

## اثر ورمی کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل کننده فسفات بر فراهمی فسفر، pH و شاخص‌های زیستی در یک خاک آهکی

فائزه پرستش<sup>۱</sup>، \* حسینعلی علیخانی<sup>۲</sup>، حسن اعتصامی<sup>۳</sup> و محمدرضا حسندخت<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران، آستاد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران،

<sup>۲</sup>آستادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تهران، آستاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴

### چکیده

سابقه و هدف: کمبود فسفر یکی از مشکلات عمده خاک‌های آهکی است. یکی از راه‌های مؤثر و اقتصادی افزایش فراهمی فسفر افزودن کودهای آلی به خاک است. از مطلوب‌ترین مواد آلی و کودهای زیستی موجود، کود ورمی کمپوست را می‌توان نام برد اما مصرف زیاد ورمی کمپوست برای رسیدن به عملکرد مطلوب و هم‌چنین دارا بودن فسفات‌های نامحلول آلی از محدودیت‌های کاربرد ورمی کمپوست می‌باشند. یکی از راه‌هایی که محدودیت‌های فوق را تعدیل می‌بخشد و اثربخشی ورمی کمپوست را افزایش می‌دهد، غنی‌سازی آن با باکتری‌های محرک رشد گیاه به‌ویژه با باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه ورمی کمپوست در مرکز تحقیقات ورمی کمپوست دانشگاه تهران تهیه شد. تعداد ۱۸ جدایه که دارای توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی و آلی بودند جداسازی گردید و در نهایت دو جدایه B53 و B22 که دارای توان بالای انحلال فسفات نامحلول بودند خالص‌سازی و شناسایی شد. آزمایش انکوباسیون در قالب طرح اسپیلیت پلات بر مبنای زمان به‌منظور بررسی غنی‌سازی ورمی کمپوست با باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر افزایش فراهمی فسفر قابل دسترس، pH و شاخص‌های زیستی شامل: تنفس میکروبی، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و دهیدروژناز، در گلدان‌های حاوی ۴ کیلوگرم خاک با ۵ تیمار شامل T<sub>1</sub>: ورمی کمپوست (۶٪) + (B53)؛ T<sub>2</sub>: ورمی کمپوست (۶٪) + (B22)؛ T<sub>3</sub>: شاهد مثبت (کود سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)؛ T<sub>4</sub>: ورمی کمپوست (۶٪) و T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک بدون ورمی کمپوست و باکتری) در ۳ تکرار طراحی و اجرا گردید و در زمان‌ها شروع انکوباسیون و ۳۰ روز پس از آن، اثر تیمارها بر مقدار فسفر قابل دسترس، pH و شاخص‌های زیستی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از توالی ژنی 16S rRNA نشان دادند که جدایه شماره B22 با ۹۹ درصد شباهت به گونه *Pseudomonas aeruginosa* و جدایه شماره B53 با ۹۸ درصد شباهت به گونه *Serratia marcescens* دارند. نتایج نشان داد که استفاده از ورمی کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub>) نسبت به تیمار

\* مسئول مکاتبه: halikhan@ut.ac.ir

شاهد (T<sub>4</sub>) سبب افزایش معنی دار فسفر قابل دسترس (به ترتیب ۵۹ و ۱۰۰ درصد)، تنفس میکروبی خاک (۵۸ و ۶۱ درصد)، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (۳۴ و ۴۱ درصد)، فعالیت آنزیم دهیدروژناز (۱۰۳ و ۱۳۳ درصد) و کاهش pH (۴/۷۰ و ۵/۴۰ درصد) گردید. با توجه به نتایج نهایی هر دو باکتری توانستند شاخص‌های زیستی و فراهمی فسفر را افزایش دهند.

**نتیجه‌گیری:** کاربرد ورمی‌کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub>) سبب افزایش فراهمی فسفر قابل دسترس، تنفس میکروبی، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، فعالیت آنزیم دهیدروژناز و کاهش pH خاک شد این در حالی است که تیمار غنی شده با باکتری *Serratia marcescens* (T<sub>2</sub>) توانایی بیش‌تری در افزایش فراهمی فسفر و شاخص‌های زیستی داشت. نتایج نشان داد که غنی‌سازی ورمی‌کمپوست با باکتری حل‌کننده فسفات می‌تواند جایگزین مناسبی برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفات و به‌عنوان یک استراتژی مناسب در مدیریت بهتر ورمی‌کمپوست در خاک‌های آهکی در آینده باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم دهیدروژناز، آنزیم فسفاتاز قلیایی، *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*

#### مقدمه

خاک، بسته به ویژگی این مواد، بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک از جمله پایداری خاکدانه‌ها، ظرفیت تبادل کاتیونی، pH، شاخص‌های زیستی و فعالیت آنزیمی تأثیرات متفاوتی می‌گذارد (۶). ماده آلی اضافه‌شده به خاک با کمپلکس کردن کلسیم محلول در خاک‌های آهکی و کمپلکس کردن آهن و آلومینیوم محلول در خاک‌های اسیدی و کاهش غلظت آن‌ها از تشکیل کمپلکس نامحلول فسفر جلوگیری و در نتیجه فراهمی فسفر در خاک را افزایش می‌دهد (۱ و ۳۳). از پرکاربردترین مواد آلی مورد استفاده در کشاورزی می‌توان به بیوجار، کمپوست، کودهای دامی، ورمی‌کمپوست و غیره اشاره کرد. ورمی‌کمپوست بهترین کود زیستی شناخته‌شده تاکنون است. استفاده از ورمی‌کمپوست به‌عنوان کود آلی به دلیل بالا بودن عناصر قابل جذب، مواد هومیکی و فعالیت میکروبی بالا باعث افزایش عملکرد گیاهان خواهد شد (۵۶). هم‌چنین مقدار بالای هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد گیاه شامل اکسین، جیبرلین، سیتوکینین موجود در ورمی‌کمپوست باعث افزایش سلامت و

فسفر از عناصر ضروری و پرمصرف برای رشد گیاهان است و بعد از نیتروژن، مهم‌ترین عنصر غذایی محدودکننده تولید محصول در بسیاری از نقاط جهان شناخته شده است (۲۳). استفاده از کودهای شیمیایی مرسوم‌ترین روش برای رفع کمبود فسفر در جهان شناخته شده است اما به دلیل پیچیدگی خاصیت شیمیایی فسفر در خاک‌های آهکی و اسیدی، تنها ۱۰-۲۵ درصد از کود فسفر مصرفی توسط گیاه برداشت می‌شود و بقیه آن در خاک تثبیت و یا تغییر شکل یافته و به شکل غیرقابل جذب درمی‌آید (۷۴). از طرفی استفاده زیاد از کودهای شیمیایی علاوه بر هزینه بالا (۷۳) می‌تواند منجر به آلودگی‌های زیست‌محیطی شود (۳۱). با توجه به تهدیدات آشکار ناشی از استفاده کودهای شیمیایی دانشمندان به دنبال یافتن جایگزینی مناسب که بتواند وابستگی به کودهای شیمیایی را به حداقل برساند هستند. از جمله این جایگزین‌ها می‌توان به کودهای آلی اشاره کرد (۲۵). پژوهش‌ها نشان داده که افزودن مواد آلی به

پارامترها آنزیم‌های خاک به دلیل اندازه‌گیری ساده و پاسخ سریع به تغییرات در خاک به‌عنوان شاخص‌های بالقوه کیفیت خاک پیشنهاد شده‌اند. آنزیم‌ها تجزیه مواد آلی را کاتالیز می‌کنند. فسفاتازها شاخص خوبی برای توان معدنی شدن فسفر آلی و فعالیت زیستی خاک هستند (۶۸). در واقع فسفاتازها از آنزیم‌های برون سلولی هستند و ترکیبات آلی محیط بهتری را برای پایداری آنزیم‌های برون‌سلولی در مقابل تنش‌های محیطی فراهم می‌آورد (۴). میکروارگانیسم‌های خاک منشأ اصلی تولید فسفاتازها هستند. به‌علاوه دهیدروژناز به‌عنوان یک شاخص کلی از فعالیت میکروبی در نظر گرفته شده است (۵۸) و با فرایند تنفس میکروبی مرتبط است. فعالیت آنزیم دهیدروژناز نشان‌دهنده متابولیسم اکسیداتیو در خاک است (۱۸). مطالعات متعدد نشان داده است که فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک با پارامترهای متابولیکی مانند تعداد سلول‌های میکروبی، تنفس خاک، غلظت ATP، نیتروژن و ماده آلی همبستگی مثبت دارد (۷۰). مویاموا و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که با کاربرد PSB و *Eisenia fetida* در طول فرایند کمپوست‌سازی میزان فسفر قابل‌دسترس به‌طور چشمگیری افزایش یافت (۴۲). کومار و سینگ (۲۰۰۱) نیز در پژوهش خود تأثیر ورمی‌کمپوست غنی شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (*Pseudomonas*) بر مقدار فسفر محلول در خاک فسفات را مورد بررسی قرار دادند (۲۷). نتایج آن‌ها نشان داد جمعیت باکتری‌های تلقیح‌شده، اسیدهای آلی، فعالیت آنزیمی و نیز مقدار فسفر محلول در آب افزایش یافت. بوساتو و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در طول فرایند کمپوست‌سازی سبب افزایش ۱۰۶ درصدی فسفر محلول در آب و ۴۳ درصد افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز شد (۸).

