نشریه زیست‌شناسی خاک / جلد 7 / شماره 1 / 1398

10.22092/sbj.2019.122559.137

اثر تنظیم pH کمپوست شهری بر غنی‌سازی آن با باکتری محرک رشد گیاه *Enterobacter cloacae*

بهمن خوشرو[1]، ناصر علی اصغرزاد و ارشد جودمند

دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ bahmankhoshru@yahoo.com

استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

دانشجوی دکترای زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز؛ jodmand.a@gmail.com

دریافت: 97/5/16 و پذیرش: 97/12/20

چکیده

برای افزایش کارایی و کیفیت کمپوست، غنی‌سازی عنصری و میکروبی از راهکارهای اساسی است. افزودن باکتری‌های مفید و محرک رشد گیاهان از جنبه‌های مختلف زیست‌محیطی مورد تأیید می‌باشد. از عوامل مؤثر بر مدت زندمانی باکتری در کمپوست، pH آن می‌باشد. در این تحقیق کمپوست شهری را با اتوکلاو استریل نموده و به دو بخش شامل الف- کمپوست با pH اولیه (5/6) و ب- کمپوست با pH تنظیم شده در هفت توسط کربنات کلسیم) تقسیم شد. مایه‌زنی با باکتری*Enterobacter cloacae* با جمعیت 10^9 CFU g^{-1} انجام گرفت. رطوبت کمپوست در حدود 40 درصد ظرفیت نگهداری آب تنظیم و نمونه‌ها در انکوباتور با دمای 26 درجه سلسیوس نگهداری شدند. شمارش جمعیت میکروبی و اندازه‌گیری pH کمپوست در زمان‌های 3، 15، 45، 75، 105، 135 ، 165 و 195روز پس از تلقیح انجام گردید. نتایج شمارش جمعیت میکروبی نشان داد که اثر pH در زنده‌مانی باکتری در کمپوست معنی‌دار بود ($p<0.01$). 45 روز پس از تلقیح، جمعیت میکروبی در کمپوست با pH تنظیم نشده به حدود 10^4 CFU g^{-1} تقلیل یافت در حالی که در کمپوست تنظیم شده از نظر pH، این تعداد برابر 10^9 CFU g^{-1} بود. علیرغم نوسانات جمعیت میکروبی در کمپوست تنظیم نشده، تا 135 روز بعد از تلقیح در هر دو کمپوست جمعیت 10^7 CFU g^{-1} حاکم بود. تعداد جمعیت باکتری در کمپوست تنظیم شده بعد از 165 روز و کمپوست بدون تنظیم بعد از 140 روز به جمعیت زیر حد استاندارد (10^6 CFU g^{-1}) رسیدند.

واژه‌های کلیدی: انتروباکتر، غنی‌سازی میکروبی، باکتری حل‌کننده فسفات، pH

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز- دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی خاک

مقدمه

مواد آلی خاک به عنوان یکی ازمهمترین عوامل مؤثر برحاصلخیزی خاک، تولید محصول، حفاظت از خاک در برابر تخریب، فرسایش و بیابان‌زایی، به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک شناخته شده است (پیکولو 1996). استفاده از اصلاح‌کننده‌های آلی مانند کمپوست‌ها، ابزار مؤثری برای بهبود خاکدانه‌سازی، ساختمان خاک، افزایش جمعیت و تنوع میکروبی، افزایش ظرفیت نگهداری آب و افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی در خاک می‌باشد (آزرمی و همکاران 2008). هدف از مصرف کودهای زیستی، تقویت حاصلخیزی و باروری خاک و تامین نیازهای غذایی بصورت سالم و غنی‌تر به دور از آلوده سازی محیط زیست است (فاجریا 2009). کمپوست محصول نهایی فرآیند تجزیه مواد آلی می‌باشد و به دلیل کاهش سطح آلاینده‌ها و داشتن جمعیت میکروبی و عناصر غذایی، در حال حاضر به عنوان یکی از بهترین کودهای آلی مطرح است (راویندران و همکاران، 2008). در تهیه کمپوست، چین از جمله کشورهایی است که از 4000 سال قبل، از مواد زاید گیاهی و انسانی کود آلی تهیه کرده‌اند و آن را برای حاصلخیزی خاک مورد استفاده قرار دادند. از آن به بعد استفاده از مواد زاید در کشورهای مختلف یک کار اساسی در کشاورزی محسوب می‌گردد. از میان دانشمندان متعددی که در کشورهای مختلف جهان بررسی‌های زیادی در زمینه کمپوست یا به طور کلی استفاده از پسماندهای آلی انجام داده‌اند، نام گوتاس برای اغلب متخصصان این رشته بسیار آشناست. او از سال 1950 تا 1952 پژوهش‌های دامنه‌داری در مورد کمپوست انجام داده که قابل توجه است.

