در

ورمی کمپوست شد. این در حالی بود که کاربرد مستقیم کانی فسفات در افزایش فسفر قابل جذب ورمی کمپوست و به ویژه در خاک های طبیعی به دلیل حلالیت و قابلیت جذب بسیار اندک کانی فسفات چندان موثر نبود (پریمونو و همکاران 1996، کومار و سینگ 2001 و کوشیک و گارگ 2004).

بژامپ و همکاران (2006) گزارش کردند جمعیت باکتری های توانا در تثبیت نیتروژن مولکولی استفاده شده برای فراوری بقایای آلی در ورمی کمپوست، حتی پس از افزودن کرم های خاکی نیز کاهش نمی یابد (هندریکسون 1990) و بر عکس جمعیت میکروبی در محصول نهایی افزایش می یابد. لذا می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها در غنی‌سازی ورمی کمپوست استفاده کرد (فیشر و همکاران 1997).

تحقیق حاضر برای تعیین چگونگی اثر تلقیح باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و حل کننده فسفات بر غنی سازی ورمی کمپوست انجام شد و هدف از این تحقیق امکان تغییر در مقادیر نیتروژن و فسفر قابل جذب در ورمی کمپوست و بهبود برخی از ویژگی‌های کیفی ورمی کمپوست بود.

مواد و روش

تولید ورمی کمپوست: ورمی کمپوست از ماده اولیه کود گاوی و بقایای گیاهی با نسبت 3:1 (وزنی/ وزنی) در حضور کرم کمپوست ساز *Eisenia fetida* به مدت پنج ماه در ایستگاه آموزشی-پژوهشی ورمی کمپوست پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تولید شد. برای این منظور ابتدا کود گاوی و بقایای گیاهی در زیر نور آفتاب به مدت یک ماه خوابانیده و سپس تل هایی به شکل گنبدی به عرض 70، طول 200 و ارتفاع 50 سانتی متر ایجاد گردید. بعد از آبیاری فراوان و خروج شیرابه کود (به منظور توزیع یکنواخت رطوبت و مرطوب شدن تمامی قسمت های بستر و همچنین شستشوی عناصر محلول و کاهش شوری)، کرم های *Eisenia fetida* به بستر افزوده شدند (500 کرم خاکی برای 100 کیلوگرم بستر استفاده شد. کرم‌های *Eisenia fetida* از ایستگاه آموزشی-پژوهشی ورمی کمپوست پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد). رطوبت تل ها با آب پاشی در طول دوره در حدود 50-60 درصد وزنی نگهداری شد. در پایان دوره فرآوری، کرم های خاکی از بستر محصول نهایی (ورمی کمپوست) جداسازی و خصوصیات ورمی کمپوست حاصله اندازه گیری شد (جدول 1) (گوپتا 2008).

تلقیح ورمی کمپوست با باکتری

در این تحقیق تمامی جدایه‌های باکتری استفاده شده، متعلق به بانک ژن میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران بود که در ضمن اجرای طرح‌های تحقیقاتی سال‌های قبل جداسازی، شناسایی و نگهداری شده بودند. از بین 30 جدایه از جنس سودوموناس موجود، سویه Ps 59 با توجه به تحقیقات قبلی و همچنین آزمون حل کنندگی فسفات و اینکه بیشترین قدرت حل کنندگی فسفات را داشت انتخاب و از بین 21 جدایه از جنس ازتوباکتر موجود، سویه Az 21 نیز از نظر توان تثبیت نیتروژن مولکولی طی تحقیقات قبلی (BNF) انتخاب شد. باکتری ازتوباکتر متعلق به گونه‌ی ازتوباکتر کورکوروم (*Azotobacter chroococcum*) و باکتری سودوموناس متعلق به گونه سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas florescence*) بودند. بعد از تجدید کشت، جمعیت زادمایه کشت تازه هر جدایه باکتری بر اساس فاکتور رقت در حدود 4×10^{9} $cfu.ml^{-1}$ تنظیم گردید و سپس هر کیلوگرم ورمی کمپوست با 25 میلی لیتر از هر زادمایه تلقیح شد. برای این تحقیق چهار تیمار به شرح زیر و در سه تکرار اجرا شد:

1- ورمی کمپوست بدون تلقیح

2- ورمی کمپوست + ازتوباکتر کروکوکوم (Az 21)

3- ورمی کمپوست + سودوموناس فلورسنس (Ps 59)

4- ورمی کمپوست + ازتوباکتر کورکوروم (Az 21) + سودوموناس فلورسنس (Ps 59)

برای هر تکرار از تیمارهای آزمایشی یک کیلوگرم از ورمی کمپوست تلقیح شد و همه تیمارها تا 60 درصد ظرفیت نگهداری با آب مقطر مرطوب شدند. در نهایت نمونه ها به مدت 60 روز در انکوباتور در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند و در روزهای صفر، 20، 40 و 60 ، تیمارهای ورمی کمپوست غنی شده مورد تجزیه های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک قرار گرفتند.

شمارش باکتریایی

برای شمارش جمعیت باکتریایی از دو روش MPN (Most Probable Number) و CFU (Colony Forming Unit) استفاده شد (پیج 1982 و تروسلیر و همکاران 1998).

جدول 1- مشخصات ورمی کمپوست استفاده شده در آزمایش

pH	EC(dS m^{-1})	T N (%)	TOC (%)	P (%)	K (%)	S (%)	Na (%)	Fe (%)	Ca (%)	C/N
7/63	2/14	1/2	24/37	0/82	6/52	1/93	1/10	0/57	8/5	20/3

صفات اندازه گیری شده

در نمونه‌ها، نیتروژن کل با روش کجلدال (1982)، فسفر قابل جذب طبق روش اولسن (1982)، و فسفر محلول در آب طبق روش مورفی و ریلی(1962)، سولفور محلول با روش باردسلی و لندکستر(1960)، پتاسیم و سدیم محلول با روش فلیم فتومتر (1978)، کربن آلی با روش واکلی- بلک(1934) و خاکستر (با قرار دادن یک گرم از هر نمونه در کوره با دمای 480 درجه ساتی گراد به مدت 8 ساعت)، pH و EC (سوسپانسیون 1:5 آب مقطر: ورمی کمپوست تهیه و به مدت نیم ساعت شیک گردید و pH و EC از محلول رویی اندازه گیری شد) با استفاده از دستگاه pH متر و EC متر اندازه گیری شد (پیج 1982).

اندازه گیری اسید هیومیک

اسید هیومیک در تیمار های آزمایشی با روش کی و همکاران (2004) استخراج شد. برای این منظور نمونه ها با نسبت 1:10 (مایع/ جامد) با سود نیم مولار مخلوط و به مدت 24 ساعت (زمان استخراج) در اتاق تاریک با شدت 160 دور در دقیقه مخلوط شدند. فاز محلول از فاز رسوب با سانتریوفیوژ(سرعت 6000 rpm) جداسازی و با HCl شش مولار به pH کمتر از دو رسانده شد تا اسید هیومیک رسوب کرده و از اسید فولویک جداسازی شود. اسید هیومیک جداسازی شده با HCl/HF (0/3/ 0/1 مولار) خالص سازی و تا مثبت شدن تست AgCl با آب مقطر شسته شد و در نهایت در دمای زیر 50 درجه سانتی گراد خشک گردید.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

این تحقیق به صورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در گروه مهندسی علوم خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا گردید. نتایج به دست آمده از تجزیه ورمی کمپوست غنی شده با نرم افزار SAS مورد تجزیه قرار گرفت و مقایسه میانگین

داده ها با استفاده از تست توکی در سطح پنج درصد انجام شد (آنووا، تست توکی با درصد احتمال 0/05).