رشد گیاه می‌شود (۷۶). با این حال نیاز به استفاده زیاد ورمی‌کمپوست برای رسیدن به عملکرد مطلوب و دارا بودن فسفات‌های نامحلول آلی (غیرقابل جذب بودن) از محدودیت‌های کاربرد ورمی‌کمپوست می‌باشند (۲۷). یکی از راه‌های تعدیل محدودیت‌های فوق و افزایش اثربخشی ورمی‌کمپوست، غنی‌سازی آن با باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)<sup>۱</sup> به‌ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)<sup>۲</sup> می‌باشد. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات، از روش‌های مؤثر برای افزایش فسفر قابل‌جذب، جلوگیری از آلودگی آب‌وخاک و نیل به هدف کشاورزی پایدار است (۱۵ و ۴۳). مطالعات بسیاری نشان داده است که باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق اسیدی کردن، کلاته کردن، ترشح پروتون، آزادسازی اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم باعث افزایش فسفر قابل‌جذب می‌شوند (۳۰، ۶۰ و ۶۶). در میان این مکانیسم‌ها، اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم نقش مهمی در سم‌زدایی آلاینده‌ها و فعالیت میکروبی خاک دارند (۵۱). از سوی دیگر این اسیدهای آلی (به‌عنوان مثال سیتریک اسید، استیک اسید، اگزالیک اسید و غیره) می‌توانند سبب کاهش pH خاک و کلات کردن کاتیون‌ها (به‌ویژه کلسیم) شوند (۳۴). این میکروارگانیسم‌ها شکل‌های آلی فسفر را از طریق ترشح آنزیم‌های فسفاتاز یا فسفوهیدرولازها، معدنی و قابل‌جذب برای گیاه می‌سازند (۵۹). یکی از راه‌های ارزیابی اثر کارآمدی ورمی‌کمپوست غنی‌شده با PSB بررسی شاخص‌های زیستی و فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی آن می‌باشد. فعالیت‌های میکروبی نقش کلیدی در حاصلخیزی خاک دارند (۱۲) که با استفاده از چندین پارامتر از جمله تنفس، بیومس میکروبی و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری می‌شود (۵۵). در میان این

1- Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

2- Phosphate Solubilizing Bacteria

جدایه‌ها، به‌صورت تجدید کشت در دو مرحله و در محیط کشت نوترینت آگار صورت گرفت و تعداد ۶۶ جدایه با ویژگی‌های ظاهری متفاوت جداسازی گردید (۶۳).

**ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی جدایه‌ها:** به‌منظور تعیین توان کیفی انحلال فسفات معدنی کلیه جدایه‌ها بر محیط کشت اسپربر که شامل ۲/۵ گرم تری کلسیم فسفات  $(Ca_3(PO_4)_2)$  به‌عنوان تنها منبع فسفر بود کشت داده شدند (۶۷). سپس باکتری‌های دارای توان کیفی انحلال فسفات نامحلول معدنی (تعداد ۱۸ جدایه) انتخاب و در محیط کشت اسپربر اصلاح‌شده که در آن به‌جای ترکیب شیمیایی تری کلسیم فسفات از یک منبع آلی به نام اینوزیتول هگزا فسفات<sup>۱</sup> استفاده شد کشت داده شدند. قرائت قطر هاله به قطر کلنی پس از ۱۲۰ ساعت انجام شد. جدایه‌های B53 و B22 که دارای توان بالای انحلال فسفات نامحلول معدنی و آلی بودند برای انجام آزمون گرماگذری به مراحل بعد منتقل گردیدند. شاخص توان حل‌الیت<sup>۲</sup> در محیط جامد نیز با استفاده از قطر هاله به کلنی و با توجه به رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (۵۷). آزمون توان کمی انحلال فسفات نامحلول معدنی جدایه B53 و B22 در محیط کشت اسپربر مایع انجام شد (۴۰).

با توجه به موارد ذکرشده فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی تأثیر بالقوه‌ای بر میزان آزادسازی مواد مغذی و حاصلخیزی خاک دارند، بااین‌حال مطالعات کمی در خصوص اثر ورمی‌کمپوست غنی‌شده با انواع PSB بر فعالیت جامعه میکروبی و آنزیمی در خاک آهکی انجام‌شده است؛ بنابراین با توجه به موارد ذکرشده این پژوهش با هدف ارزیابی قابلیت ورمی‌کمپوست غنی‌سازی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر مقدار فسفر قابل‌جذب، pH، تنفس میکروبی، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و دهیدروژناز در یک خاک آهکی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

**جداسازی باکتری‌های ورمی‌کمپوست:** ورمی‌کمپوست از ماده اولیه کود گاوی و بقایای گیاهی (برگ درخت چنار) با نسبت ۳:۱ (وزنی/وزنی) در حضور کرم خاکی کمپوست‌ساز *Eisenia fetida* به‌مدت چهار ماه در ایستگاه آموزشی-پژوهشی ورمی‌کمپوست پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تولید شد. به‌منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از ورمی‌کمپوست سری رقت‌های مختلف تهیه و سپس به محیط کشت نوترینت آگار منتقل گردیدند. پس از رشد باکتری‌ها، مراحل دستیابی به کلنی تک از

$$\text{Solubilization Index (SI)} = \frac{\text{Colony diameter} + \text{halo zone diameter}}{\text{Colony diameter}} \quad (1)$$

گرفت. وجود هاله نارنجی در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخصی از توانمندی جدایه در جذب آهن از طریق ترشح سیدروفور در نظر گرفته شد (۵۴). برای ارزیابی تولید هورمون ایندول استیک اسید از روش گلیک من و دساکس استفاده شد (۲۱). ابتدا جدایه‌ها

**بررسی صفات محرک رشدی گیاه:** آزمون توان کیفی سیدروفور به روش الکساندر و زوبرر انجام شد (۲). پس از تهیه محیط کشت جامد کروم آزرو لاس، جدایه‌ها بر روی محیط به روش نقطه‌گذاری کشت‌شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت پنج روز درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار

1- Inositol hexaphosphate  
2- Solubilization Index

همسایه و حداکثر احتمال در نرم‌افزار Mega 5 درخت فیلوژنتیکی برای جدایه‌های موجود رسم شد. توالی‌های نوکلئوتیدی که در این پژوهش شناسایی شدند به پایگاه داده‌های GenBank فرستاده شده و با شماره دسترسی‌های مختلف ثبت شدند.

#### آزمایش انکوباسیون

**نمونه‌برداری خاک:** نمونه‌برداری خاک از یک خاک آهکی دارای کمبود فسفر قابل جذب واقع در منطقه اشتهاارد (ارتفاع از سطح دریا ۱۱۸۱ متر، طول جغرافیایی ۱۹' ۵۰° شرقی و عرض جغرافیایی ۴۴' ۳۵° شمالی) انجام شد و پس از هوا خشک کردن آن و عبور از الک دو میلی‌متری جهت تجزیه فیزیکی و شیمیایی آماده و برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مانند pH در گل اشباع، بافت به روش هیدرومتری (۱۹)، کربن آلی به روش والکی بلک (۴۷)، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع به وسیله هدایت سنج الکتریکی (رودز ۱۹۹۶)، ظرفیت تبادل کاتیونی خاک به روش جانشینی کاتیون‌ها با استات آمونیوم (۱۰)، فسفر قابل استفاده به روش اولسن (۵۰)، کربنات کلسیم معادل به روش کلسیمتری (۴۸) و درصد رطوبت مزرعه با دستگاه صفحات فشاری تعیین شدند. همچنین خصوصیات شیمیایی و زیستی ورمی‌کمپوست به روش‌های مذکور، قابلیت هدایت الکتریکی و pH در عصاره ۱:۵، فسفر کل به روش هضم خشک در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند (۱۱).

**طرح آزمایش و تیمارها:** این آزمایش در قالب طرح اسپلٹ پلات بر مبنای زمان با پنج تیمار و سه تکرار در دو زمان شروع انکوباسیون و سی روز بعد از انکوباسیون با تیمارهای زیر اجرا گردید.

در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت رشد داده و سپس، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت محتوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط ال-تریپتوفان منتقل شد و برای مدت ۷۲ ساعت در ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شد. سوسپانسیون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و یک میلی‌لیتر از محلول روئی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم مولار) مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها از طریق مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد IAA محاسبه شد (۵۳).