در سال‌های اخیر از عملیات مکانیزه کردن تولید کمپوست در اروپا و آمریکا نتایج بسیار خوبی گرفته شده است که هم اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرد (ساین 2009). در ایران استفاده از مواد زاید گیاهی و انسانی از روزگاران گذشته برای کشاورزی و روستاییان بسیار معمول بوده است. در سال 1351 کارخانه کود گیاهی تهران تأسیس شد که متأسفانه به دلیل وابستگی برون‌مرزی خود تاکنون امکان استفاده از آن به طور مناسب وجود نداشته است. از آن پس تاکنون تعداد زیادی از کارخانه‌های تولید کمپوست در شهرهای مختلف ایران با ظرفیت‌های مناسب تاسیس شدند. کمپوست فرآورده حاصل از تجزیه بیولوژیک و کنترل شده ضایعات آلی است که تا حدی پایدار شده و به صورت بالقوه برای رشد گیاه در زمان استفاده به عنوان اصلاح‌کننده‌ی خاک مفید واقع می‌شود و به دلیل میزان بالای مواد آلی با ارزش است (ترکمانی و علیخانی 1387). یکی از راه‌های افزایش سودمندی کمپوست، غنی‌سازی آن با میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه است. در برخی از تحقیقات اخیراً افزودن باکتری‌های محرک رشد گیاه در کمپوست و بهبود کیفیت کودهای آلی مطالعه شده است (پادماواسیما و همکاران، 2008). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR[1]) از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی و در نهایت افزایش رشد گیاه می‌گردند (شکیلا و همکاران، 2017 ؛ یزدانی و همکاران، 2009 ؛ ساریخانی و همکاران، 2016). این باکتری‌ها ممکن است با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص باعث تحریک رشد گیاه شوند (لاواکوش و همکاران، 2014). از مکانیسم‌های مستقیم این باکتری‌ها برای افزایش رشد گیاه می‌توان به تثبیت نیتروژن، افزایش انحلال عناصر غذایی کم‌محلول مانند فسفر، افزایش فراهمی آهن از طریق تولید سیدروفور و تولید هورمون‌های رشد مانند اکسین اشاره نمود (خوشرو و همکاران 1394). تعدادی از باکتری‌های دی‌ازوتروف مثل جنس‌های *سودوموناس*، *بورخولدریا*، *آگروباکتریوم*، *ازتوباکتر* و *انتروباکتر* قادر به افزایش فسفات قابل جذب و تثبیت زیستی نیتروژن هستند (نلسون 2004). از طرف دیگر معدنی کردن فرم آلی فسفر توسط آنزیم‌های فسفاتاز صورت می‌گیرد که با تبدیل فرم آلی و غیر قابل جذب فسفر به یون‌های قابل جذب ارتو فسفات می‌باشد (ساریخانی و همکاران 1393).

کمپوست کردن بقایای آلی همراه با کانی فسفات ($Ca_{10}(PO_4)6F_2$) و جامعه‌ی میکروبی موجب انحلال فسفات‌های نامحلول و در نتیجه باعث افزایش فسفر قابل جذب برای گیاهان می‌شود. برخی از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در کنار تثبیت نیتروژن، با تولید اسیدهای آلی فسفر را نیز حل می‌کنند (کومار و نارولا 1999). لی و همکاران (2011) در آزمایشی اقدام به غنی‌سازی کمپوست با باکتری‌های محرک رشد گیاه شامل *ازوتوباکتر*، *سودوموناس* و *انتروباکتر* کردند که باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای کمپوست شد. با افزودن این باکتری‌ها به کمپوست، محتوی نیتروژن 1/75% و فسفر کمپوست 1/16 % افزایش یافت. همچنین باکتری‌های افزوده شده به کمپوست، توان تولید هورمون‌های اکسین و جیبرلین را نیز داشتند که این ویژگی نیز به سایر خواص مفید کمپوست اضافه گردید. لذا می‌توان با هزینه اندک، اقدام به افزایش ارزش تغذیه‌ای کمپوست کرد. در تعدادی

