نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد 24 شماره 1/ بهار 1393

# تاثیر غنی سازی ورمی کمپوست با تیمارهای کودی و باکتریایی بر هوموسی شدن و خصوصیات اسید هیومیک

**حسینعلی علیخانی[1*] و آرش همتی[2]**

تاریخ دریافت: 91/09/19 تاریخ پذیرش: 92/05/23

1- دانشیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

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

*. مسئول مکاتبه: E-mail: Halikhan@ut.ac.ir

**چکیده**

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غنی‌سازی ورمی‌کمپوست با تیمارهای باکتریایی (باکتری‌های *سودوموناس* و *ازتوباکتر*) و کودی (نیتروژن، فسفر و گوگرد) بر شاخص‌های هوموسی شدن و آنالیز فیزیکوشیمیایی اسید هیومیک استخراج شده در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام شد. تیمارها به مدت 60 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری و در نهایت اندازه‌گیری مواد هیومیک، و آنالیز عنصری، گروه های عاملی و اندازه‌گیری های اسپکتروسکوپی اسید هیومیک انجام شد. نتایج نشان داد شاخص‌های هوموسی شدن در طی غنی‌سازی در همه تیمارها افزایش یافت. تیمار ورمی کمپوست غنی شده با نیتروژن+ گوگرد+ فسفر (VC+NSP) بیشترین و تیمار ورمی کمپوست بدون غنی سازی (VCC) کمترین مقدار این شاخص‌ها را داشتند. آنالیز عنصری اسید هیومیک نیز نشان داد نوع غنی-سازی تاثیر زیادی در ترکیب عنصری اسید هیومیک دارد و عناصر اضافه شده در روند غنی‌سازی می تواند در ترکیب عنصری اسید هیومیک حضور داشته باشد. غنی‌سازی ورمی کمپوست باعث افزایش معنی داری در مقدار گروه‌های عاملی اسید هیومیک حاصله شد. همچنین طبق طیف های مادون قرمز اندازه‌گیری شده، اکثر گروه‌های عاملی در تمام تیمارها مشترک بودند. نسبت های اسپکتروفوتومتری نیز نشان داد بیشترین مقدار این نسبت‌ها به‌ترتیب در تیمارهای ورمی‌کمپوست غنی شده با نیتروژن (VC+N) و VC+NSP مشاهده شد و کمترین مقدار این نسبت ها در تیمار ورمی-کمپوست غنی شده با *سودموموناس* (VC+Ps) بود. در نهایت با توجه به تاثیر پایداری ماده آلی در خاک، انتظار می رود تیمارهای باکتریایی و همچنین تیمار VC+NSP توانایی و کارایی بیشتری در بهبود خواص فیزیکوشیمیایی خاک داشته باشند.

**واژه های کلیدی**: آنالیز عنصری، ازتوباکتر کروکوکوم، سودوموناس فلورسنس، گروه های عاملی، FTIR

# Effect of Vermicompost Enrichment with Chemical Fertilizer and Bacterial Treatments on Humification and Acid Humic Properties

**HA Alikhani[1*] and A Hemati[2]**

Received: December 9, 2012 Accepted: August 14, 2013
[1]Assoc Prof, Department of Soil Sciences Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Tehran University, Iran.
[2]MSc. Student, Department of Soil Science Engineering , Campus of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Tehran University, Iran.
*Corresponding author: E-mail: Halikhan@ut.ac.ir

## Abstract

Present study, aimed to evaluate the effects of vermicompost enrichment with bacterial (*Pseudomonas* and *Azotobacter*) and fertilizer (nitrogen, phosphorus and sulfur) treatments on humification indices and physico-chemical analyze of extracted humic acid, was conducted based on completely randomized design. Treatments were kept on incubator at 28°C for 60-days and finally analyzed for humic acid, elemental analysis, determination of functional groups and spectroscopic measuring of humic acid. Results showed that humification indices increased in all treatments during enrichment. VC+NSP and VCC treatments had the greatest and lowest indices, respectively. Elemental analysis of humic acid indicated that enrichment type has great effect on elemental composition of humic acid and added elements significantly increased humic acid functional groups. Also, according to measured infra-red spectrum, most of functional groups at all treatments were the same. Spectrophotometric ratios showed that highest amount of $E_3/E_5$ and $E_4/E_6$ ratios observed in VC+N and VC+NSP, respectively and the lowest ones was related to VC+Ps. Having regard to effect of organic matter stability in soil, it is expected that bacterial treatments and also VC+NSP would have more ability and efficiency in improving soil physico-chemical properties of soils.

**Keywords:** *Azotobacter chroococcum*, Elemental analysis, functional groups, FTIR, *Pseudomonas fluorescence*

**مقدمه**

مواد آلی خاک به عنوان یکی ازمهمترین عوامل موثر برحاصلخیزی خاک، تولید محصول، حفاظت از زمین در برابرآلودگی هوا، تخریب، فرسایش و بیابان زایی، به خصوص در مناطق خشک ونیمه خشک شناخته شده است (پیکولو 1996). استفاده از اصلاح کننده های آلی مانند کمپوست ها، ابزار موثری برای بهبود خاکدانه سازی، ساختمان خاک، افزایش جمعیت و

تنوع میکروبی، افزایش ظرفیت نگهداری آب خاک و افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی در خاک می باشد (آزرمی و همکاران 2008). ورمی کمپوست محصول نهایی فرآیند تجزیه مواد آلی در حضور کرم های خاکی کمپوست ساز می باشد و به دلیل کاهش سطح آلاینده ها و داشتن سطح بالای جمعیت میکروبی و عناصر غذایی، در حال حاضر به عنوان یکی از بهترین کودهای زیستی مطرح شده است (راویندران و همکاران 2008). در طی فرایند تولید ورمی کمپوست قسمت عمده ماده آلی به صورت دی اکسید کربن، آمونیاک و آب، معدنی می‌شود و بخش باقی‌مانده نیز به صورت مواد رسیده و پایدار تبدیل می شود که از لحاظ شیمیایی به مواد هیومیک خاک شباهت زیادی دارد (بنیتز و همکاران 1999). مواد هیومیک به طور مستقیم نقش مهمی در انتشار آهسته مواد مغذی و بهبود ظرفیت تبادل کاتیونی، pH، ظرفیت بافری و بسیاری از واکنش های دیگر در خاک دارند (سنسی و همکاران 1996).