نتایج و بحث

جدول 2 تغییرات جمعیت باکتری ها در تیمارهای آزمایشی به هر دو روش CFU و MPN را نشان می دهد. نتایج به دست آمده نشان داد در تیمارهای تلقیح شده با باکتری ها، با افزایش زمان سپری شده پس از تلقیح ، افزایش معنی داری در جمعیت باکتری ها(به روش CFU) حاصل شد و تیماری که بدون تلقیح باکتری بود جمعیت کمتری از باکتری ها را در هر مرحله از شمارش داشت. بیشترین جمعیت باکتری (به روش CFU) در روزهای 40 و 60 بعد از تلقیح مشاهده شد و مطابق گزارشات قبلی، احتمالا دلیل عدم افزایش جمعیت باکتری ها با شیب قبلی، محدودیت در کربن آلی بستر، همچنین کمبود مواد غذایی می باشد، بعلاوه گزارش شده که بعد از این مرحله بدلیل کمبود منابع تغذیه، جمعیت باکتریایی کاهش و یا وارد دوره استراحت (کمون) می شوند (پارله 1963، تیواری و همکاران 1993 و کوشیک و همکاران 2008).

در نتایج بدست آمده به روش MPN نسبت به روش CFU جمعیت باکتری در تیمارها بیشتر بود علت این امر این است که در این روش کلیه میکروارگانیسم های زنده و مرده شمارش می شود. در تیمارهای باکتریایی با افزایش زمان انکوباسیون تعداد باکتری ها افزایش معنی داری داشت و بیشترین جمعیت در روز 60 مشاهده شد که با افزایش زمان از 40 روز به 60 روز شیب افزایش جمعیت باکتری بسیار کاهش یافت که می-تواند بدلیل کاهش در منابع تغذیه باشد (جدول 2).

با توجه به نتایج شمارش جمعیت باکتری می توان چنین نتیجه گرفت که کلیه تیمارهای باکتریایی انتخاب شده در این تحقیق توانایی زیادی در رشد و تکثیر در ورمی کمپوست تا مدت زمان 60 روز داشتند.

طبق نتایج بدست آمده محتویات نیتروژن در همه تیمارها با افزایش زمان انکوباسیون زیاد شد و تیمار ازتوباکتر بیشترین مقدار نیتروژن را با افزایش حدود 80 درصد نیتروژن داشت. درصد نیتروژن در تیمارها تا روز 40 با شیب بیشتری زیاد شد ولی تا روز 60 سرعت افزایش کاهش یافت. افزایش 20 درصدی نیتروژن در تیمار سودوموناس نشان دهنده ی قابلیت تثبیت نیتروژن در این باکتری ها بود(جدول 3) (کومار و همکاران 2001 و بوزاتو 2012).

جدول 2-مقایسه میانگین جمعیت باکتریایی حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن در هر گرم از ورمی کمپوست در روز های بعد از تلقیح

زمان انکوباسیون (روز)	تیمار 1(بدون تلقیح)		تیمار 2(*Az 21*)		تیمار 3(*Ps* 59)		تیمار4(*Az 21 +Ps* 59)	
	CFU ($\times 10^{7}$)	MPN ($\times 10^{5}$)	CFU ($\times 10^{7}$)	MPN ($\times 10^{5}$)	CFU ($\times 10^{7}$)	MPN ($\times 10^{5}$)	CFU ($\times 10^{7}$)	MPN ($\times 10^{5}$)
0	12/33^{c}	1/33^{c}	12/33^{d}	0/90^{c}	7/33^{c}	1/75^{c}	10/33^{c}	0/80^{c}
20	23/66^{b}	2/80^{b}	29/33^{c}	1/60^{b}	21/33^{b}	2/95^{b}	24/66^{b}	1/45^{b}
40	27/33^{a}	2/84^{b}	48/33^{b}	2/65^{a}	35/33^{a}	3/65^{a}	42/33^{a}	2/35^{a}
60	24/33^{b}	3/12^{a}	50/33^{a}	2/60^{a}	36/33^{a}	3/75^{a}	43/33^{a}	2/45^{a}
C.V.	3/48	2/79	1/65	4/50	2/30	1/65	1/91	4/70
SEM±	0/44	0/041	0/33	0/050	0/33	0/029	0/33	0/048

* داده های هر ستون با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی دار نمی باشند.

جدول3- مقایسه میانگین مقادیر نیتروژن و فسفر در تیمارهای ورمی کمپوست در روز های بعد از تلقیح (گرم برکیلوگرم).