[1]. Plant growth-promoting rhizobacteria

از آزمایش‌ها با استفاده از میکروارگانیسم‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن، مقدار نیتروژن در ورمی‌کمپوست افزایش یافت و تلقیح میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در ورمی‌کمپوست با حضور کانی حاوی فسفات و حتی بدون وجود آن، باعث افزایش فسفر در ورمی‌کمپوست شد. این در حالی بود که کاربرد مستقیم کانی فسفات در افزایش فسفر قابل جذب ورمی‌کمپوست و به ویژه در خاک‌های طبیعی به دلیل حلالیت و قابلیت جذب بسیار اندک کانی فسفات چندان مؤثر نبود (کومار و سینگ 2001). بژامپ و همکاران (2006) گزارش کردند جمعیت باکتری‌های توانا در تثبیت نیتروژن مولکولی استفاده شده برای غنی‌سازی بقایای آلی در ورمی‌کمپوست، حتی پس از افزودن کرم‌های خاکی نیز کاهش نمی‌یابد بر عکس جمعیت میکروبی در محصول نهایی افزایش می‌یابد. لذا می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها در غنی‌سازی ورمی کمپوست استفاده کرد.

مواد زاید شهری با سرعت بیشتری در حال افزایش هستند. سالانه مقادیر زیادی زباله جامد شهری تولید می‌شود. سیستم کمپوست‌سازی یک سیستم خوب برای تثبیت و هوموسی شدن[1] سریع مواد آلی می‌باشد (اندی 1995، دسای 1997). مقادیر زیادی کود گیاهی تهیه شده از ضایعات شهری موجود است. اما بیشتر آنها مقدار نیتروژن و فسفر پایینی دارند و منابع ضعیفی از نظر تغذیه‌ای برای رشد گیاه هستند (کاپور و همکاران ، 1983). یکی از راه‌های ممکن برای افزایش محتوای مواد مغذی محصول کمپوست، تکنیک غنی‌سازی میکروبی با تثبیت‌کنندگان نیتروژن، حل‌کنندگان فسفات و تجزیه کنندگان سلولز است (مانا و همکاران 1997). گزارش شده که تلقیح و کاربرد باکتری‌های محرک رشد در کمپوست مقدار نیتروژن آن را تا 24 - 30 % و فسفر را 1 - 5 % افزایش داد (گائور و ساین 1993). کمپوست شهری که در کارخانه‌های کودسازی مکانیکی تولید می‌شود معمولاً دارای مواد مغذی اندکی بوده و بنابراین ارزش اقتصادی تولید آن‌ها بسیار پایین است. برای بهبود کیفیت و محتوای مواد مغذی آن، غنی‌سازی کمپوست ضروری است (تلاشگر 1985). اصلاح pH و افزودن یک یا چند گونه باکتری که دارای ویژگی‌های محرک رشد گیاه باشند، می‌تواند در غنی‌سازی این کود آلی نقش مؤثری ایفا کند. در این میان بررسی ماندگاری این میکروب‌های مفید در بستر کمپوست مورد استفاده زمینه تحقیق مناسبی است. بررسی ماندگاری این باکتری در کمپوست مورد مطالعه و همچنین اثر تنظیم pH بر مدت بقای آن، از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی کمپوست

کمپوست مورد استفاده در این تحقیق حاصل فرآوری زباله شهری با دستگاه VRS ساخت کشور سوئیس می‌باشد. این دستگاه ابتدا با اعمال خلاء اقدام به آبگیری مواد اولیه نموده و سپس با اعمال حرارت و آسیاب آنها به مواد شبه کمپوست تبدیل می‌کند. این کمپوست ضمن دارا بودن مواد آلی زیاد، عناصر معدنی نیز دارد و pH آن در حدود 5/5 می‌باشد. همچنین به علت تیمار حرارتی، فاقد میکروارگانیسم‌ها و دارای رطوبت اندک می‌باشد. کمپوست مورد آزمایش پس از آسیاب شدن و عبور از الک 0/5 میلی‌متری و تعیین برخی از ویژگی‌های آن (جدول 2)، به دوقسمت تقسیم شده (1- کمپوست با pH اولیه (5/6) و 2- کمپوست با pH تنظیم شده روی هفت با کربنات کلسیم) و در فشار 1/2 اتمسفر و دمای ^{o}C 121 استریل شده (به مدت 1 ساعت) و آماده تلقیح میکروبی شد.