**شناسایی جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات:** جدایه B53 و B22 در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شدند و استخراج جدایه‌ها با استفاده از کیت (Promega, Madison, WI, USA) انجام شد. تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از روش ادواردز و همکاران (۱۹۸۹) و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F با توالی (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و 1492R با توالی (5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3') انجام شد (۱۶). توالی ژن‌های 16S rRNA بعد از خالص‌سازی محصولات PCR با کیت خالص‌سازی (Promega, Madison, WI, USA) توسط دستگاه توالی‌یاب شرکت ماکروژن کره جنوبی قرائت شد و تمام توالی‌های حاصل توسط نرم‌افزار (Edit sequence version 5.1) ویرایش شد و نتایج حاصل با توالی‌های ژن 16S rRNA موجود در بانک ژن دیتا بیس NCBI تطبیق داده شد و با دو روش اتصال

فسفات با  $\text{pH}=11$  و یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترای پارائیتروفنیل به آن افزوده شد و نمونه‌ها برای یک ساعت در دمای  $37 \pm 1$  درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از آن محلول به وسیله کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. چهار میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم  $0/5$  مولار و یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم  $0/5$  مولار برای اتمام یافتن فعالیت آنزیمی بدان افزوده و کاملاً تکان داده شد. تغییر رنگ در نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج  $410$  نانومتر اندازه‌گیری و به صورت میکروگرم پارائیتروفنیل بر گرم خاک خشک در یک ساعت انکوباسیون ( $\mu\text{g PNP g}^{-1}\text{Soil. h}^{-1}$ ) در دو زمان شروع انکوباسیون و سی روز پس از آن محاسبه گردید (۶۸). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دهیدروژناز در سه لوله درب‌دار پنج گرم نمونه وزن شده در دوتای آن‌ها پنج میلی‌لیتر محلول سوبسترا و در لوله سوم پنج میلی‌لیتر محلول بافر تریس اضافه شد. نمونه‌ها به طور کامل مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از آن برای عصاره‌گیری تری فنیل فرمازان تولید شده به همه لوله‌ها ۲۵ میلی‌لیتر استن اضافه شد و نمونه‌ها مخلوط شده و به مدت دو ساعت در تاریکی عمل شیک ادامه یافت. نمونه‌ها در اتاقی نیمه‌تاریک فیلتر شده و جذب تراکم رنگ با اسپکتروفتومتر در  $546$  نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از معادله ۲ فعالیت آنزیم دهیدروژناز محاسبه شد (۴۹).

$$E = \frac{[(S-C) \times 100]}{W \times \%dm} \quad (2)$$

حسب  $W$  جرم خاک مرطوب  $\mu\text{g TPF /dm.24h g}$  و  $\%dm$  فاکتور درصد وزن خاک خشک.

T1- ورمی‌کمپوست + B53 (*Pseudomonas aeruginosa*)؛ T2- ورمی‌کمپوست + B22 (*Serratia marcescens*)؛ T3- کود سوپر فسفات تریپل (شاهد مثبت - بدون باکتری و ورمی‌کمپوست)، T4- ورمی‌کمپوست و T5- شاهد منفی (بدون باکتری، کود سوپر فسفات تریپل و ورمی‌کمپوست) چهار کیلوگرم خاک و ورمی‌کمپوست (۶ درصد) درون گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. سپس مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از زاد مایه باکتری‌های مورد نظر با جمعیت  $4 \times 10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$  به تمام گلدان‌ها افزوده شد. گلدان‌ها در دمای ۲۹ درجه سلسیوس و تهویه مناسب به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. در طول دوره انکوباسیون رطوبت گلدان‌ها در دامنه ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به روش وزنی حفظ گردید. در بازه‌های زمانی صفر و سی روز از گلدان‌ها نمونه‌برداری در عمق یکسان و به صورت یکنواخت انجام شد. نمونه جهت اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی و زیستی آماده شدند.

اندازه‌گیری فسفر قابل جذب و  $\text{pH}$ : فسفر قابل جذب نمونه خاک تیمارها در ابتدا و انتهای دوره انکوباسیون به روش اولسن (۵۰) و  $\text{pH}$  در عصاره گل اشباع اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری برخی شاخص‌های زیستی: به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی یک گرم خاک مرطوب توزین و به ارلن  $100$  میلی‌لیتری منتقل و سپس  $0/25$  میلی‌لیتر تولوئن و چهار میلی‌لیتر بافر

که در آن،  $E$  فعالیت دهیدروژناز،  $S$  غلظت نمونه‌ها بر حسب  $\mu\text{g TPF /dm.24h g}$ ،  $C$  غلظت شاهد بر

خاک خشک در ۲۴ ساعت با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (۲۸).

برای اندازه‌گیری میزان تنفس میکروبی از روش تیتراسیون با اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار استفاده شد. میزان دی‌اکسید کربن برحسب میلی‌گرم CO<sub>2</sub> بر گرم

$$\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil } 24 \text{ h}^{-1} = \frac{(v_0 - v_1) \times N \times 22}{d_w} \quad (3)$$

برای سویه‌های منتخب B22 و B53 به ترتیب ۲/۹۲ و ۲/۴ HD/CD، ۳۶۱ و ۱۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. توانایی کیفی انحلال فسفات نامحلول آلی نیز برای این سویه‌ها به ترتیب ۵/۹ و ۱/۹۲ HD/CD بود (جدول ۱). یکی از راه‌های تأثیر باکتری‌ها بر رشد و نمو گیاهان سنتز فیتوهورمون ایندولی (IAA) است. این هورمون باعث توسعه سیستم جذب توسط ریشه گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی به وسیله گیاه می‌شود (۶۵). هر دو جدایه B22 و B53 دارای توان تولید این هورمون بودند اما سنتز این هورمون در جدایه B22 مقدار قابل توجهی بیش‌تر از جدایه B53 بود. توانایی تولید سیدروفور در تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها در شرایط کمبود آهن گزارش شده است (۶۵) و هر دو جدایه B22 و B53 دارای توانایی تولید سیدروفور بودند.

که در آن،  $v_0$  حجم اسید مصرفی برای شاهد،  $v_1$  حجم اسید مصرفی برای نمونه،  $N$  نرمالیه اسید مصرفی،  $d_w$  وزن خاک خشک، (۲۲) وزن یک اکی‌والان دی‌اکسید کربن بر حسب میلی‌گرم. در نهایت تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودار با نرم‌افزار Excel انجام شد.

### نتایج و بحث

ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی جدایه‌ها و صفات محرک رشد گیاه: در این مطالعه به‌طورکلی، ۶۶ جدایه باکتری جداسازی شد که تنها ۱۸ جدایه دارای توان انحلال فسفر معدنی بودند و هم‌چنین ۱۷ جدایه توانایی انحلال فسفات‌های آلی را داشتند. در نهایت دو جدایه B22 و B53 انتخاب شد. توانایی کیفی و کمی انحلال فسفات نامحلول معدنی

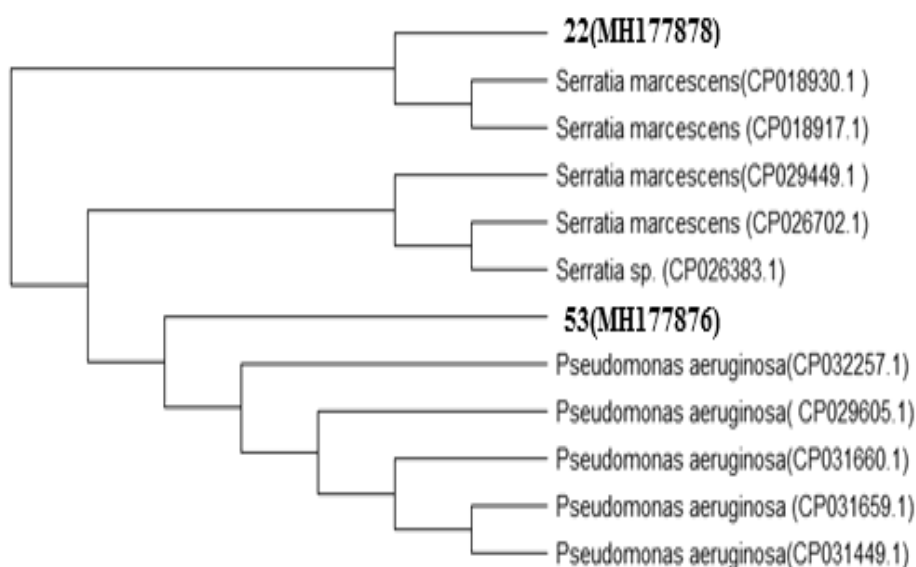
جدول ۱- ویژگی‌های محرک رشد سویه‌های B53 و B22 جدا شده از ورمی‌کمپوست.

Table 1. PGP activities of strains B53 and B22 isolated from Vermicompost.

انحلال فسفات نامحلول معدنی Inorganic phosphate Solubilization	انحلال فسفات نامحلول آلی Organic phosphate Solubilization	انحلال فسفات نامحلول معدنی Inorganic phosphate solubilization	تولید IAA IAA production	تولید سیدروفور Siderophore production	
(HD/CD)		(µg/ml)			
2.40	1.92	185	22.1	+	B53 جدایه
2.92	5.90	361	2.64	+	B22 Isolate

ریزوسفر و ریشه گیاه گندم جداسازی کردند که شاخص توان حلالیت (نسبت قطر هاله به کلونی) سویه‌های مختلف از ۳/۲ تا ۳/۶ متغیر بود و میزان تولید هورمون IAA از ۱۹ تا ۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود (۱۷). پوپتا و همکاران (۲۰۱۲) با جداسازی *Pseudomonas sp.* و *Serratia marcescens* و بررسی توان انحلال فسفات معدنی آن‌ها در محیط حاوی تری کلسیم فسفات (TCP) گزارش کردند که این سویه‌های توانستند فسفر را از ۲۵ تا ۳۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حل کنند (۲۲).

شناسایی جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات: نتایج حاصل از توالی ژنی 16S rRNA نشان دادند که جدایه شماره B22 با ۹۹ درصد شباهت به گونه *Serratia marcescens* و جدایه شماره B53 با ۹۸ درصد شباهت به گونه *Pseudomonas aeruginosa* تعلق دارند و جدایه‌های موردنظر با شماره ثبت MH177876 و MH177878 به ترتیب برای جدایه B22 و B53 در پایگاه داده GenBank به ثبت رسید (شکل ۱). امامی و همکاران (۲۰۱۸) سویه‌های ریزوسفر و اندوفیت *Pseudomonas.sp* را از



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی که موقعیت سویه‌های منتخب را بر اساس مقایسه توالی‌های ژن 16S rRNA نشان می‌دهد.