زمان انکوباسیون (روز)	تیمار 1(بدون تلقیح)		تیمار 2(*Az 21*)		تیمار 3(*Ps* 59)		تیمار4(*Az 21* +*Ps* 59)	
	N	P	N	P	N	P	N	P
0	12/00[a]	8/20[ab]	12/00[d]	8/20[d]	12/00[d]	8/20[d]	12/00[d]	8/20[d]
20	12/22[a]	8/23[a]	15/13[c]	9/52[c]	12/81[c]	8/83[c]	13/63[c]	8/65[c]
40	12/23[a]	8/14[b]	20/74[b]	9/72[b]	13/82[b]	11/12[b]	16/23[b]	10/43[b]
60	12/40[a]	8/12[b]	21/76[a]	10/22[a]	14/54[a]	11/63[a]	16/85[a]	10/71[a]
C.V.	2/58	0/38	0/63	0/70	0/44	0/53	0/17	0/40
SEM±	0/18	0/018	0/063	0/038	0/036	0/030	0/015	0/022

* داده های هر ستون با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی دار نمی باشند.

جدول 4- مقایسه میانگین مقادیر گوگرد، سدیم و پتاسیم قابل جذب در تیمارهای ورمی کمپوست در روز های بعد از تلقیح (گرم بر کیلوگرم).

زمان انکوباسیون	تیمار 1(بدون تلقیح)			تیمار 2(*Az 21*)			تیمار 3(*Ps* 59)			تیمار4(*Az 21* +*Ps* 59)		
	S	Na	K	S	Na	K	S	Na	K	S	Na	K
0	19/35[a]	11/02[a]	65/20[a]	19/35[b]	11/02[a]	65/20[a]	19/35[a]	11/02[a]	65/20[a]	19/35[b]	11/02[a]	65/20[a]
60	19/40[a]	10/95[a]	65/30[a]	20/68[a]	10/90[a]	64/40[b]	19/45[a]	10/70[b]	64/30[b]	20/19[a]	10/88[a]	64/01[b]
C.V.	0/82	0/51	0/15	0/76	0/55	0/13	0/73	0/49	0/12	0/72	0/65	0/14
SEM±	0/091	0/032	0/058	0/088	0/035	0/048	0/082	0/031	0/044	0/082	0/041	0/054

* داده های هر ستون با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی دار نمی باشند.

نتایج نشان داد مقدار فسفر قابل جذب نیز با افزایش زمان انکوباسیون در تیمارهای آزمایش افزایش یافت. بیشترین مقدار فسفر در تیمار سودوموناس با 40 درصد افزایش نسبت به مقدار اولیه مشاهده شد و تیمار ازتوباکتر نیز 25 درصد افزایش نشان داد که از توانایی متوسطی برای حل کنندگی فسفر برخوردار بود. مقدار فسفر نیز همانند نیتروژن در 40 روز ابتدایی با سرعت زیادتری افزایش یافت ولی بعد از آن شیب افزایش کاهش یافت.

تیمار 4 (ازتوباکتر + سودوموناس) مقدار تثبیت نیتروژن و حل کنندگی فسفر تقریبا مشابه با تیمارهای 2 و 3 بود که نشان از عدم وجود حالت هم افزایی (تشدیدی) بین تیمارها است. تیمار 1 کمترین مقدار نیتروژن و فسفر را داشت که تاثیر مثبت باکتری های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن را نشان داد (جدول 3).

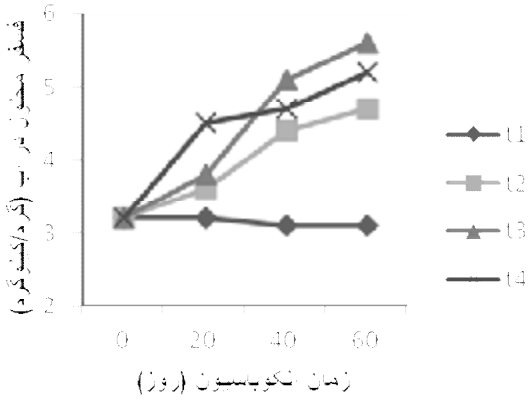
فروسارد و همکاران (1996) گزارش کردند فسفر محلول در آب برای گیاهان براحتی قابل جذب می شود. طبق شکل 1 در تیمارها با افزایش زمان انکوباسیون مقدار این شاخص (فسفر محلول) افزایش یافت که تیمار سودوموناس بیشترین افزایش فسفر محلول در آب را دارد و این نشان دهنده توانایی زیاد این باکتری در قابل جذب ساختن انواع فرم های فسفر در ورمی کمپوست می باشد. تیمار ازتوباکتر نیز با افزایش این شاخص نشان داد توانایی حل کنندگی فسفات را دارد (کوشیک و همکاران 2008، کومار و همکاران 2001 و بوزاتو و