تنظیم pH اولیه کمپوست

بعد از آماده شدن کمپوست و قبل از تلقیح باکتری، کمپوست مورد نظر به دو قسمت تقسیم شد که قسمتی با pH اولیه و قسمت دیگر با تنظیم pH آن روی هفت آماده تلقیح میکروبی گشت. برای تنظیم pH از کربنات کلسیم پودری استفاده گردید. برای تعیین مقدار کربنات کلسیم لازم، نمونه‌های 10 گرمی از کمپوست آماده شده و هر کدام از نمونه‌ها با مقادیر 0، 0/5، 1، 1/5و 2 گرم از کربنات کلسیم پودری مخلوط گردید و در ادامه با تهیه سوسپانسون 1:10 (کمپوست-آب مقطر) و تکان دادن به مدت 0/5 ساعت (با سرعت 160 rpm) و ایجاد تعادل، اقدام به اندازه‌گیری pH سوسپانسیون گردید و سپس نمودار تغییرات pH کمپوست به ازای مقدار کربنات کلسیم افزوده شده ترسیم گردید (شکل1) و سپس از روی نمودار، مقدارکربنات کلسیم لازم برای تنظیم pH بر روی هفت مشخص گردید (مکلین 1982).

بررسی pH کمپوست مایه‌زنی شده با گذشت زمان

مایه‌زنی کمپوست‌های تنظیم شده و نشده با باکتری انجام گرفت و سپس pH آنها در زمان‌های 3، 15، 45، 75، 105، 135، 165 و 195روز اندازه‌گیری گردید.

آماده سازی باکتری

در این پژوهش باکتری محرک رشد گیاه (*Enterobacter cloacae*) از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز دریافت شد. بر اساس

[1] Humification

مطالعات قبلی (خوشرو و همکاران، 1396؛ ساریخانی و همکاران، 2018) باکتری *Enterobacter cloacae* دارای خصوصیات محرک رشد گیاه از جمله توان انحلال فسفات و تثبیت بیولوژیک نیتروژن می‌باشد. برخی از ویژگی‌های محرک رشدی این باکتری در جدول یک آورده شده است.

جدول 1- برخی از خصوصیات باکتری مورد استفاده در این آزمایش

باکتری	نوع گرم	تثبیت نیتروژن	انحلال فسفر نامحلول ($mg\ l^{-1}$)	آزادسازی پتاسیم ($mg\ l^{-1}$)	اکسین ($mg\ l^{-1}$)
Enterobacter cloacae	منفی	قادر به رشد در محیط عاری از نیتروژن	510	13	3/17

به منظور تکثیر باکتری مورد نظر، از محیط کشت مایع NB[1] استفاده شد، از کلنی خالص باکتری در محیط کشت مایع NB تلقیح و در دمای 28°C در شیکر - انکوباتور قرار داده شد. پس از رسیدن باکتری به جمعیت مناسب، اقدام به تلقیح آن در کمپوست گردید (بر طبق منحنی رشد باکتری، 18 ساعت پس از تلقیح باکتری در محیط مایع NB، جمعیت آن به 10^9 CFU ml^{-1} می‌رسد).

تلقیح باکتری به کمپوست

پس از آماده شدن نمونه‌های کمپوست (دو نمونه 30 گرمی شامل کمپوست اصلاح شده و بدون اصلاح pH)، اقدام به تلقیح باکتری *E. cloacae* با جمعیت مشخص در کمپوست گردید. برای این کار پس از گذشت 18 ساعت از کشت شبانه باکتری و رسیدن آن به OD[2] مورد نظر (OD=1)، تلقیح باکتری انجام شد. ظرفیت نگهداری آب (WHC[3]) برای کمپوست تعیین گردید و به میزان 40% WHC تلقیح سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 CFU g^{-1} انجام گرفت (87/58 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری با جمعیت ذکر شده در 30 گرم حامل تلقیح شد) (ونگادارمانا و جاشوتان 2012). کمپوست‌ها در دمای 25 °C (دمای اتاق) و در تاریکی نگهداری شده و هر هفته یک بار هوادهی آنها صورت گرفت (درب ظروف حاوی کمپوست‌ها در شرایط استریل باز شده و به مدت پنج دقیقه هوادهی صورت می‌گرفت).