Figure 1. Phylogenetic tree showing the position of selected strains based on comparison of 16S rRNA gene sequences.

کیلوگرم) بود و درصد کربنات کلسیم معادل آن بیش‌تر از پنج درصد بود بنابراین بر اساس طبقه‌بندی خاک فائو جزو خاک‌های آهکی طبقه‌بندی می‌شود. هم‌چنین ورمی‌کمپوست مورد استفاده دارای فسفر کل و کلسیم کل بالایی بود.

ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و ورمی‌کمپوست: ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و ورمی‌کمپوست مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. خاک مورد استفاده دارای pH قلیایی و از نظر فسفر قابل جذب زیر سطح بحرانی (۱۵ میلی‌گرم بر



جدول ۲- برخی ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی خاک و ورمی کمپوست مورد استفاده.

**Table 2. Some physical, chemical and biological properties of studied Soil and Vermicompost.**

ویژگی Property	مقدار (Quantity)	ویژگی Property
خاک (Soil)	ورمی کمپوست (Vermicompost)	
EC*	3 (dsm <sup>-1</sup> )	2.14 (dsm <sup>-1</sup> )
pH*	8.4	8.4
فسفر قابل جذب (Available P)	8.42 (mg kg <sup>-1</sup> )	-
فسفر کل (Total P)	1031 (mg kg <sup>-1</sup> )	1.4 (%)
پتاسیم کل (Total K)	-	6.52 (%)
کلسیم کل (Total Ca)	-	8.5 (%)
ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC)	14.6 (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	-
رطوبت ظرفیت مزرعه (FC) ( )	25.9 (%)	-
کربن آلی (Organic carbon)	0.75 (%)	-
کربنات کلسیم معادل (Calcium carbonate equivalent)	14.9 (%)	-
شن (Sand)	61.3 (%)	-
سیلت (Silt)	17.5 (%)	-
رس (Clay)	21.2 (%)	-
کلاس بافت خاک (Texture class)	لومی رسی شنی (Sandy Clay Loam)	-

pH و EC خاک در عصاره اشباع و pH و EC ورمی کمپوست در نسبت ۱:۵ (آب به ورمی کمپوست) اندازه‌گیری شدند.

\*Soil pH and EC were measured in saturated extract, vermicompost pH and EC in a ratio of 1: 5 (water to vermicompost)

### اثر تیمارها بر فسفر قابل جذب و pH

اثر تیمارها بر فراهمی فسفر: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و نیز اثر متقابل آنها بر میزان فراهمی فسفر قابل جذب معنادار ( $P < 0.01$ ) شد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد که در زمان شروع انکوباسیون در تیمارهای حاوی ورمی کمپوست با و بدون باکتری ( $T_1, T_2$  و  $T_4$ ) در مقایسه با تیمارهای بدون ورمی کمپوست ( $T_3$  و  $T_5$ ) فسفر قابل جذب افزایش معنی‌داری داشت. همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و تیمارها با آزمون دانکن نشان داد که در تیمارهای  $T_1, T_2$  و  $T_4$  فسفر قابل جذب در مقایسه با زمان شروع انکوباسیون افزایش معنی‌داری داشت در حالی‌که در تیمارهای  $T_3$  و  $T_5$  این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۲). غنی‌سازی ورمی کمپوست با باکتری‌های حل‌کننده فسفات اثر

چشمگیری بر فراهمی فسفر قابل جذب داشت. به‌طوری‌که فسفر قابل جذب پس از انکوباسیون در تیمار  $T_4$  (ورمی کمپوست) ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود در حالی‌که تیمارهای غنی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفر ( $T_1$  و  $T_2$ ) به ۲۸۴ و ۳۵۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش پیدا کردند. در بین تیمارها، در تیمار  $T_2$  (۳۵۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش‌ترین میزان فسفر قابل جذب در مقایسه با زمان شروع انکوباسیون (۸۶/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده شد. فعالیت‌های آنزیمی (۶۹) و متابولیک‌های میکروبی (۲۴) مکانیسم اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفات برای در افزایش فراهمی فسفر هستند. به‌طور مشابه اسکروینو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق ترشح اسیدهای آلی سبب افزایش معنی‌دار فسفر قابل جذب شد (۶۴).

به دلیل تجزیه این مواد و آزادسازی اسیدهای آلی است (۷۵). لاکاش و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که افزون بکتری‌های حل‌کننده فسفات به ورمی‌کمپوست توانست فسفر قابل‌دسترس را تا ۴۳ درصد افزایش دهد (۳۲). فرایند جذب و رسوب فسفر در خاک به عوامل مختلفی مانند مقدار کلسیم و منیزیم تبدیلی، کربنات کلسیم، کربن آلی، بافت، pH و قدرت یونی محلول خاک بستگی دارد (۱۳) که همان‌گونه که در نتایج نشان داده شده است در تیمارهای T<sub>3</sub> و T<sub>5</sub> به‌علت بالاتر بودن pH در مقایسه با بقیه تیمارها شرایط برای تثبیت فسفر مساعدتر بود در نتیجه سبب شد این تیمارها مقدار فسفر قابل‌جذب کم‌تری در مقایسه با سایر تیمارها داشته باشند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد فسفاتاز شاخص خوبی برای توان معدنی شدن فسفر آلی و دهیدروژناز شاخص مناسبی برای فعالیت بیولوژیک خاک است.

هم‌چنین، افزایش فسفر قابل‌جذب ممکن است به‌واسطه آزادسازی CO<sub>2</sub> در طی تجزیه میکروبی ورمی‌کمپوست و کمپلکس شدن کاتیون‌های اصلی (مانند کلسیم) مسئول تثبیت فسفر در خاک اتفاق افتاده باشد. به‌علاوه افزایش فسفر در طول این دوره ممکن است ناشی از معدنی‌سازی فسفر توسط بکتری‌ها و فعالیت آنزیمی خاک به‌ویژه آنزیم فسفاتاز باشد (۴۴) که با نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک نیز همخوانی دارد. کومار و سینگ (۲۰۰۱) بیان کردند که غنی‌سازی ورمی‌کمپوست با بکتری‌های حل‌کننده فسفات میزان فسفر قابل‌جذب گیاه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (۲۷). در پژوهشی بیان شد که استفاده از بکتری‌های حل‌کننده فسفات در طول دوره سبب افزایش فسفر تا ۱۰۶ درصد شد (۸). وای و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که افزایش فسفر در صورت استفاده از مواد آلی

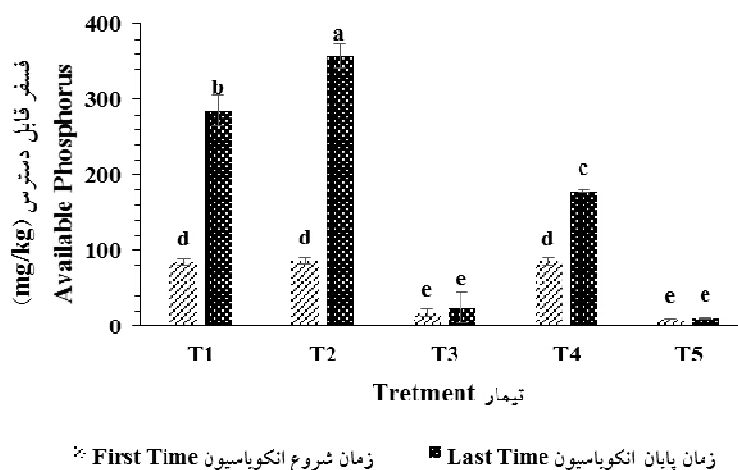
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمار و زمان بر فسفر قابل‌جذب، آنزیم فسفاتاز قلیایی، pH، آنزیم دهیدروژناز و تنفس میکروبی.

**Table 3. Analysis of variance interaction between different levels of Treatment and Time on Available Phosphorus, Alkaline phosphatase enzyme, pH and Dehydrogenase enzyme and Microbial respiration.**

میانگین مربعات MS					درجه آزادی DF	منابع تغییرات SOV
تنفس میکروبی Microbial respiration	آنزیم دهیدروژناز Dehydrogenase enzyme	pH	آنزیم فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase enzyme	فسفر قابل‌جذب Available Phosphorus		
0.070**	155**	0.139**	81333**	54930**	4	تیمار Treatment
0.0007	0.230	0.004	104	113	10	خطای تیمار Treatment Error
0.300**	556**	1.53**	22023.4**	97713**	1	زمان Time
0.170**	103**	0.065**	10093**	21314**	4	تیمار × زمان Treatment × Time
0.0009	0.430	0.003	28.1	129	10	خطا Residual
11.4	6.40	0.830	1.90	10.6	-	ضریب تغییرات CV(%)

\*\* معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

\*\* Significant at P<0.01

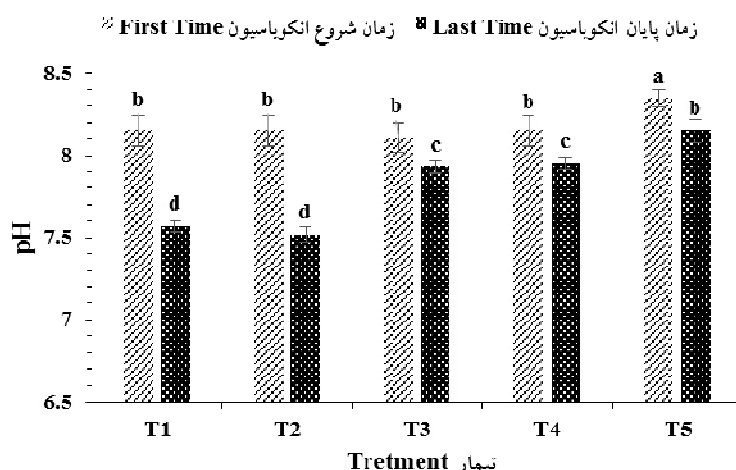


شکل ۲- اثر زمان و تیمار بر میزان فسفر قابل جذب در خاک. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری ( $P < 0.05$ ) می باشند. T<sub>1</sub>: ورمی کمپوست + باکتری B53, T<sub>2</sub>: ورمی کمپوست + باکتری B22, T<sub>3</sub>: شاهد مثبت (کود سوپر فسفات تربیل به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، T<sub>4</sub>: ورمی کمپوست، T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک به تنهایی).