همکاران 2012). تیمار 4 مقدار حالت بینابینی از این شاخص، نسبت به تیمار 2و 3 داشت که می تواند ناشی از وجود رابطه خنثی بین این باکتری ها باشد. همچنین کمترین مقدار فسفر محلول در آب نیز برای تیمار 1 مشاهده شد. نتایج بدست آمده نشان دهنده کارایی باکتری های استفاده شده در این تحقیق بود. طبق شکل 1 تا روز 40 شیب افزایش فسفر محلول در آب افزایش و بعد از آن مقدار فسفر با شیب کمتری افزایش یافت.

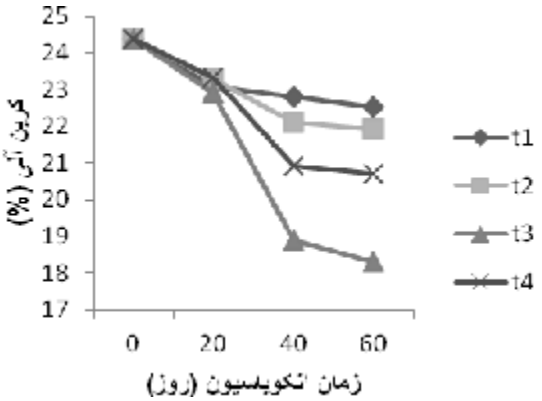
مقدار کل کربن آلی طی فرایند انکوباسیون در 40 روز اول با سرعت بیشتری، و بعد از آن با سرعت کمتری کاهش یافت (بوزاتو و همکاران 2012) تیمار 3 بیشترین کاهش در کربن آلی را داشت که نشان دهنده هوموسی شدن و پایدار شدن مواد آلی در ورمی کمپوست با افزایش زمان کمپوست شدن می باشد (شکل 2) (ویکن و همکاران 2000). در اندازه گیری خاکستر نیز مشخص شد با افزایش زمان انکوباسیون مقدار خاکستر افزایش می یابد که این افزایش می تواند به دلیل کاهش ماده آلی باشد. طبق شکل 3 تیمار 3 دارای مقدار خاکستر بیشتری بود که به علت کاهش زیاد ماده آلی در این تیمار می باشد.

در جدول 4 نتایج اندازه گیری عناصر دیگر نشان داده شده است. مقدار گوگرد در طی 60 روز تغییر زیادی نداشت و به نسبت کمی در همه تیمارها افزایش نشان داد. تیمار 2 دارای مقدار بیشتری از گوگرد بود که احتمالا به علت توانایی نسبی این باکتری در قابل جذب ساختن گوگرد است. پتاسیم و سدیم قابل جذب تغییر زیادی در طول انکوباسیون نداشتند ولی بطور کلی هر دو عنصر با افزایش زمان انکوباسیون مقدارشان کاهش یافت که به احتمال زیاد با افزایش مواد هیومیکی این عناصر به صورت کمپلکس درآمده-اند .