شمارش تعداد باکتری و بررسی زنده‌مانی آن در کمپوست با گذشت زمان

برای شمارش جمعیت میکروبی از روش شمارش کلنی در پلیت استفاده شد. ابتدا سری رقت‌ها تا 10^9 از کمپوست تهیه شد و از رقت‌های پایانی (10^9 و 10^8، 10^7، 10^6 ، 10^5) در دو تکرار به میزان 100 میکرولیتر بر روی محیط جامد NA انتقال داده شد (آلن و همکاران 2004). شمارش جمعیتی نیز در زمان‌های 3، 15، 45، 75، 105، 135، 165 و 195روز پس از تلقیح صورت گرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های کمپوست

نتایج آزمایش نشان داد که پودر کردن کمپوست تأثیر معنی‌داری در ظرفیت نگهداری آب دارد به طوری که ظرفیت نگهداری آب (WHC) توسط کمپوست در حالت بدون آسیاب برابر 180/16% (100گرم کمپوست، ظرفیت نگهداری 180/16 گرم آب را داشت) و در حالت آسیاب شده برابر 218/95% بود لذا می‌توان گفت که پودر کردن کمپوست از نظر ماندگاری باکتری مورد نظر و همچنین تأمین بخشی از آب مورد نیاز گیاه می‌تواند اهمیت داشته باشد (نییس و همکاران 1991).

ویژگی‌های کمپوست مورد استفاده در جدول دو آورده شده است.

---

1. Nutrient Broth
2. Optical density
3. Water-holding capacity

جدول 2- برخی از ویژگی‌های کمپوست مورد استفاده در آزمایش

pH اولیه	EC (dsm^{-1})	مواد آلی (%)	ازت (%)	فسفر (%)	پتاسیم (%)	C/N	ظرفیت نگهداری آب (%)	درصد رطوبت وزنی (%)
5/6	18/07	64/63	3/23	0/24	1/99	12/5	218/95	5/22

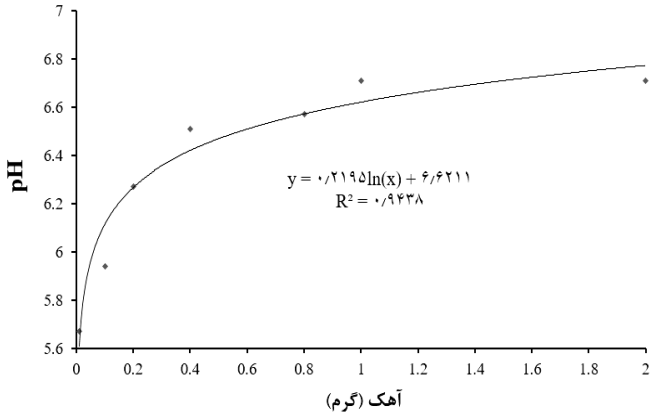
تعیین مقدار کربنات کلسیم مورد نیاز برای تنظیم pH کمپوست

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر مقادیر کربنات کلسیم افزوده شده بر pH کمپوست در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). با افزایش مقدار کربنات کلسیم تا یک گرم، pH کمپوست افزایش یافت ولی بعد از آن ثابت شده و تغییری در روند pH مشاهده نگردید (شکل1). لذا با توجه به نتایج بدست آمده برای تنظیم pH کمپوست، کربنات کلسیم مصرفی با مقدار یک گرم به ازای هر 10 گرم کمپوست مقدار مناسبی است. از آنجایی که محیط‌های خنثی یا نزدیک به خنثی عموماً برای رشد میکروارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد لذا pH بسترهای میکروبی را غالباً در حدود هفت تنظیم می‌کنند (گلس و همکاران 1992).