**Figure 2.** Effect of time and treatment on the amount of phosphorus available in soil. Different letters represent a significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). T<sub>1</sub>: vermicompost + B53, T<sub>2</sub>: vermicompost + B22, T<sub>3</sub>: positive control (triple super phosphate fertilizer 50 mg / kg), T<sub>4</sub>: vermicompost, T<sub>5</sub>: negative control (Soil alone).

با افزودن مواد آلی و به دنبال آن افزایش تولید CO<sub>2</sub> موجب شد که میانگین pH خاکها کاهش یابد. این در حالی که است که بین تیمارهای T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> تفاوت معنی داری مشاهده نشد. (شکل ۳). کاربرد کمپوست در خاکهای کمی قلیایی اغلب سبب کاهش یا عدم تغییر در pH می شود (۳۷). در پژوهشی دیگر بیان شد که تغییر در pH خاک بستگی به pH اولیه خاک، pH کمپوست و مقدار کاربرد کمپوست دارد (۴۱). بانیک و دی (۱۹۸۲) گزارش کردند که کمپوست حاصل از ضایعات بستر قارچ باعث افزایش اسیدیته خاکهای آهکی شده است (۵). مدینا و همکاران (۲۰۱۲) نیز در یک مطالعه انکوباسیون به مدت ۱۲۶ روز در یک خاک قلیایی، با کاربرد دو نوع کمپوست قارچ و اندازه گیری pH خاک در چند زمان مشاهده کردند که در زمان ۳۰ روز آزمایش، هر دو نوع کمپوست سبب کاهش pH خاک در مقایسه با شاهد شد اما این تغییرات با گذشت زمان متفاوت بود (۳۸).

اثر تیمارها بر pH: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی و متقابل زمان و تیمار بر pH خاک معنی دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین بین همه تیمارها نشان داد که با افزایش زمان تا ۳۰ روز، میزان pH خاک در همه تیمارها کاهش یافت. اثر اصلی کاربرد باکتری حل کننده فسفات به طور قابل توجهی سبب کاهش pH خاک در طول دوره انکوبه کردن شد (شکل ۳). در زمان شروع انکوباسیون تغییرات pH در بین تیمارها معنی دار نبود اما پس از پایان دوره انکوباسیون pH در تمامی تیمارها کاهش یافت. در تیمارهای T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> (تیمارهای غنی شده با باکتریهای حل کننده فسفات) کاهش pH حدوداً نسبت به تیمار شاهد (T<sub>4</sub>) پنج درصد کاهش یافت که می تواند ناشی از افزایش فعالیت باکتریهای حل کننده فسفات به دلیل ترشح اسید و انحلال فسفر و در نهایت کاهش pH خاک باشد هم چنین گروه های عاملی کربوکسیلی و فنولی درون مواد آلی از مهم ترین مواد کاهش دهنده pH هستند (۵۶). در واقع افزایش فعالیت میکروارگانیسمها



شکل ۳- اثر زمان بر میزان فعالیت pH خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ( $P < 0.05$ ) می‌باشند. T<sub>1</sub>: ورمی‌کمپوست + B53، T<sub>2</sub>: ورمی‌کمپوست + B22، T<sub>3</sub>: شاهد مثبت کود سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، T<sub>4</sub>: ورمی‌کمپوست، T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک به تنهایی).

**Figure 3.** Effect of time and treatment on the amount of phosphorus available in soil. Different letters represent a significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). T<sub>1</sub>: vermicompost + B53, T<sub>2</sub>: vermicompost + B22, T<sub>3</sub>: positive control (triple super phosphate fertilizer 50 mg / kg), T<sub>4</sub>: vermicompost, T<sub>5</sub>: negative control (Soil alone).

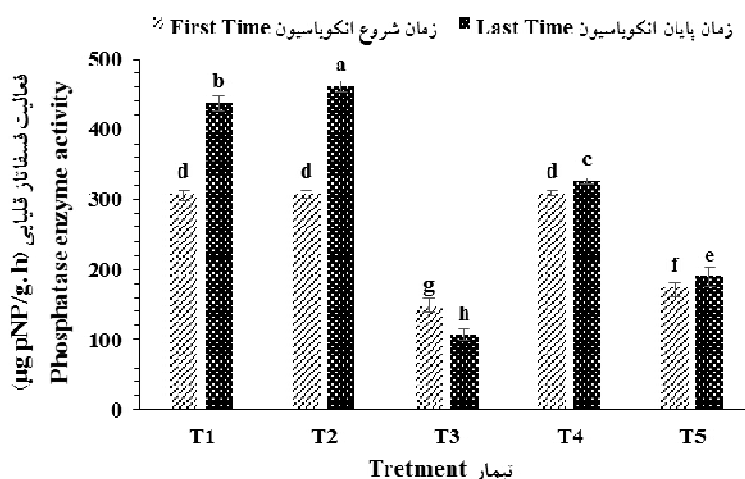
خاک تعیین‌کننده فعالیت میکروارگانیسم‌ها در ترشح آنزیم فسفاتاز است (۴۵). نتایج قولاراتا و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که با افزایش کود میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز کاهش یافت (۲۰). در پایان دوره انکوباسیون فعالیت آنزیم فسفاتاز در تیمارهای T<sub>1</sub>، T<sub>2</sub>، T<sub>4</sub> و T<sub>5</sub> افزایش یافت اما این افزایش در تیمارهای حاوی باکتری حل‌کننده فسفات چشمگیرتر بود به طوری که فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمارهای T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> از ۳۱۰ و ۳۱۱  $\mu\text{g pNP/g. h}$  در زمان شروع به ترتیب به ۴۳۶ و ۴۶۶  $\mu\text{g pNP/g. h}$  در پایان دوره انکوباسیون افزایش یافت. همچنین تیمارهای غنی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub>) توانستند فعالیت فسفاتاز قلیایی را نسبت به تیمار شاهد (T<sub>4</sub>) به ترتیب ۴۱ و ۳۴ درصد افزایش دهند که این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. به‌علاوه تیمار T<sub>2</sub> (تیمار حاوی ورمی‌کمپوست و باکتری ۲۲) توانست فعالیت آنزیم فسفاتاز را نسبت به بقیه تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش دهد که

#### اندازه‌گیری برخی شاخص‌های زیستی

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی: تجزیه واریانس فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان داد که اثرات تیمار، زمان و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال کم‌تر از ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است در شروع دوره انکوباسیون با کاربرد ورمی‌کمپوست با و بدون باکتری (T<sub>1</sub>، T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub>) فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی و مثبت (T<sub>3</sub> و T<sub>5</sub>) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت اما تیمارهای T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> نسبت به تیمار شاهد (T<sub>4</sub>) افزایش معنی‌داری نداشتند. در مقابل در تیمار حاوی کود سوپرفسفات تریپل (T<sub>3</sub>) میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز در زمان شروع انکوباسیون و همچنین پایان دوره انکوباسیون نسبت به تیمار شاهد منفی (T<sub>5</sub>) کاهش معنی‌داری نشان داد که این کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز در واقع می‌تواند ناشی از استفاده از کود شیمیایی و کاهش زیست‌توده میکروبی باشد. در واقع مقدار فسفر معدنی موجود در

آلی سبب تثبیت و حفاظت از آنزیم‌ها در برابر صدمات ناشی از عوامل مختلف می‌گردد. ژائو و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تغییر نسبت فسفر آلی در خاک عمدتاً به وسیله فسفومونواسترها، آلکالین فسفاتازها و باکتری‌های حل‌کننده فسفات کنترل می‌شود (۷۷). در مطالعه‌ای با افزودن کلش برنج، فضولات خوک و کلش برنج به همراه فضولات خوک میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (۲۹). در پژوهشی مشاهده شد که با افزایش ماده آلی در خاک میزان فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز افزایش یافت (۳۶). پژوهشگران دیگر نیز بیان نمودند که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در طول دوره کمپوست‌سازی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شد (۸).