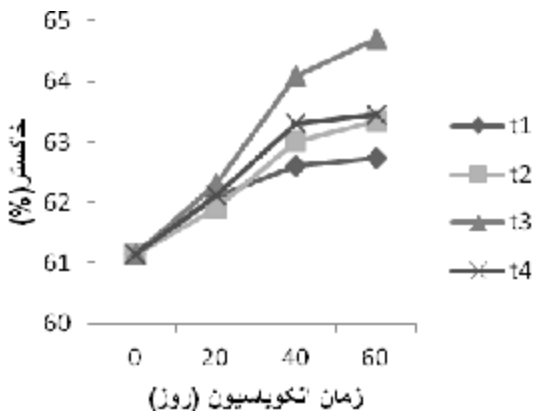
pH در طی دوره، با کاهش محسوسی همراه بود، تیمار 3 بیشترین کاهش را داشت، این کاهش pH را می توان به تولید اسید های آلی و افزایش اسید هیومیک نسبت داد (بوزاتو و همکاران 2012) که باعث افزایش حل کنندگی فسفر نیز می شود. در واقع باکتری های سودوموناس با تولید اسید های آلی و افزایش اسید هیومیک، قابلیت دسترسی فسفر را افزایش می دهد. در 40 روز ابتدایی pH با شیب بیشتری کاهش یافت و بعد از آن سرعت کاهش کم شد. تیمار 2 تغییرات کمتری در pH نسبت به تیمار 3 داشت که می تواند به علت نوع نیتروژن تثبیت شده و تولید کمتر اسیدهای آلی باشد. تیمار 1 کمترین تغییر را در pH داشت (شکل 4). در طی انکوباسیون EC کاهش یافت که این کاهش برای تیمار 3 بیشتر از بقیه تیمارها (2 و4) بود. با توجه به افزایش مواد هیومیکی، به احتمال زیاد عناصر محلول در ورمی کمپوست با این مواد کمپلکس پایدار تشکیل داده اند و موجب کاهش EC شده است (شکل 5).



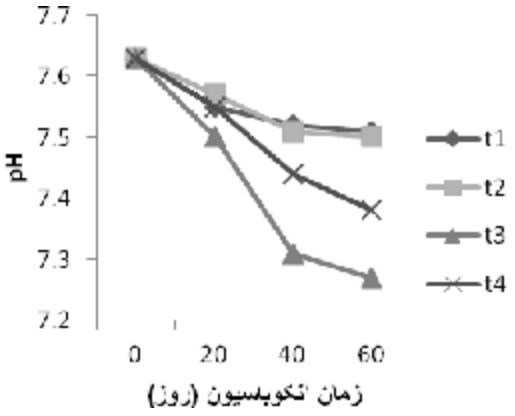
شکل 1- تغییرات فسفر محلول در آب در طول انکوباسیون



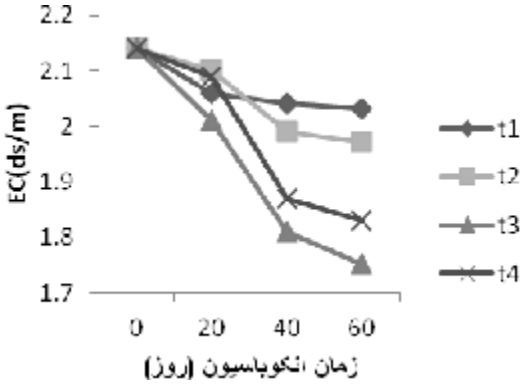
شکل 2- تغییرات کربن آلی در طول انکوباسیون



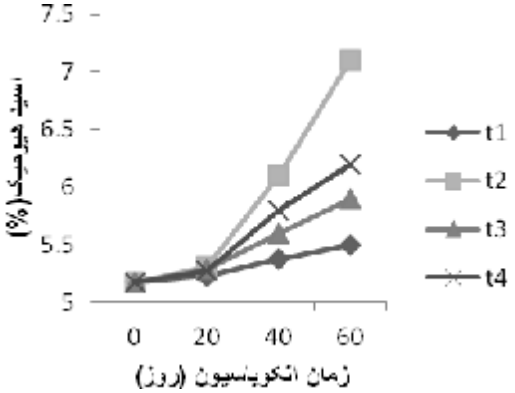
شکل 3 - تغییرات خاکستر در طول انکوباسیون