جدول 3- تجزیه واریانس اثر مقادیر کربنات کلسیم افزوده شده بر pH کمپوست

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
کربنات کلسیم	6	80/518**
خطا	6	0/002

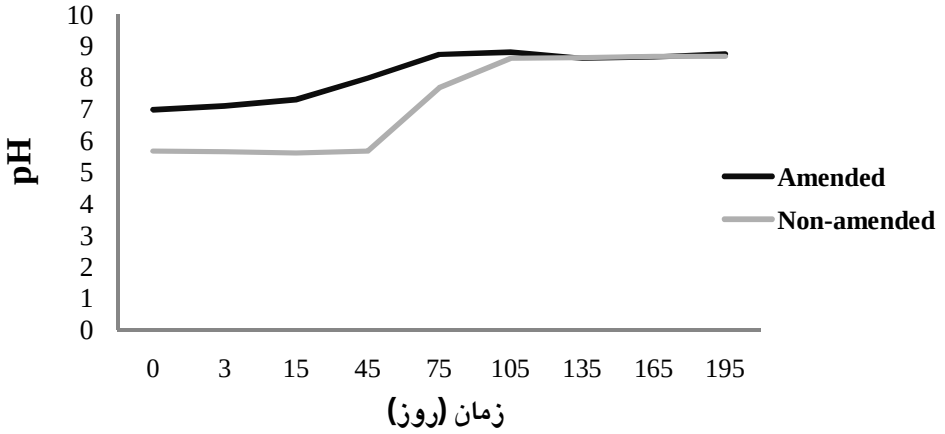
** معنی‌دار در سطح 1 درصد ($P<0/01$)



شکل 1- رابطه بین تغییرات pH کمپوست با مقدار کربنات کلسیم مصرفی (g $CaCO_3$/10g compost)

تغییرات pH کمپوست در طول زمان

با وجود اینکه دو بستر از نظر pH اولیه باهم تفاوت داشتند ولی بعد از 105 روز، به یک pH ثابت (8/6) نزدیک شدند. pH هر دو کمپوست با گذشت زمان رو به افزایش گذاشت و این افزایش در کمپوست بدون تنظیم pH دارای شیب تندتری بود (شکل 2).