هوموسی شدن مواد آلی طی فرایند تولید کمپوست به عنوان یک شاخص مناسب برای ارزیابی پایداری کمپوست در نظر گرفته شده است. هوموسی شدن مواد آلی در سطحی بالا باعث افزایش ارزش و کارایی محصول نهایی می گردد. مطالعه هوموسی شدن معمولا به منظور ارزیابی و شناخت تحولات مواد آلی انجام می شود. تغییرات هوموسی شدن و ثبات ماده آلی در خاک معمولا توسط نسبت هایی که شاخص‌های ثبات (به عنوان معیارهای کیفیت برای محصول نهایی) نامیده می شود ارزیابی می گردد. این شاخص ها از مقادیر اسید هیومیک، اسید فولویک، کربن آلی و غیره محاسبه می شوند (سانچز- موندرو و همکاران 2003، امیر و همکاران 2008، ویکن و همکاران 2000).

در طی تولید کمپوست تغییرات اندکی در ساختار و نوع گروه های عاملی اسید هیومیک ایجاد می شود و تغییراتی در گروه های آمیدی و کاهش این گروه‌ها با افزایش زمان کمپوست مشاهده شده است. همچنین طی تولید کمپوست ترکیبات آروماتیک به شدت افزایش می یابند، همچنین گروه های کربوکسیلی، ترکیبات آلیفاتیک و گروه های فنولیک نیز افزایش می یابد (میکی و همکاران 1997). امیر و همکاران (2010) گزارش دادند که گروه های عاملی اتری و پپتیدی در اسید هیومیک افزایش، و گروه های آمیدی و آلیفاتیک (که از ترکیبات زود تجزیه شونده می باشند) کاهش می یابد. طی تولید کمپوست ترکیب عنصری اسید هیومیک تغییر می یابد. آنالیز عنصری اسید هیومیک نشان داد در انتهای تولید کمپوست نسبت های H/C افزایش، O/C افزایش و C/N کاهش یافته است. از این رو، درک بهتر از روند هوموسی شدن در طول تولید کمپوست برای رسیدن به محصول نهایی با درجه بالایی از ثبات ماده آلی و افزایش ارزش کشاورزی، مفید خواهد بود (سانچز- موندرو و همکاران 2003).

اخیرا غنی سازی ورمی کمپوست با باکتری های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن انجام شده که موجب افزایش فسفر قابل جذب و همچنین افزایش نیتروژن کل در ورمی کمپوست گردیده است. افزایش جمعیت میکروبی، افزایش اسید هیومیک و کاهش pH، کاهش ماده آلی و کاهش C/N در ورمی کمپوست غنی شده با تیمارهای باکتریایی گزارش شده است (کوشیک و همکاران 2008، بوزاتو و همکاران 2012). غنی سازی کمپوست با سولفات آمونیم و اوره، بصورتی که نیتروژن در ابتدای تولید کمپوست به فرم های جامد یا محلول به بستر اضافه گردد، باعث افزایش نیتروژن کل و اثربخشی بیشتر شده است (ادامتی و همکاران 2009، احمد و همکاران 2008).

اسید هیومیک به عنوان جزء اصلی مواد هیومیک می باشد. غنی سازی ورمی کمپوست احتمالا موجب تغییراتی در شاخص های هوموسی شدن و خصوصیات اسید هیومیک خواهد شد. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غنی سازی ورمی کمپوست با تیمارهای باکتریایی و کودی بر شاخص های هوموسی

شدن و آنالیز فیزیکو شیمیایی اسید هیومیک (HA) استخراج شده، و شناخت تاثیرات غنی سازی در روند هوموسی شدن انجام شد.

## 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 (*گوپتا 2008*).

**انتخاب تیمارهای غنی سازی**

به منظور بررسی اثرات غنی سازی تیمارهای باکتریایی و شیمیایی بر شاخص های هوموسی شدن در ورمی کمپوست و آنالیز فیزیکو شیمیایی اسید هیومیک مستخرج از ورمی کمپوست، آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و به مدت 60 روز در گروه مهندسی علوم خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا گردید.

برای غنی سازی ورمی کمپوست با تیمارهای باکتریایی، از باکتری های حل کننده فسفات (*سودوموناس فلورسنس*) و تثبیت کننده نیترژن (*ازتوباکتر کروکوکوم*) استفاده شد. تمامی جدایه‌های استفاده شده متعلق به بانک ژن ریزسازواره‌های مفید خاکزی گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران بود که در ضمن اجرای طرح‌های تحقیقاتی سال‌های قبل جداسازی، شناسایی و نگهداری شده‌اند. بعد از تجدید کشت، جمعیت زادمایه کشت تازه هر جدایه باکتری بر اساس فاکتور رقت در حدود $4\times10^{9}$ cfu.ml$^{-1}$ تنظیم گردید و سپس هر کیلوگرم ورمی کمپوست با 25 میلی لیتر از هر زادمایه تلقیح شد (بوزاتو و همکاران 2012). همچنین برای این تحقیق سعی شد از عناصر شیمیایی و ضروری که بیشترین اهمیت و مصرف را در کشاورزی دارند (نیتروژن، فسفر و گوگرد) بعنوان تیمارهای کودی برای غنی سازی ورمی کمپوست استفاده گردد، برای این منظور هشت تیمار در سه تکرار بشرح زیر انتخاب شد:

VCC: تیمار ورمی کمپوست بدون غنی سازی

**تیمارهای باکتریایی غنی شده شامل:**

VC+Az: ورمی کمپوست + *ازتوباکتر کروکوکوم* (*Azotobacter chroococcum Az21*)

VC+Ps: ورمی کمپوست + *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluorescence Ps* 59)

VC+Az+Ps: ورمی کمپوست + *ازتوباکتر کورکوروم* (12/5 میلی لیتر) + *سودوموناس فلورسنس* (12/5 میلی لیتر)

**تیمارهای کودی شامل:**

VC+N: ورمی کمپوست + 1 درصد نیتروژن

VC+S: ورمی کمپوست + 1 درصد گوگرد عنصری

VC+P: ورمی کمپوست + 1 درصد فسفر

VC+NSP: ورمی کمپوست + 1 درصد نیتروژن + 1 درصد گوگرد عنصری + 1 درصد فسفر ($P_2O_5$) (نیتروژن با کود اوره، فسفر با سوپر فسفات تریپل، گوگرد با گوگرد عنصری تامین شد).

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 سانتیگراد نگهداری شدند و در نهایت تیمارهای ورمی کمپوست غنی شده از نظر گوگرد (سولفات محلول) با روش باردسلی و لندکستر (1960)، نیتروژن کل با روش کجلدال، فسفر قابل جذب با روش اولسن (1982)، جمعیت میکروبی با روش CFU و pH با دستگاه pH متر مورد تجزیه قرار گرفتند (پیج 1982) (جدول 1).

**جدول 1- مقادیر گوگرد، فسفر، نیتروژن، جمعیت میکروبی و pH در تیمارهای ورمی کمپوست غنی شده بعد از 60 روز انکوباسیون**

| تیمارها | گوگرد (%) | فسفر (%) | نیتروژن (%) | جمعیت میکروبی ($10^4$*) | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| VCC[1] | 1/9 | 0/8 | 1/2 | 2/4 | 7/5 |
| VC+Az[2] | ½ | 1/0 | 2/2 | 50/3 | 7/5 |
| VC+Ps[3] | 1/9 | 1/2 | 1/5 | 36/3 | 7/3 |
| VC+Az+Ps[4] | 2/0 | 1/1 | 1/7 | 43/3 | 7/4 |
| VC+N[5] | 1/9 | 0/8 | ½ | 12/3 | 8/5 |
| VC+S[6] | 2/6 | 0/9 | 1/1 | 29/3 | 6/9 |
| VC+P[7] | 1/9 | 1/2 | 1/2 | 26/0 | 7/4 |
| VC+NSP[8] | 2/6 | 1/1 | 2/6 | 35/3 | 7/7 |

[1] ورمی کمپوست بدون غنی سازی؛ [2] ورمی کمپوست + *ازتوباکتر*؛ [3] ورمی کمپوست+*سودوموناس*؛ [4] ورمی کمپوست+*ازتوباکتر*+*سودوموناس*؛ [5] ورمی کمپوست+ نیتروژن؛ [6] ورمی کمپوست+گوگرد؛ [7] ورمی کمپوست+فسفر؛ [8] ورمی کمپوست+نیتروژن+گوگرد+فسفر

**اندازه گیری اسید هیومیک، اسید فولویک و کربن آلی**

اسید هیومیک (HA) در تیمارهای آزمایشی با روش کی و همکاران (2004) استخراج شد. برای این منظور نمونه های ورمی کمپوست 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 شیک شدند. فاز محلول از فاز رسوب با سانتریفیوژ (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 با آب مقطر تا زمانی که pH به حدود 5-4 برسد، شسته شد و در نهایت در دمای زیر 50 درجه سانتی گراد خشک گردید. برای تعین مقدار اسید فولویک (FA) در تیمارها از روش قلیایی (کارتر و گرگوریچ 2006) استفاده شد. کربن آلی (TOC) نیز با روش واکلی- بلک (1934) اندازه گیری شد. نسبت هوموسی شدن (HR)، شاخص هوموسی شدن (HI) به صورت زیر محاسبه شد (امیر و همکاران 2008):

$HR = [(HA + FA)/TOC] \times 100.$

$HI = (HA/TOC) \times 100.$

Degree of polymerization = HA/FA

**آنالیز عنصری اسید هیومیک**

ترکیبات عنصری C, H, N و S در نمونه های اسید هیومیک با دستگاه آنالایزر مدل ElementarAnalysen System GmbH Vario EL اندازه گیری شد. محتوای O نیز از اختلاف درصد بقیه عناصر طبق فرمول زیر محاسبه شد (نمونه های خاکستر بدون آب): $O\% = 100 - (C+H+N+S)\%$. مقدار خاکستر نیز برای نمونه های جامد اسید هیومیک بر حسب درصد پس سوزاندن نمونه ها در دمای 480 درجه به مدت 8 ساعت محاسبه شد.

**اندازه گیری گروه های عاملی اسید هیومیک**

اسیدیته کل و گروه های کربوکسیلی طبق روش پیشنهادی پیج (1982) اندازه گیری شد و همچنین گروه های عاملی OH-فنلی نیز از تفاضل بین اسیدیته کل و گروه های کربوکسیلی محاسبه گردید (پیج 1982).

**اندازه گیری های اسپکتروسکوپی**

به منظور شناسایی گروه های عامل نمونه های اسید هیومیک استخراج شده، از روش طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. برای این منظور پس

از خالص سازی، طیف‌های اسید هیومیک توسط دستگاه اسپکترومتر FTIR بدست آمد.

برای اندازه گیری نسبت های اسپکتروفوتومتری نیز ابتدا 3 میلی گرم از هر نمونه اسید هیومیک استخراج شده در 10میلی لیتر بافر بی کربنات سدیم 0/05 مولار حل شد و سپس برای تعیین نسبت های $E_4/E_6$، $E_3/E_5$ (به ترتیب نسبت ترکیبات آلیفاتیک به آروماتیک و اندازه مولکولی در اسید هیومیک های مستتخرج از ورمی کمپوست) میزان جذب در طول موج های 350، 465، 550 و 665 نانومتر با استفاده از دستگاه JENWAY 6705 UV/VIS اندازه گیری شد (چن و همکاران 1977، آبت براون و فریمل 1999).