شکل 4- تغییرات **pH** در طول انکوباسیون



شکل 5- تغییرات **EC** در طول انکوباسیون



شکل 6- تغییرات اسید هیومیک در طول انکوباسیون

در این تحقیق با افزایش زمان انکوباسیون مقدار اسید هیومیک در همه تیمارها افزایش یافت. تیمار 2 بیشترین مقدار استخراج را داشت و تیمار 3 به نسبت کمتری دارای اسید هیومیک بود. تیمار 3 در طی انکوباسیون بخش زیادتری از ماده آلی خود را از دست داد. طبق گزارش ویکن و همکاران (2000) احتمالا این مواد به مواد پایدارتر تبدیل شده اند، و لذا انتظار می رفت این تیمار اسید هیومیک بیشتری داشته باشد ولی برخلاف این پیش بینی، مقدار کمتری اسید هیومیک در این تیمار مشاهده شد. با توجه به یکسان بودن شرایط و نوع استخراج کننده، به احتمال زیاد pH پایین در تیمار 3 باعث کاهش قدرت استخراج کننده (سود) شده و مقدار کمتری اسید هیومیک در این تیمار استخراج شد. از طرف دیگر تیمار 2 با داشتن pH بالاتر نسبت به تیمار 3 با افزایش قدرت استخراج کننده اسید هیومیک بیشتری استخراج کرد. با وجود کاهش بیشتر pH در تیمارهای 2، 3 و 4 نسبت به تیمار 1، باز در تیمارهای باکتریایی اسید هیومیک بیشتری استخراج شد که نشان دهنده کارایی باکتری های مورد استفاده در پایدار سازی مواد آلی در ورمی کمپوست بود(شکل 6).

در نتایج بدست آمده مربوط به اسید هیومیک بر خلاف شاخص های اندازه گرفته شده قبلی که بیشترین شیب افزایش اکثرا بین 20-40 روز بود، بیشترین شیب افزایش اسید هیومیک در روزهای 40-60 بدست آمد و می توان چنین استنباط کرد که اسید هیومیک محصول نهایی و پایدار ماده آلی می باشد لذا از آخرین فراورده-

های میکروارگانیسم ها می باشد که با افزایش زمان فراوری مقدار بیشتری از آن تولید می شود (ویکن و همکاران 2000).

نتیجه گیری کلی

باکتری های ازتوباکتر کورکوروم(Az 21) و سودوموناس فلورسنس(Ps 59) با افزایش تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات های نامحلول (افزایش فسفر قابل جذب)، موجب غنی سازی ورمی کمپوست شدند. با افزایش زمان انکوباسیون علاوه بر افزایش در جمعیت باکتری ها، فسفر قابل جذب و نیتروژن کل نیز با سرعت بیشتری افزایش یافت. اسید هیومیک در تیمارهای باکتریایی در طول انکوباسیون به مقدار معنی داری افزایش نشان داد که با کاهش ماده آلی و افزایش خاکستر در همین دوره موجب افزایش پایداری و ثبات بیشتر مواد آلی در ورمی کمپوست گردید. این تحقیق نشان داد که می توان از باکتری های حل کننده فسفر و تثبیت کننده نیتروژن با توجه به نوع هدف به صورت جداگانه و یا مخلوطی از هر دو باکتری برای غنی سازی ورمی کمپوست استفاده کرد. با اعمال این تیمارها به جز عناصر نیتروژن و فسفر سایر عناصر تغییرات زیادی نشان ندادند. طول انکوباسیون یکی از معیار های مهم در غنی سازی می باشد و طبق نتایج بست آمده از این تحقیق و گزارشات دیگران، نشان داد 45 الی 60 روز می تواند نتایج بسیار خوبی بر روی خصوصیات شیمیایی و بیولوژیکی ورمی کمپوست داشته باشد و انکوباسیون به مدت کمتر از 40 روز و بیشتر از 60 روز اثرات مفید زیادی ندارد.

منابع مورد استفاده

Arancon NQ, Edwards CA, Atiyeh RM and Metzger JD, 2004. Effects of vermicomposts produced from food waste on greenhouse peppers. Bioresour. Technol. 93, 139–144.

Beauchamp CJ, Levesque G, Prevost D and Chalifour FP, 2006. Isolation of free-living dinitrogen-fixing bacteria and their activity in compost containing de-inking paper sludge. Biores. Technol. 97, 1002– 1011.

Busato JG, Lima LS, Aguiar NO, Canellas LP and Olivares FL, 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresource Technology. Accepted.

Eivazi F and Tabatabai MA, 1977. Phosphatases in soils. Soil Biol. Biochem. 9, 167–172.