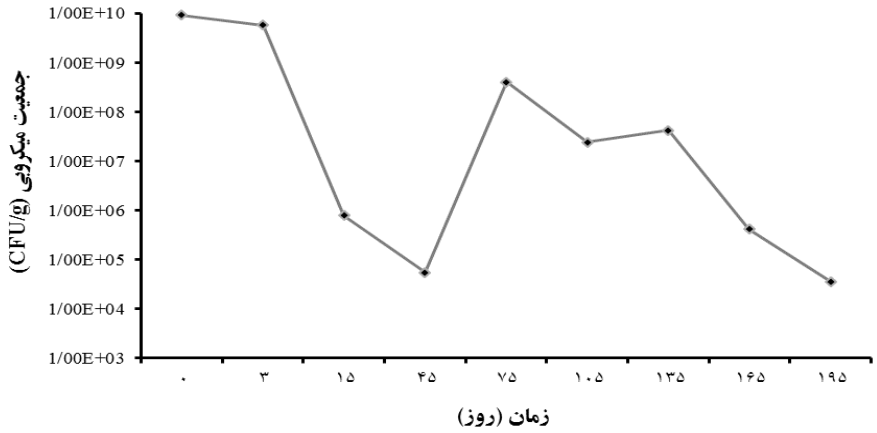


شکل 2- تغییرات pH کمپوست (تنظیم شده و نشده) با گذشت زمان

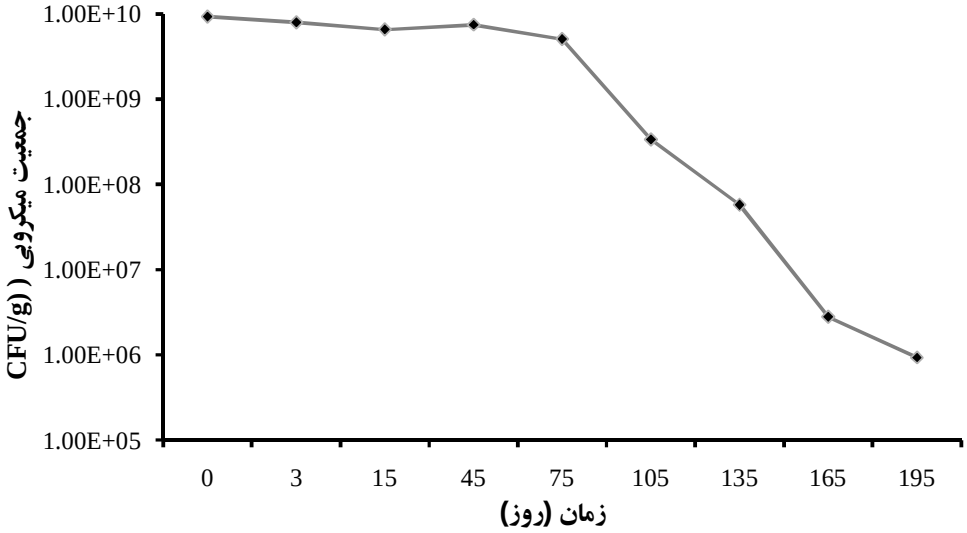
رشد و بقا میکروارگانیسم‌ها تا حد زیادی تحت تأثیر pH محیط قرار می‌گیرد. میکروارگانیسم‌ها از نظر pH بهینه رشد با هم تفاوت دارند. هر گونه‌ی میکروبی قابلیت رشد در دامنه خاصی از pH را دارد که این دامنه می‌تواند وسیع یا محدود باشد اما بهترین رشد در محدوده‌ای باریک به نام pH بهینه میسر خواهد بود. این pHخاص نیازمند تطابق متقابل میکروارگانیسم‌ها با محیط طبیعی‌شان می‌باشد (گلس و همکاران 1992). باکتری *انتروباکتر*، میله‌ای، گرم منفی، اکسیداز منفی، نیترات ریداکتاز مثبت و متحرک بوده و محدوده pH رشد آن بین 6-8 (بهینه هفت) و محدوده دمایی 20-40 درجه سلسیوس (بهینه 30 درجه) است (وانگ و همکاران 1989). مهمترین عامل تاثیرگذار بر جمعیت میکروبی کمپوست تغییرات pH می‌باشد (وانگ و همکاران 2018). فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها منجر به تولید مواد زاید می‌شود، مثلاً در اثر تجزیه قندها اسیدهای مختلفی تولید می‌شوند و یا در اثر تجزیه پروتئین‌ها، ترکیبات قلیایی تولید خواهد شد. با توجه به خصوصیات کمپوست (جدول1) مشاهده می‌شود که این کمپوست دارای نیتروژن بالا و در نتیجه نسبت C/N پایین بوده و به احتمال زیاد سرعت آمونیفیکاسیون نیز بیشتر خواهد بود. در این فرآیند که آمونیاک تولید می‌شود منجر به افزایش pH محیط می‌گردد. همچنین با توجه به نوع مواد اولیه بکار رفته در تولید این کمپوست، غلظت قندهای محلول در آن کم می‌باشد لذا احتمال وقوع تخمیر قندها و تولید اسید آلی کمتر است. بنابراین افزایشpH با گذشت زمان قابل توجیه است (کومبت و همکاران 1995).

شمارش و بررسی زنده‌مانی جمعیت فعال در کمپوست

نتایج تجزیه واریانس تغییرات جمعیت میکروبی در دو کمپوست در طول زمان نشان داد که اثر pH در استقرار و زنده‌مانی باکتری *E. cloacae* در کمپوست کاملاً معنی‌دار بوده و تنظیم pH کمپوست با کربنات کلسیم بر روی زندمانی باکتری اثر به سزایی دارد (جدول 4). با توجه به نتایج شمارش میکروبی در کمپوست تنظیم نشده مشخص می‌شود که باکتری برای زنده ماندن در این کمپوست دچار نوعی تنش بوده و سعی بر آن دارد که خود را با محیط کمپوست وفق دهد. این امر در روز سوم پس از تلقیح به وضوح مشاهده می‌گردد به طوری که جمعیت باکتری در این کمپوست شروع به کاهش گذاشته و 45 روز پس از تلقیح به پایین‌ترین مقدار خود می‌رسد (10^4). بعد از آن باکتری به دلیل بهینه شدن pH، سازگاری بیشتری با کمپوست یافته و جمعیتش رو به افزایش گذاشته و در روز 75ام دوباره جمعیت خود را بازیابی می‌کند (10^8). در ادامه نیز شاهد کاهش جمعیت میکروبی با گذشت زمان هستیم (شکل 3). در کمپوست تنظیم شده از نظر pH، روند تغییرات جمعیت باکتری، یکنواختی بیشتری دارد و به نظر می‌رسد آشفتگی تغییرات جمعیتی که در کمپوست بدون کربنات کلسیم دیده می‌شود، در کمپوست تنظیم شده وجود ندارد و این نشان دهنده تنش پایین باکتری در کمپوست دارای کربنات کلسیم هست (شکل 4).