**تجزیه و تحلیل آماری نتایج**

نتایج بدست آمده از آنالیز ورمی کمپوست غنی شده با نرم افزار SAS مورد تجزیه قرار گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن چند دامنه‌ای در سطح پنج درصد انجام شد.

**نتایج و بحث**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تیمارهای غنی سازی بر روی کلیه شاخص های هوموسی شدن و خصوصیات اندازه گیری شده‌ی اسید هیومیک تاثیر معنی داری داشته است. به طوریکه میزان اسید هیومیک طی غنی سازی در تمام تیمارها افزایش، و اسید فولویک و کربن آلی در همه نمونه ها کاهش یافت (جدول 2). کاهش کربن آلی در طی فرایند غنی سازی ناشی از افزایش فعالیت باکتری ها و افزایش تنفس است که نشان دهنده هوموسی شدن و پایدار شدن مواد آلی در ورمی کمپوست با افزایش زمان غنی سازی می باشد (ویکن و همکاران 2000، بوزاتو و همکاران 2012). اسید فولویک دارای ترکیبات آمینه و قندی می باشد که نسبت به اسید هیومیک تجزیه پذیرتراست، در هفته های پایانی و کاهش مواد آلی قابل تجزیه، اسید فولویک می تواند منبع غنی و مناسب برای استفاده ریزسازواره ها باشد این عامل به احتمال زیاد دلیل کاهش اسید فولویک در هفته های پایانی بوده است (امیر و همکاران 2008). شاخص های HI، HR و HA/FA در طی غنی سازی در همه تیمارها افزایش یافت. تیمار VC+NSP بیشترین مقدار این شاخص ها و تیمار VCC کمترین مقدار این شاخص ها را داشتند. نسبت پلیمریزاسیون (HA/FA) بیانگر شکل گیری مولکولهای پیچیده تر (HA) از مولکولهای ساده تر (FA) می باشد (سانچز- موندرو و همکاران 1999، امیر و همکاران 2008). این نسبت به عنوان شاخص رسیدگی شناخته شده است. شاخص های دیگر نیز (HI و HR) بیان کننده نسبت رسیدگی ورمی کمپوست می باشد (سانچز- موندرو و همکاران 1999، امیر و همکاران 2008). با توجه به کاهش بیشتر ماده آلی و بیشتر بودن جمعیت میکروبی در تیمارهای باکتریایی، طبق نظر ویکن و همکاران (2000)، انتظار می رفت این تیمارها دارای اسید هیومیک و شاخص های هوموسی شدن بیشتری باشند ولی تیمارهای VC+NSP و VC+N دارای بیشترین مقدار شاخص های مذکور بودند. به احتمال زیاد وجود اوره در این دو تیمار دلیل اصلی این افزایش می باشد. وجود اوره در تیمار قدرت استخراج کننده را بشدت افزایش می دهد و بیش از 10 درصد، اسید هیومیک و اسید فولویک بیشتری استخراج می کند (سونگ و همکاران 2008).

**جدول 2- نتایج مقایسات میانگین تاثیر تیمارهای مختلف غنی سازی بر مقادیر کربن آلی کل (TOC)، اسید فولویک (FA)، اسید هیومیک (HA) و شاخص های هوموسی شدن (HA/FA، HR و HI)**

| تیمارها | TOC (%) | FA (%) | HA (%) | شاخص های هوموسی شدن | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | HI | HR | HA/FA |
| VCC[1] | 22/54[a] | 3/35[a] | 5/53[h] | 24/52[f] | 39/38[e] | 1/65[f] |
| VC+Az[2] | 21/94[c] | 2/65[cd] | 7/09[c] | 32/34[b] | 44/42[c] | 2/67[b] |
| VC+Ps[3] | 18/29[f] | 2/22[e] | 5/92[f] | 32/27[b] | 44/31[c] | 2/68[b] |
| VC+Az+Ps[4] | 20/72[e] | 2/43[de] | 6/24[e] | 29/92[c] | 41/65[d] | 2/55[c] |
| VC+N[5] | 22/23[b] | 3/51[a] | 7/30[b] | 32/84[b] | 48/65[b] | 2/08[e] |
| VC+S[6] | 22/00[c] | 2/80[bc] | 5/77[g] | 26/21[e] | 38/95[e] | 2/06[e] |
| VC+P[7] | 22/05[c] | 2/92[b] | 6/40[d] | 29/02[d] | 42/24[d] | 2/20[d] |
| VC+NSP[8] | 21/77[d] | 2/74[bc] | 8/41[a] | 39/50[a] | 51/23[a] | 3/07[a] |
| C.V.[9] | 0/19 | 2/90 | 0/69 | 0/84 | 0/49 | 1/14 |
| SEM±[10] | 0/023 | 0/047 | 0/026 | 0/151 | 0/125 | 0/016 |

[1] ورمی کمپوست بدون غنی سازی؛ [2] ورمی کمپوست + *ازتوباکتر*؛ [3] ورمی کمپوست+*سودوموناس*؛ [4] ورمی کمپوست+*ازتوباکتر*+*سودوموناس*؛ [5] ورمی کمپوست+ نیتروژن؛ [6] ورمی کمپوست+گوگرد؛ [7] ورمی کمپوست+فسفر؛ [8] ورمی کمپوست+نیتروژن+گوگرد+فسفر؛ [9] ضریب تغییرات؛ [10] خطای استاندارد میانگین