Elvira C, Goicoechea M, Sampedro L, Mato S and Nogales R, 1996. Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge earthworms. Biores. Technol. 57, 173–177.

Elvira C, Sampedro L, Benitez, E and Nogales R, 1998. Vermicomposting of sludges from paper-mill and dairy industries with Eisenia andrei: a pilot-scale study. Biores. Technol. 63, 205–211.

Fischer K, Hahn D, Honerlage W and Zeyer J, 1997. Efect of passage through the gut of earthworm Lumbricus terrestris L. on Bacollus megaterium studied by whole cell hybridisation. Soil Biol. Biochem. 29, 1149–1152.

Fracchia L, Dohrmann AB, Martinotti MG and Tebbe CC, 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivationindependent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 942–952.

Frossard E, Sinaj S and Dufour P, 1996. Phosphorus in sewage sludges as assessed by isotopic exchange. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 179–182.

Gupta pk, 2008. Vermicomposting for sustainable agriculture. Agrobios (India) Publishers, Jodhpur, 224pp.

Gutiérrez-Miceli FA, Moguel-Zamudio B, Abud-Archila M, Gutiérrez-Oliva VF and Dendooven L, 2008. Sheep manure vermicompost supplemented with a native diazotrophic bacteria and mycorrhizas for maize cultivation. Bioresour. Technol. 99, 7020–7026.

Hendrikson NB, 1990. Leaf litter selection by detritivore and geophagous earthworms. Biol. Fertil. Soils 10, 17–21.

Kaushik P and Garg VK, 2004. Dynamics of biological and chemical paramerers durimg vermicomposting of solid textiler mill sludges mixed with cow dung and agricultural residues. Biores. Technol. 4, 203–209.

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

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.

Kumar V and Singh KP, 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. Bioresource Technology 76, 173-175.

Le Bayon RC and Binet F, 2006. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. Soil Biol. Biochem. 38, 235–246.

Mohammady Aria M, Lakzian A, Haghnia GH, Berenji AR, Besharati H and Fotovat A, 2010. Effect of Thiobacillus, sulfur, and vermicompost on the water-soluble phosphorus of hard rock phosphate. Bioresour. Technol. 101, 551–554.

Padmavathiamma PK, Li LY and Kumari UR, 2008. An experimental study of vermibiowaste composting for agricultural soil improvement. Bioresour. Technol. 99, 1672–1681.

Page AL, 1982. Methods of Soil Analysis. Agronomi 9, ASA, SSSA, Madison, Wiscosin, USA.

Parle JN, 1963. A microbiological study of earthworm cast. Journal of General Microbiology, 31, 13–22.

Pramanik P, Ghosh GK, Ghosal PK and Banik P, 2007. Changes in organic – C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. Bioresource Technology 98, 2485–2494.

Premono EM, Moawad MA and Vlek PLG, 1996. E.ect of phosphate-solubilizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian Journal of Crop Science 11, 13-23.

Qi BC, Aldrich C and Lorenzen L, 2004. Effect of ultrasonication on the humic acids extracted from lignocellulose substrate decomposed by anaerobic digestion. Chemical Engineering Journal 98, 153–163.

Reinecke AJ, Viljioen SA and Saayman RJ, 1992. The suitability of Eudrilus eugeniae, Perionyx excavatus and Eisenia fetida (Oligochaete) for vermicomposting in southern Africa in terms of their temperature requirements. Soil Biol. Biochem. 24, 1295–1307.

Scervino JM, Mesa MP, Mónica 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.

Stevenson FJ, 1994. Humic Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd ed. Wiley, New York.

Tiwari SC, and Mishra RR, 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm cast and in uningested soil. Biology and Fertility of Soils, 16, 131–134.

Troussellier M, Bonnefont JL, Courties C, Derrien A, Dupray E, Gauthier M, Gourmelon M, Joux F, Lebaron P, Martin Y and Pommepuy M, 1998. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. Oceanologica Acta. Vol. 21 - N” 6.

Veeken A, Nierop K, Wilde Vd, Hamelers B, 2000. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. Bioresource Technology 72, 33-41.

Yates L M, Engebreston RR and Haakenson TJ, 1997. R. Von wandruszka, Anal. Chim. Acta 356, 295–301.