نشان‌دهنده توانایی بیشتر این باکتری در آزادسازی فسفاتاز قلیایی و تحریک بیشتر جامعه میکروبی است. افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز احتمالاً به دلیل افزایش و تحریک جامعه میکروبی ناشی از کاربرد ورمی‌کمپوست و باکتری حل‌کننده فسفات، ماده آلی و به تبع آن مواد غذایی و بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی خاک است. به علاوه نوع مواد آلی به شدت فعالیت آنزیمی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. وجود مقادیر بالای کربن آلی، نیتروژن و فسفر در خاک علاوه بر فراهم نمودن امکان فعالیت میکروب‌ها در خاک، جذب مولکول‌های آنزیم را بر سطوح کلونیدی آلی فراهم کرده و سبب ادامه فعالیت مولکول‌های آنزیم می‌گردد و فعالیت آنزیمی را بالا می‌برد. در واقع حضور مولکول‌های آنزیم بر روی سطح کلونیدهای



شکل ۴- اثر زمان بر میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ( $P < 0.05$ ) می‌باشند. T<sub>1</sub>: ورمی‌کمپوست + B53, T<sub>2</sub>: ورمی‌کمپوست + B22, T<sub>3</sub>: شاهد مثبت کود سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، T<sub>4</sub>: ورمی‌کمپوست، T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک به تنهایی).

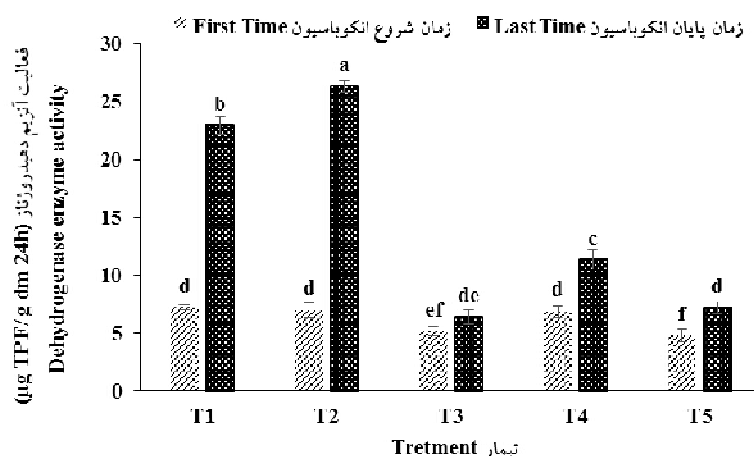
**Figure 4.** Effect of time and treatment on the amount of phosphorus available in soil. Different letters represent a significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). T<sub>1</sub>: vermicompost + B53, T<sub>2</sub>: vermicompost + B22, T<sub>3</sub>: positive control (triple super phosphate fertilizer 50 mg / kg), T<sub>4</sub>: vermicompost, T<sub>5</sub>: negative control (Soil alone).

از یک درصد معنی‌دار است (جدول ۳). در زمان شروع انکوباسیون در تیمارهای حاوی ورمی‌کمپوست و باکتری حل‌کننده فسفات (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> و T<sub>4</sub>) میزان

فعالیت آنزیم دهیدروژناز: نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم دهیدروژناز نشان داد که اثر اصلی تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان در سطح احتمال کم‌تر

فعالیت آنزیمی خاک می‌گردد (۲۶). آنزیم دهیدروژناز نقش مهمی در اکسیداسیون ترکیبات آلی دارد زیرا دهیدروژن را از سوسترا به گیرنده منتقل می‌کند (۵۲). آنزیم دهیدروژناز نقش مهمی در اکسیداسیون بیولوژیکی به‌وسیله انتقال دهیدروژن از مواد آلی به گیرنده‌های معدنی ایفا می‌کند (۴۶). آپارنا (۲۰۰۰) گزارش کرد که با کاربرد ورمی‌کمپوست در خاک میزان فعالیت دهیدروژناز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۳). ننگاسامی و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که استفاده از ورمی‌کمپوست سبب بهبود کیفیت بیوشیمیایی خاک و همچنین افزایش فعالیت دهیدروژناز می‌گردد (۷۲). رز و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که کاربرد مواد آلی باعث افزایش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به سوسترا و همچنین باعث افزایش ترشحات ریشه‌ای می‌شود که در نهایت افزایش فعالیت آنزیمی را به‌دنبال دارد (۶۱). مینا و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که استفاده از کودهای آلی بخصوص ورمی‌کمپوست باعث افزایش جمعیت میکروبی (باکتری، قارچ و اکتینومیست)، کربن زیتوده میکروبی خاک و فعالیت دهیدروژناز شد (۳۹).

فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد منفی (T<sub>5</sub>) افزایش یافت (شکل ۵). با افزایش زمان تا ۳۰ روز، فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک در همه تیمارها افزایش یافت. در تیمارهای غنی‌شده با باکتری‌های حل‌کننده فسفات (T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub>) این افزایش چشمگیرتر بود به‌گونه‌ای که در دو تیمار T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد (T<sub>4</sub>) به‌ترتیب ۱۰۳ و ۱۳۳ درصد افزایش نشان داد. بیش‌ترین افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز مربوط به تیمار T<sub>2</sub> (ورمی‌کمپوست غنی‌شده با *Serratia marcescens*) بود که از ۶/۹  $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$  در زمان شروع انکوباسیون به ۲۶/۳  $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$  در زمان سی روز رسید و دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها بود در واقع افزایش قابل‌توجه فعالیت دهیدروژناز ناشی از فعالیت بالای میکروارگانیسم‌هاست. افزودن ورمی‌کمپوست و مواد آلی به خاک سبب افزایش بیومس میکروبی و در نتیجه فعالیت دهیدروژناز در خاک می‌شود (۷) کومار و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که استفاده از ورمی‌کمپوست سبب افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، بیومس میکروبی و

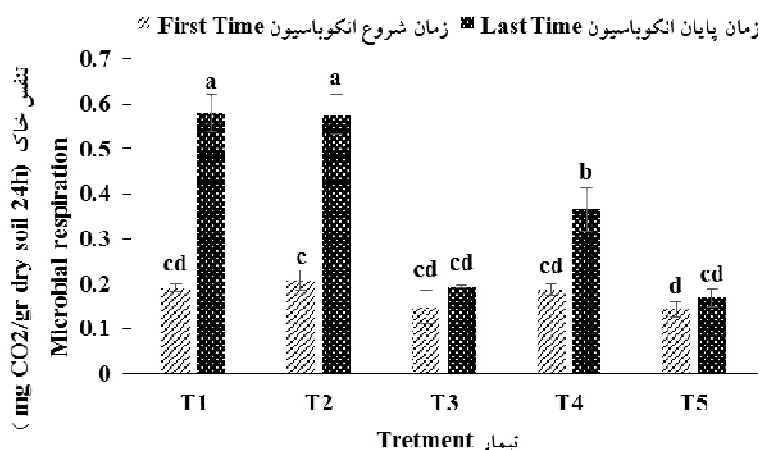


شکل ۵- اثر زمان بر میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ( $P < 0.05$ ) می‌باشند. T<sub>1</sub>: ورمی‌کمپوست + B53, T<sub>2</sub>: ورمی‌کمپوست + B22, T<sub>3</sub>: شاهد مثبت (کود سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، T<sub>4</sub>: ورمی‌کمپوست، T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک به‌تنهایی).

Figure 5. Effect of time and treatment on the amount of phosphorus available in soil. Different letters represent a significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). T<sub>1</sub>: vermicompost B53, T<sub>2</sub>: vermicompost + B22, T<sub>3</sub>: positive control (triple super phosphate fertilizer 50 mg / kg), T<sub>4</sub>: vermicompost, T<sub>5</sub>: negative control (Soil alone).

با این حال بیشترین افزایش مربوط به تیمار T<sub>2</sub> (ورمی کمپوست غنی شده با *Serratia marcescens*) که دارای اختلاف معنی داری با سایر تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بود. تنفس خاک به عنوان یک شاخص مهم ارزیابی کیفیت خاک و میزان سلامت اکوسیستم مطرح است. یک فعالیت اصلی میکروب های خاک، همانند دیگر اشکال حیات، زنده ماندن از طریق تولید مثل است. ریزسازواره های خاک بقایای گیاهی را به عنوان منبع انرژی و کربن در سنتز سلول های جدید به کار می برند. انرژی از طریق اکسایش ترکیبات آلی وارد سلول میکروبی می شود. محصول نهایی دی اکسید کربن است که وارد اتمسفر می گردد (۹). روسینی اولیوا و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که با افزودن کمپوست به خاک محتوای کربن آلی افزایش و به تبع آن میزان تنفس خاک نیز افزایش می یابد (۶۲). ماریناری و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که کودهای آلی به ویژه ورمی کمپوست سبب افزایش زیست توده میکروبی و متابولیسم خاک گردید (۳۵). رطوبت، دما، قابلیت دسترسی به مواد غذایی، ساختمان خاک، ذخیره کربن خاک، نوع گیاه کشت شده، زیست توده و فعالیت میکروبی و کودهای مصرف شده در خاک از جمله عواملی هستند که بر تنفس مؤثر است (۱۴). تجادا و گونزالز (۲۰۰۶) بیان کردند که با افزایش فراهمی مواد آلی، عناصر تغذیه ای، افزایش رشد و ریشه های گیاه، میزان فعالیت و جمعیت میکروارگانیسم ها افزایش یافته و به تبع آن میزان تنفس نیز افزایش می یابد (۷۱).