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

**آنالیز عنصری اسید هیومیک**

نتایج آنالیز عنصری اسید هیومیک به عنوان جز اصلی مواد هیومیک، نشان داد تیمارهای باکتریایی تغییرات زیادتری نسبت به بقیه تیمارها داشتتند. طبق جدول 3 کربن و هیدروژن در اسید هیومیک در همه تیمارها کاهش یافت. تیمار VC+Az بیشترین و تیمار VCC کمترین کاهش کربن و هیدروژن را دارا بود. نیتروژن و گوگرد در تیمارهای غنی شده مقادیر متفاوتی داشتند. تیمار VC+Az بیشترین مقدار نیتروژن و تیمار VC+S بیشترین مقدار گوگردی را در آنالیز اسید هیومیک این تیمارها داشتند. افزایش این عناصر در طی تولید ورمی کمپوست می تواند دلیل این افزایش باشد همچنین گزارش شده که با افزایش زمان تولید کمپوست ترکیباتی در مواد هیومیک ایجاد می شود که موجب افزایش نیتروژن در ساختار مواد هیومیک می شود (ادانی و همکاران 2006، امیر و همکاران 2010). طی فرایند ورمی کمپوست‌سازی میزان C/N مواد هیومیک کاهش یافت که این کاهش برای تیمار VC+Az بیشتر بود (امیر و همکاران 2010). درصد اکسیژن در انتهای غنی سازی در تیمارهای باکتریایی بیشترین مقدار را داشت. تیمارهای باکتریایی بیشترین مقدار نسبت O/C را داشتند که کاهش کربن و افزایش بیشتر اکسیژن در این تیمارها می تواند دلیل این افزایش باشد. افزیش محتوای اکسیژن و نسبت O/C می تواند به دلیل تجزیه فعال ترکیبات آلیفاتیک و ساختار پپتیدی باشد که با تشکیل سازه های اکسیده هیومیکی در فرایند غنی سازی باعث افزایش این نسبت گردد (امیر و همکاران 2008). H/C در طی غنی سازی کاهش یافت که بیانگر افزاش ترکیبات آروماتیک و کاهش ترکیبات آلیفاتیک می باشد (امیر و همکاران 2008، 2010).

**آنالیز گروه های عاملی اسید هیومیک**

در جدول 4 نتایج آنالیز گروه های عاملی در نمونه های اسید هیومیک استخراج شده آمده است. به طور کلی، غنی سازی ورمی کمپوست باعث افزایش معنی داری در مقدار گروه های عاملی اسید هیومیک حاصله شد. تیمارهای باکتریایی و تیمار VC+NSP

**جدول 3- مقایسات میانگین تاثیر تیمارهای مختلف غنی سازی بر آنالیز عنصری و نسبت های اتمی در نمونه های اسید هیومیک**

| Atomic ratios | | | C | H | N | S | O | تیمارها |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C/N | H/C | O/C | | | | | | |
| 11/73[a] | 1/41[cde] | 0/61[d] | 49/1[a] | 5/7[a] | 4/9[e] | 0/4[c] | 39/9[g] | VCC[1] |
| 7/65[g] | 1/47[ab] | 0/68[ab] | 45/1[f] | 5/5[bc] | 6/9[a] | 0/5[b] | 42/0[c] | VC+Az[2] |
| 10/70[c] | 1/48[a] | 0/69[a] | 45/7[e] | 5/6[ab] | 5/0[de] | 0/4[c] | 43/3[a] | VC+Ps[3] |
| 9/74[d] | 1/43[bc] | 0/69[a] | 45/7[e] | 5/4[c] | 5/5[c] | 0/4[c] | 43/0[b] | VC+Az+Ps[4] |
| 8/85[e] | 1/42[dc] | 0/61[d] | 48/2[b] | 5/7[a] | 6/4[b] | 0/4[c] | 39/2[g] | VC+N[5] |
| 11/21[b] | 1/38[def] | 0/66[bc] | 47/2[d] | 5/4[c] | 5/0[de] | 0/7[a] | 41/7[d] | VC+S[6] |
| 11/10[b] | 1/37[ef] | 0/64[c] | 47/9[c] | 5/4[c] | 5/1[d] | 0/4[c] | 41/1[f] | VC+P[7] |
| 7/91[f] | 1/36[f] | 0/68[ab] | 45/9[e] | 5/2[d] | 6/8[a] | 0/7[a] | 41/4[e] | VC+NSP[8] |
| 0/69 | 1/15 | 1/34 | 0/20 | 1/13 | 0/99 | 1/82 | 0/20 | C.V.[9] |
| 0/039 | 0/009 | 0/005 | 0/055 | 0/035 | 0/033 | 0/005 | 0/048 | SEM±[10] |

[1]ورمی کمپوست بدون غنی سازی؛ [2] ورمی کمپوست + *ازتوباکتر*؛ [3] ورمی کمپوست+*سودوموناس*؛ [4] ورمی کمپوست+*ازتوباکتر*+*سودوموناس*؛ [5] ورمی کمپوست+ نیتروژن؛ [6] ورمی کمپوست+گوگرد؛ [7] ورمی کمپوست+فسفر؛ [8] ورمی کمپوست+نیتروژن+گوگرد+فسفر؛ [9]ضریب تغییرات؛ [10] خطای استاندارد میانگین

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

**جدول 4- نتایج مقایسات میانگین تاثیر تیمارهای مختلف غنی سازی بر مقادیر گروه های عاملی ($mmol\ g^{-1}$) و شاخص های اسپکترومتری ($E_4/E_6$ و $E_3/E_5$) در اسید هیومیک**

| اسیدیته کل | گروه های کربوکسیلی | گروه های OH-فنلی | $E_3/E_5$ | $E_4/E_6$ | تیمارها |
|---|---|---|---|---|---|
| 5/67[f] | 3/41[d] | 2/25[f] | 4/77[c] | 5/28[c] | VCC[1] |
| 6/98[a] | 4/21[a] | 2/77[b] | 4/66[d] | 5/06[e] | VC+Az[2] |
| 6/86[b] | 4/12[b] | 2/74[bc] | 4/46[e] | 4/93[f] | VC+Ps[3] |
| 6/82[b] | 4/14[b] | 2/68[d] | 4/64[d] | 5/10[de] | VC+Az+Ps[4] |
| 6/32[d] | 3/22[e] | 3/09[a] | 5/14[a] | 5/56[b] | VC+N[5] |
| 6/51[c] | 3/92[c] | 2/59[e] | 4/72[cd] | 5/12[de] | VC+S[6] |
| 6/11[e] | 3/94[c] | 2/17[g] | 4/68[d] | 5/18[d] | VC+P[7] |
| 6/81[b] | 4/10[b] | 2/71[cd] | 4/89[b] | 5/67[a] | VC+NSP[8] |
| 0/59 | 0/56 | 0/70 | 0/63 | 0/60 | C.V.[9] |
| 0/023 | 0/013 | 0/010 | 0/017 | 0/018 | SEM±[10] |

[1]ورمی کمپوست بدون غنی سازی؛ [2] ورمی کمپوست + *ازتوباکتر*؛ [3] ورمی کمپوست+*سودوموناس*؛ [4] ورمی کمپوست+*ازتوباکتر*+*سودوموناس*؛ [5] ورمی کمپوست+ نیتروژن؛ [6] ورمی کمپوست+گوگرد؛ [7] ورمی کمپوست+فسفر؛ [8] ورمی کمپوست+نیتروژن+گوگرد+فسفر؛ [9]ضریب تغییرات؛ [10] خطای استاندارد میانگین

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

بیشترین افزایش و تیمار VCC کمترین افزایش گروه های عاملی را داشتند. بیشترین گروه کربوکسلی در تیمار VC+Az مشاهده شد و بیشترین گروه OH-فنلی را تیمار VC+N داشت. افزایش گروه های عاملی می تواند به دلیل اکسیداسیون گروه های متوکسیل و الکلی در گروه های جانبی لیگنین باشد. تخریب میکروبی کربوهیدرات به فنولیک، کینون‌ها، کتون ها و گروه های کربوکسیل نیز می تواند باعث افزایش قابل توجه میزان اسیدیته کل در اسید هیومیک شود (سانچز- موندرو و همکاران 2003، استونسون 1994، تان 2003). تیمارهای VC+N و VC+NSP که با اوره غنی شده بودند بیشترین مقدار از گروه های OH-فنلی را داشتند. استفاده از بستر اوره باعث افزایش بیش از حد اکسیداسیون ویژه گروه های فنولیک از بخش لیگنین ماده آلی شده و افزایش زیاد این نوع ازگروه های عاملی می تواند باعث محدودیت استفاده از اوره با غلظت های بالا باشد (سونگ و همکاران 2008، کلاپ و همکاران 2005).

**نتایج FTIR**

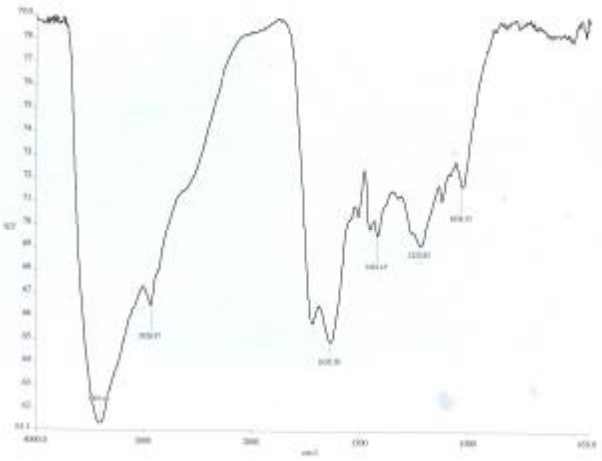
اسیدهای هیومیک استخراج شده از 8 تیمار مورد بررسی طیف مادون قرمز بسیار مشابهی را نشان دادند. در همه طیف ها جذب باندهای اصلی عبارت بودند از: باند گسترده و وسیع در حدود $cm^{-1}$ 3400 بیانگر باند H و گروه های OH، دو باند در منطقه $cm^{-1}$ 2850-3000 ناشی از کشش آلیفاتیک (C-H)، باند $cm^{-1}$ 1720-1740 گروه های C=C، باند قوی در $cm^{-1}$ 1650 ساختار C=C آروماتیک و باند هیدروژنه C=O، باند $cm^{-1}$ 1508 آمید دو بانده، پیک $1460cm^{-1}$ ترکیبات آلیفاتیک C-H، $cm^{-1}$ 1424 آمید سه بانده، $cm^{-1}$ 1225 C-O و O-H کربوکسیل، اتر و فنول، باند $cm^{-1}$ 1024 کربوهیدارتها C-O و باند $cm^{-1}$ 1040 پلی ساکاریدها CO (اینبار و همکاران 1990، نیمایر و همکاران 1992، استونسون 1994، فرانسیوسو و همکاران 1998، سانچز- موندرو و همکاران 2003).

طیف های تیمارهای مختلف تفاوت های بسیار اندکی را نشان داد (به دلیل تشابه فقط 4 طیف در شکل های 1، 2، 3 و 4 آورده شده است). تشابهات طیف ها می تواند به علت یکسان بودن منشا مواد هیومیک (ورمی کمپوست) باشد (میکی و همکاران 1997). FTIR برآورد کیفی از گروه های عاملی را نشان می دهد و اغلب برای شناسایی گروه های عاملی از این روش استفاده می گردد. طبق طیف های اندازه گیری شده، اکثر گروه های عاملی در تمام تیمارها مشترک بودند. لذا می توان برای تعیین کمی گروه های عاملی از روش هایی مثل NMR و روش پیشنهادی پیج (1982) استفاده کرد.