**تنفس میکروبی خاک:** تجزیه واریانس تنفس میکروبی خاک نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان در سطح احتمال کم تر از یک درصد معنی دار بود (جدول ۳). در زمان شروع انکوباسیون با کاربرد ورمی کمپوست میزان تنفس میکروبی خاک در تیمارهای غنی سازی شده با باکتری های حل کننده فسفات (T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub>) نسبت به تیمار شاهد (T<sub>4</sub>) افزایش یافت اما معنی دار نشد (شکل ۶). با افزایش زمان تا ۳۰ روز، میزان تنفس میکروبی خاک در همه تیمارها افزایش یافت با این حال تیمار شاهد مثبت (تیمار حاوی کود سوپرفسفات تریپل) (T<sub>3</sub>) نسبت به تیمار شاهد منفی (T<sub>5</sub>) افزایش معناداری نشان نداد. در تیمار T<sub>3</sub> به دلیل استفاده از کود سوپر فسفات تریپل به عنوان منبع فسفات میزان تنفس میکروبی به طور معنی داری افزایش نیافت در واقع وجود منابع معدنی و قابل دسترس فسفر، باکتری ها را برای رسیدن به مواد غذایی کاهش می دهد که نتیجه آن کاهش میزان تنفس میکروبی خاک است. در تیمار T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> (تیمارهای غنی شده با باکتری های حل کننده فسفات) میزان تنفس میکروبی خاک نسبت به تیمار T<sub>4</sub> (تیمار حاوی ورمی کمپوست به تنهایی) به ترتیب ۶۱ و ۵۸ درصد افزایش نشان داد. در واقع غنی سازی ورمی کمپوست با باکتری های حل کننده فسفات توانست میزان تنفس میکروبی خاک را افزایش دهد به طوری که در تیمارهای غنی شده T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> از ۰/۱۸ و ۰/۲۰ mg CO<sub>2</sub>/gr dry soil 24h به ترتیب به ۰/۵۹ و ۰/۵۸ mg CO<sub>2</sub>/gr dry soil 24h افزایش یافت.



شکل ۶- اثر زمان بر میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ( $P < 0.05$ ) می‌باشند. T<sub>1</sub>: ورمی کمپوست + B53، T<sub>2</sub>: ورمی کمپوست + B22، T<sub>3</sub>: شاهد مثبت (کود سوپر فسفات تریپل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، T<sub>4</sub>: ورمی کمپوست، T<sub>5</sub>: شاهد منفی (خاک به تنهایی).

Figure 6. Effect of time and treatment on the amount of phosphorus available in soil. Different letters represent a significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). T<sub>1</sub>: vermicompost + B53, T<sub>2</sub>: vermicompost + B22, T<sub>3</sub>: positive control (triple super phosphate fertilizer 50 mg / kg), T<sub>4</sub>: vermicompost, T<sub>5</sub>: negative control (Soil alone).

کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفات باشد و استفاده از آن به‌عنوان یک استراتژی مناسب در جهت مدیریت بهتر ورمی ورمی کمپوست در خاک‌های آهکی در آینده امکان‌پذیر است.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان و مسئولین گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران جهت تأمین امکانات اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمائیم.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر بسته به تیمارهای مختلف نتایج متفاوت بود. استفاده از ورمی کمپوست غنی‌شده سبب افزایش فراهمی فسفر، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، فعالیت آنزیم دهیدروژناز، تنفس میکروبی خاک و همچنین کاهش معنی‌دار pH خاک گردید به‌علاوه در ورمی کمپوست غنی‌شده با باکتری *Serratia marcescens* این نتایج چشمگیرتر بود. نتایج نشان داد که غنی‌سازی ورمی کمپوست با باکتری حل‌کننده فسفات می‌تواند جایگزین مناسبی جهت

### منابع

- Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology. 85: 1. 1-12.
- Alexander, D., and Zuberer, D. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. Biology and Fertility of Soils. 16: 2. 118-124.
- Aparna, B. 2000. The Thesis. Distribution, characterization and dynamics of soil enzymes in selected soils of Kerala. Kerala Agricultural University; 361p.
- Balota, E.L., Kanashiro, M., Colozzi Filho, A., Andrade, D.S., and Dick, R.P. 2004. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. Brazil. J. Microbiol. 35: 4. 300-306.



5. Banik, S., and Dey, B.K. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*. 69: 3. 353-364.
6. Barahimi, N., Afyuni, M., Karami, M., and Rezaee Nejad, Y. 2009. Cumulative and residual effects of organic amendments on nitrogen, phosphorus and potassium concentrations in soil and wheat. *J. Water Soil Sci*. 12: 46. 803-812.
7. Bergstrom, D., Monreal, C., and King, D. 1998. Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 62: 5. 1286-1295.
8. 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. *Bioresource Technology*. 110: 390-395.
9. Chaoui, H.I., Zibilske, L.M., and Ohno, T. 2003. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 2. 295-302.
10. Chapman, H. 1965. Cation-exchange capacity, *Methods of soil analysis*. Ca Black et all edition. Pp: 891-901.
11. Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1962. *Methods of analysis for soils, plants and waters*. Soil Science. Pp: 68-93.
12. Chen, S.K., Edwards, C.A., and Subler, S. 2003. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 1. 9-19.
13. Del Bubba, M., Arias, C., and Brix, H. 2003. Phosphorus adsorption maximum of sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds as measured by the Langmuir isotherm. *Water Research*. 37: 14. 3390-3400.
14. Ding, W., Meng, L., Yin, Y., Cai, Z., and Zheng, X. 2007. CO<sub>2</sub> emission in an intensively cultivated loam as affected by long-term application of organic manure and nitrogen fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2. 669-679.
15. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22: 2. 107-149.
16. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., and Böttger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 17: 19. 7843-7853.
17. Emami, S., Alikhani, H.A., Pourbabaei, A.A., Etesami, H., Motashare Zadeh, B., and Sarmadian, F. 2018. Improved growth and nutrient acquisition of wheat genotypes in phosphorus deficient soils by plant growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. *Soil Science and Plant Nutrition*. 64: 6. 719-727.
18. Garcia, C., Hernandez, T., and Costa, F. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 28: 1-2. 123-134.
19. Gee, G.W., and Bauder, J.W. 1986. Particle-size analysis. A. Klute edition. ASA and SSSA. Pp: 383-411.
20. Ghoularata, M., Raeisi, F., and Nadian, H.E. 2008. Salinity and phosphorus interactions on growth, yield and nutrient uptake by berseem clover (*trifolium alexandrinum*). *Iran. J. Field Crop Res*. 6: 1. 117-126.
21. Glickmann, E., and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2. 793-796.
22. Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., and Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research*. 167: 6. 358-363.
23. Jalali, M., and Jalali, M. 2016. Relation between various soil phosphorus extraction methods and sorption parameters in calcareous soils with different texture. *Science of the Total Environment*. 566: 1080-1093.

24. Karagöz, P., Rocha, I.V., Özkan, M., and Angelidaki, I. 2012. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresource Technology*. 104: 349-357.
25. Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Ahemad, M., and Oves, M. 2009. Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status. P 105-132. In: M. Khan, A. Zaidi, and J. Musarrat (eds.) *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer, Berlin, Heidelberg.
26. Kumar, A., Prakash, C.B., Brar, N.S., and Kumar, B. 2018. Potential of Vermicompost for Sustainable Crop Production and Soil Health Improvement in Different Cropping Systems. *Inter. J. Current Microbiol. Appl. Sci*. 7: 10. 1042-1055.
27. Kumar, V., and Singh, K. 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology*. 76: 2. 173-175.
28. Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., and Domínguez, J. 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere*. 72: 7. 1013-1019.
29. Liang, Y., Yang, Y., Yang, C., Shen, Q., Zhou, J., and Yang, L. 2003. Soil enzymatic activity and growth of rice and barley as influenced by organic manure in an anthropogenic soil. *Geoderma*. 115: 1-2. 149-160.
30. Liu, F.P., Liu, H.Q., Zhou, H.L., Dong, Z.G., Bai, X.H., Bai, P., and Qiao, J.J. 2014. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils*. 50: 6. 927-937.
31. Lu, H., Feng, Y., Wu, Y., Yang, L., and Shao, H. 2016. Phototrophic periphyton techniques combine phosphorous removal and recovery for sustainable salt-soil zone. *Science of the Total Environment*. 568: 838-844.
32. Lukashe, N.S., Mupambwa, H.A., Green, E., and Mnkeni, P.N.S. 2019. Inoculation of fly ash amended vermicompost with phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) and its influence on vermi-degradation, nutrient release and biological activity. *Waste Management*. 83: 14-22.
33. Mahdi, S., Hassan, G., Hussain, A., and Rasool, F. 2011. Phosphorus availability issue-its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. *Res. J. Agric. Sci*. 2: 1. 174-179.
34. Mander, C., Wakelin, S., Young, S., Condron, L., and O'Callaghan, M. 2012. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 44: 1. 93-101.
35. Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., and Grego, S. 2007. Evolution of soil organic matter changes using pyrolysis and metabolic indices: a comparison between organic and mineral fertilization. *Bioresource Technology*. 98: 13. 2495-2502.
36. Martens, D., Johanson, J., and Frankenberger, W. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Science*. 153: 1. 53-61.
37. McConnell, D.B., Shiralipour, A., and Smith, W.H. 1993. Compost application improves soil properties. *BioCycle*. 34: 4. 61-66.
38. Medina, E., Paredes, C., Bustamante, M., Moral, R., and Moreno-Caselles, J. 2012. Relationships between soil physico-chemical, chemical and biological properties in a soil amended with spent mushroom substrate. *Geoderma*. 173: 152-161.
39. Meena, B.P., Kumar, A., Lal, B., Meena, R.L., Shirale, A., Dotaniya, M., and Ram, A. 2019. Sustainability of Popcorn-Potato Cropping System Improves Due to Organic Manure Application and Its Effect on Soil Health. *Potato Research*. 62: 253. 1-27.

40. Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*. 43: 1. 51-56.
41. Mkhabela, M., and Warman, P. 2005. The influence of municipal solid waste compost on yield, soil phosphorus availability and uptake by two vegetable crops grown in a Pugwash sandy loam soil in Nova Scotia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 1. 57-67.
42. Mupambwa, H.A., Ravindran, B., and Mnkeni, P.N.S. 2016. Potential of effective micro-organisms and *Eisenia fetida* in enhancing vermi-degradation and nutrient release of fly ash incorporated into cow dung-paper waste mixture. *Waste Management*. 48: 165-173.
43. Nain, L., Rana, A., Joshi, M., Jadhav, S. D., Kumar, D., Shivay, Y., . . . Prasanna, R. 2010. Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. *Plant and Soil*. 331: 1-2. 217-230.
44. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., and Renella, G. 2011. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. P 215-243. In: E. Bünemann, A. Oberson, and E. Frossard (eds.) *Phosphorus in Action. Soil Biology*, vol 26. Springer, Berlin, Heidelberg.
45. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., and Marinari, S. 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils*. 48: 7. 743-762.
46. Navnage, N., Patle, P., and Ramteke, P. 2018. Dehydrogenase activity (DHA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. *Inter. J. Chem. Stud*. 6: 1. 456-458.
47. Nelson, D., and Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. P 539-579 In: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M.E. Sumner (eds). *Chemical and microbiological properties*. America.
48. Nelson, R. 1982. Carbonate and gypsum. P 181-197. In: S. Segoe and Rd, Madison (eds) *Chemical and microbiological properties*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
49. Öhlinger, R. 1996. Dehydrogenase activity with the substrate TTC. P 241-243. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds). *methods in soil biology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
50. Olsen, S.R. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (No. 939). US Department of Agriculture.
51. Onireti, O.O., Lin, C., and Qin, J. 2017. Combined effects of low-molecular-weight organic acids on mobilization of arsenic and lead from multi-contaminated soils. *Chemosphere*. 170: 161-168.
52. Page, A., Miller, R., and Keeney, D. 1982. *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy, No. 9. Soil Science Society of America, Madison, WI, 1159p.
53. Patten, C.L., and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol*. 42: 3. 207-220.
54. Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L., and Fernández, F. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Method*. 70: 1. 127-131.
55. Perucci, P. 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*. 14: 1. 54-60.
56. Pramanik, P., Ghosh, G., Ghosal, P., 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: 13. 2485-2494.

57. Premono, M.E., Moawad, A., and Vlek, P. 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesi. J. Crop Sci.* 11: 1. 13-2.
58. Ranamukhaarachchi, S.L. 2009. Soil dehydrogenase in a land degradation-rehabilitation gradient: observations from a savanna site with a wet/dry seasonal cycle. *Revista de Biologia Tropical.* 57: 1-2. 223-234.
59. Richardson, A.E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology.* 28: 9. 897-906.
60. Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften.* 91: 11. 552-555.
61. Ros, M., Hernandez, M.T., and Garcia, C. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry.* 35: 3. 463-469.
62. Rossini-Oliva, S., Mingorance, M., & Peña, A. 2017. Effect of two different composts on soil quality and on the growth of various plant species in a polymetallic acidic mine soil. *Chemosphere.* 168: 183-190.
63. Roy, S., Suchismita, C., and Mukherjee, S. 2007. Biological control of *Phytophthora* spp. with a novel indigenous *Pseudomonas* isolate. *J. Mycolopathol. Res.* 45: 1. 117-121.
64. Scervino, J.M., Mesa, M.P., Della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N.S., and Godeas, A. 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils.* 46: 7. 755-763.
65. Sergeeva, E., Liaimer, A., and Bergman, B. 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta.* 215: 2. 229-238.
66. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus.* 2: 1. 587.
67. Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 6. 778-781.
68. Tabatabai, M. 1982. Soil enzymes, P 903-947. In: R.H. Miller and D.R. Keeney (eds). *Methods of Soil Analysis.* Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
69. Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P.M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J.A., and Antoun, H. 2015. Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biology and Biochemistry.* 90: 1-9.
70. Taylor, J., Wilson, B., Mills, M.S., and Burns, R.G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry.* 34: 3. 387-401.
71. Tejada, M., and Gonzalez, J. 2006. The relationships between erodibility and erosion in a soil treated with two organic amendments. *Soil and Tillage Research.* 91: 1-2. 186-198.
72. Thangasamy, A., Gorrepati, K., Ahammed, T.S., Savalekar, R.K., Banerjee, K., and Chavan, M.K. 2018. Comparison of organic and conventional farming for onion yield, biochemical quality, soil organic carbon, and microbial population. *Archives of Agronomy and Soil Science.* 64: 2. 219-230.
73. van de Wiel, C.C., van der Linden, C.G., and Scholten, O.E. 2016. Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica.* 207: 1. 1-22.
74. Wei, Y., Wei, Z., Cao, Z., Zhao, Y., Zhao, X., Lu, Q., and Zhang, X. 2016. A regulating method for the distribution of phosphorus fractions based on environmental parameters related to the key phosphate-solubilizing bacteria during composting. *Bioresource Technology.* 211: 610-617.

75. Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., and Wei, Z. 2018. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 247: 190-199.
76. Zhang, J., Zeng, G., Chen, Y., Yu, M., Yu, Z., Li, H., and Huang, H. 2011. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*. 102: 3. 2950-2956.
77. Zhao, F., Zhang, Y., Dijkstra, F.A., Li, Z., Zhang, Y., Zhang, T., and Yang, L. 2019. Effects of amendments on phosphorous status in soils with different phosphorous levels. *Catena*. 172: 97-103.



## The effect of vermicompost enriched with phosphate solubilizing bacteria on phosphorus availability, pH and biological indices in a calcareous soil

F. Parastesh<sup>1</sup>, \*H.A. Alikhani<sup>2</sup>, H. Etesami<sup>3</sup> and M.R. Hasandokht<sup>4</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, University of Tehran, <sup>2</sup>Professor, Dept. of Soil Science, University of Tehran, <sup>3</sup>Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Tehran, <sup>4</sup>Professor, Dept. of Horticulture, University of Tehran

Received: 10.13.2018; Accepted: 03.05.2019

### Abstract

**Background and Objectives:** The shortage of phosphorus is one of the major problems of calcareous soils. One of the most effective and economical ways to increase phosphorus availability is through the addition of organic fertilizers. Vermicompost is the most desirable organic material and bio fertilizers, but the high usage of vermicompost to achieve optimal performance and the presence of organic insoluble phosphates are limited the use of vermicompost. One of the best way is that enriched vermicompost with plant growth-promoting bacteria, especially phosphate solubilizing bacteria.

**Materials and Methods:** Vermicompost sample was produced in Vermicompost Research Center of Tehran University. 18 isolates with ability of organic and inorganic phosphate solubilizing were isolated. Finally, two isolates 53 and 22 which had high solubilizing capacity of inorganic and organic insoluble phosphate were purified and identified. An incubation experiment was conducted in the Split plot design based on time to investigate the enrichment of vermicompost with phosphate solubilizing bacteria on available phosphorus, pH, microbial respiration, alkaline phosphatase and dehydrogenase enzyme activity in pots with 4 kg of soil consist of 5 treatments, including T<sub>1</sub>: vermicompost (6%) + B53; T<sub>2</sub>: vermicompost (6%) + B22; T<sub>3</sub>: positive control (Triple superphosphate fertilizer at 50 mg/kg); T<sub>4</sub>: vermicompost (6%) and T<sub>5</sub>: negative control (soil without vermicompost and bacteria), in 3 replicates. The treatments were incubated for 30 days and after incubation, the effect of treatments on phosphorus availability, pH and biological indices was measured.

**Results:** The results of the 16S rRNA gene sequence identified isolate 22 as *Serratia marcescens* with 99% similarity and isolate 53 as *Pseudomonas aeruginosa* with 98% similarity. the use of vermicompost enriched with phosphate solubilizing bacteria (T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>) increased available phosphorus (59.2% and 100%), microbial respiration (58% and 61%), Alkaline phosphatase activity (34 and 41%) and dehydrogenase activity (102.6% and 13.7%) significantly compared to control treatment (T<sub>4</sub>), but reduced pH (4.7% and 4.4%). According to the results, bacterial enriched treatment *Serratia marcescens* (T<sub>2</sub>) was more able to increase phosphorus and biological indices.

**Conclusion:** The application of vermicompost enriched with phosphate solubilizing bacteria (T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>) causes increase of the available phosphorus, microbial respiration, alkaline phosphatase enzyme activity and dehydrogenase activity and soil pH reduction. The treatment enriched with *Serratia marcescens* (T<sub>2</sub>) had more ability to increasing phosphorus availability and biological index. The results showed that vermicompost enrichment with phosphate solubilizing bacteria can be a suitable alternative for reducing the use of phosphate fertilizers and as a suitable strategy for better vermicompost management in calcareous soils in the future.

**Keywords:** Alkaline phosphatase enzyme, Dehydrogenase enzyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*

\* Corresponding Author; Email: halikhan@ut.ac.ir