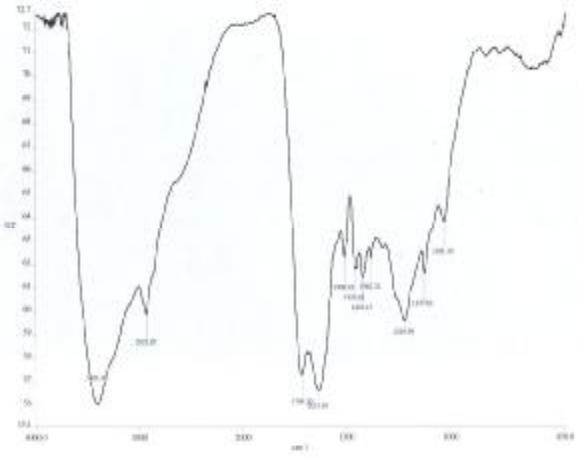
**نسبت های اسپکتروفوتومتری در اسید هیومیک**

نسبت های اسپکتروفوتومتری نیز نشان داد بیشترین مقدار $E_3/E_5$ در تیمار VC+N و کمترین مقدار این نسبت در تیمار VC+Ps بود (جدول 4). شاخص $E_3/E_5$ اندازه مولکولی را نشان می دهد. با افزایش این نسبت اندازه مولکولی کاهش و برعکس با کاهش این نسبت، اندازه مولکولی افزایش می یابد (هلال و همکاران 2011) کاهش اندازه مولکولی در تیمار VC+N می تواند به علت زیادی گروه های OH–فنلی در این تیمار باشد.

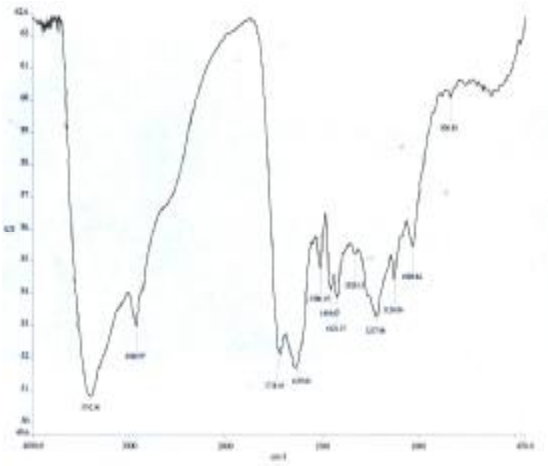
نسبت $E_4/E_6$ در تیمارهای مختلف بعد از غنی سازی در جدول 4 آورده شده است. تیمار VC+NSP بیشترین و تیمار VC+Ps کمترین مقدار این نسبت را داشتند. نسبت $E_4/E_6$ تراکم ترکیبات آلیفاتیک به آروماتیک را نشان می دهد با افزایش این نسبت تراکم ترکیبات آلیفاتیک بیشتر از آروماتیک می شود (کامپیتلی و همکاران 2006). با افزایش روند تولید کمپوست ترکیبات آروماتیک بشدت افزایش می یابد و مواد هیومیک پایدارتر می شوند (امیر و همکاران 2008).



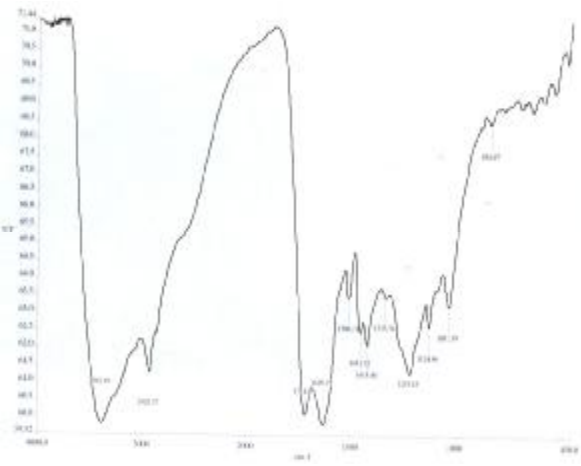
شکل 1- طیف **FTIR** اسید هیومیک استخراج شده از تیمار **VCC** بعد از 60 روز انکوباسیون



شکل 2- طیف **FTIR** اسید هیومیک استخراج شده از تیمار **VC+NPS** بعد از 60 روز غنی سازی



شکل 3- طیف **FTIR** اسید هیومیک استخراج شده از تیمار **VC+S** بعد از 60 روز غنی سازی



شکل 4- طیف **FTIR** اسید هیومیک استخراج شده از تیمار **VC+Az+Ps** بعد از 60 روز غنی سازی

## نتیجه گیری کلی

با افزایش جمعیت میکروبی شاخص های هوموسی شدن در تیمارهای ورمی کمپوستی افزایش یافت. با توجه به تاثیر پایداری ماده آلی در خاک، انتظار می‌رود تیمارهای باکتریایی و همچنین تیمار VC+NSP توانایی و کارایی بیشتری در بهبود خواص فیزیکو شیمیایی خاک داشته باشند. نوع غنی سازی تاثیر زیادی در ترکیب عنصری اسید هیومیک دارد و عناصر اضافه شده در روند غنی سازی می تواند در ترکیب عنصری اسید هیومیک حضور داشته باشد. با افزایش جمعیت میکروبی مقدار اکسیژن در اسید هیومیک افزایش و برعکس مقدار کربن کاهش یافت. گروه های عاملی با غنی سازی افزایش یافت. گروه های عاملی شدیدا متاثر از نوع غنی سازی می باشد، بطوریکه

تیمارهای کودی که با اوره غنی شده بودند گروه های OH-فنلی غالب بود و در تیمارهای باکتریایی گروه های کربوکسیلی غالب می باشد. نتایج FTIR نشان داد با غنی سازی تغییر زیادی در نوع و ساختار گروه های عاملی ایجاد نمی شود. نتایج نسبت های اسپکتروسکوپی نیز نشان داد نمونه های اسید هیومیک که با اوره غنی شده بودند دارای بیشترین مقدار ترکیبات آلیفاتیک و کوچکترین اندازه مولکولی بودند و تیمارهای باکتریایی برعکس تیمارهای غنی شده با اوره دارای بیشترین مقدار ترکیبات آروماتیک و بزرگترین اندازه مولکولی بودند. غنی سازی با گوگرد و فسفر نیز نشان داد این عناصر تاثیر مثبتی بر روی شاخص های هوموسی شدن و گروه های عاملی اسید هیومیک نسبت به تیمار ورمی کمپوست بدون غنی سازی و همچنین ورمی کمپوست غنی شده با اوره دارند و می توان با توجه به نیاز کشت های مختلف، ورمی کمپوست را با این عناصر نیز غنی سازی کرد. در نهایت مشخص شد غنی سازی ورمی کمپوست تاثیر زیادی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی اسید هیومیک و شاخص های هوموسی شدن دارد و برای تاثیر حداکثری ورمی کمپوست، می توان با تیمارهای مناسب عمل غنی سازی را انجام داد.

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان از زحمات بی دریغ دکتر باقری مرندی، دکتر فرحبخش، دکتر سارا عباسیان، دکتر انتظامی (استاد شیمی تجزیه دانشگاه تبریز) تشکر و قدردانی می نمایند.

**منابع مورد استفاده**

Abbt Braun G and Frimmel FH, 1999. Basic characterization of Norwegian NOM samples-similarities and differences. Environ. Int. 25 (2/3): 161–180.

Adamtey N, Cofie O, Ofosu-Budu GK, Danso SKA and Forster D, 2009. Production and storage of N-enriched co-compost. Waste Management 29: 2429–2436.

Adani F, Genevini P, Tambone F and Montoneri E, 2006. Compost effect on soil humic acid: a NMR study, Chemosphere 65: 1414–1418.

Ahmad R, Khalid A, Arshad M, Zahir ZA and Mahmood T, 2008. Effect of compost enriched with N and L-tryptophan on soil and maize. Agronomy for Sustainable Development 28 (2): 299-305.

Amir S, Benlboukht F, Cancian N, Winterton P and Hafidi M, 2008. Physico-chemical analysis of tannery solid waste and structural characterization of its isolated humic acids after composting. J. Hazard. Mater 160: 448–455.

Amir S, Jouraiphy A, Meddich A, Gharous ME, Winterton P and Hafidi M, 2010. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and $^{13}C$ NMR. J. Hazard. Mater 177: 524–529.

Azarmi R, Sharifi Z and Satari MR, 2008. Effect of vermicompost on growth, yield and nutrition status of tomato (*Lycopersicum esculentum*). Pak. J. Biol. Sci. 11(14): 1797-1802.

Bardsley CE and Lancaster JD, 1960. Determination of reserve sulfur and soluble sulfates in soils Soil Science Society of America Journal 24 (4): 265-268.

Benitez E, Nogales R, Elvira C, Masciandaro G and Ceccanti B, 1999. Enzyme and earthworms activities during vermicomposting of carbaryl treated sewage sludge. J. Environ. Qual. 28, 1099–1104.

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. Biores. Technol. 110, 390–395..

Campitelli PA, Velasco MI and Ceppi SB, 2006. Chemical and physicochemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil. Talanta 69: 1234–1239.

Carter MR and Gregorich EG, 2006. Soil Sampling and Methods of Analysis, Second Ed. Canadian Society of Soil Science. 1224 pp.

Chen Y, Senesi N and Schnitzer M, 1977. Information provided on humic substances by E 4 /E 6 ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41: 352 –358.

Clapp CE, Hayes MHB, Simpson AJ and Kingery WL, 2005. Chemistry of soil organic matter. In: Tabatabai MA, Sparks DL (eds) Chemical processes in soils. SSSA Book Series, Madison WI, pp 1–150.

Francioso O, Sánchez-Cortés S, Tugnoli V, Ciavatta C and Gessa C, 1998. Characterization of peat fulvic acid fractions by means of FT-IR, SERS, and $^{1}H$, $^{13}C$ NMR spectroscopy. Appl Spectrosc 52(2): 270–277.

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

Helal A Aly, Murad GA and Helal AA, 2011. Characterization of different humic materials by various analytical techniques. Arabian Journal of Chemistry 4: 51–54.

Inbar Y, Chen Y and Hadar Y, 1990. Humic substances formed during the composting of organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. J. 54: 1316–1323.

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.

Miikki V, Senesi N and Hanninen K (1997). Characterization of humic material formed by composting of domestic and industrial biowastes. Part 2: Spectroscopic evaluation of humic acid structures. Chemosphere 34(8): 1639–1651.

Niemeyer J, Chen Y and Bollag JM, 1992. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fouriertransform infrared spectroscopy. Soil Sci. Soc. Amer. J. 56: 135–140.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., et al. (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties. ASA Monograph 9: 403–430.

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

Piccolo A, 1996. Humus and soil conservation. In: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 225–264.

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.

Ravindran B, Dinesh SL, John Kennedy L and Sekaran G, 2008. Vermicomposting of Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm Eisenia fetida. Applied Biochemical Biotechnology 151: 480–488.

Sanchez-Monedero MA, Cegarra J, Garcia D and Roig A, 2003. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. Biodegradation 13: 361–371.

Sanchez-Monedero MA, Roig A, Cegarra J and Bernal MP, 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. Biores. Technol 70: 193–201.

Senesi N, Miano TM and Brunetti G, 1996. Humic substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: Piccolo, A., (Ed.). Humic substances in terrestrial ecosystems; p. 531–593.

Song G, Novotny EH, Simpson AJ, Clapp CE and Hayes MHB, 2008. Sequential exhaustive extraction of a Mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin, by solid and solution state NMR. European Journal of Soil Science 59: 505–516.

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

Tan KH, 2003. Humic Matter in Soil and the Environment. Marcel Dekker, New York.

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

Walkley A, and IA Black, 1934. Chromic acid titration for determination of soil organic matter. Soil Science 63: 251.