شکل 3- زنده‌مانی جمعیت باکتری در کمپوست میکروبی با pH اولیه



شکل 4- زنده‌مانی جمعیت باکتری در کمپوست میکروبی با pH تنظیم شده روی هفت

جدول 4- تجزیه واریانس زنده‌مانی باکتری‌ها در کمپوست تنظیم شده و نشده از نظر pH در طول زمان

منابع تغییرات	درجه آزادی		میانگین مربعات	
	کمپوست تنظیم نشده	کمپوست تنظیم شده	کمپوست تنظیم نشده	کمپوست تنظیم شده
زمان	7	7	$2/3\times10^{25**}$	$5/4\times10^{25**}$
خطا	7	7	$4/4\times10^{17}$	$6/6\times10^{17}$

** معنی‌دار در سطح 1 درصد (P<0/01)

وانگ و همکاران (2018) گزارش کردند که pH مهمترین عامل برای تعیین تعداد و تنوع میکروبی در فرآیند کمپوست‌سازی می‌باشد. به طوری که در pHهای پایین جمعیت باکتری‌های *Lactobacillus* غالب بوده و با افزایش جمعیت این باکتری‌ها در طول زمان، به دلیل تولید اسید توسط این باکتری‌ها، pH به میزان بیشتری کاهش می‌یابد. با افزایش pH کمپوست، جمعیت میکروبی غالب مربوط به گونه‌های *Bacillus* و *Enterobacter* بوده

و افزایش دما در این حالت می‌تواند به غالبیت جمعیت این باکتری‌ها کمک کند. افزایش pH، باعث تولید آمونیاک در کمپوست شده و در ادامه غالبیت با جمعیت میکروبی مقاوم به آمونیاک خواهد بود. لذا اثر pH در تنوع و ماندگاری جمعیت میکروبی موجود در کمپوست تعیین‌کننده است.

نتیجه‌گیری کلی

این آزمایش با هدف بررسی اصلاح pH کمپوست شهری بر ماندگاری باکتری محرک رشد گیاه انجام شد. این آزمایش به مدت 195 روز به طول انجامید که در این مدت تغییرات pH و جمعیت میکروبی فعال در کمپوست غنی شده با باکتری *E. cloacae* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج شمارش جمعیت باکتری در کمپوست در طول زمان نشان داد که اصلاح pH کمپوست دارای اثر معنی‌داری در ماندگاری و حفظ جمعیت میکروبی می‌باشد. به طوری که باکتری مورد نظر در کمپوست فاقد کربنات کلسیم، دارای تغییرات جمعیتی زیادی بوده و روند ثابتی نداشت ولی با افزودن کربنات کلسیم و تنظیم pH، اثرات مثبت در آن ظاهر شده و جمعیت باکتری مورد نظر دارای نوسان جمعیتی کم بوده و زنده‌مانی باکتری نیز در این تیمار نسبت به تیمار بدون تنظیم، افزایش داشته است. با توجه به اینکه کمپوست غنی‌سازی شده با باکتری، پس از تولید تا تاریخ انقضاء (که در این آزمایش تا حدود 4/5 ماه می‌باشد) باید هر لحظه قابل استفاده برای مصرف‌کننده باشد ولی مشاهده گردید که کمپوست اصلاح نشده با آهک در محدوده 10 -60 روز دارای حداقل جمعیت باکتری بوده و عملاً قابل استفاده نبوده در حالی‌که کمپوست اصلاح شده، در همین محدوده زمانی دارای جمعیت قابل قبولی می‌باشد. بررسی تغییرات pH کمپوست در طول زمان نشان داد که در هر دو حالت (اصلاح و عدم اصلاح) بعد از 105 روز pH هر دو نمونه به یک میزان رسیده است (8/6) ولی تغییرات جمعیت و ماندگاری باکتری در دو نمونه کاملاً متفاوت بود و اثر مثبت تنظیم pH کاملاً مشاهده گردید. بالا بودن pH در کمپوست اصلاح شده، تا روز 90 به دلیل افزودن آهک بوده که در همین زمان pH کمپوست اصلاح نشده پایین‌تر بوده ولی از روز 45 به بعد احتمالاً به دلیل وقوع فرآیندهای هیدرولیز از جمله آمونیفیکاسیون، pH آن به تدریج افزایش پیدا کرده است. همچنین به نظر می‌رسد با گذشت زمان با کاهش غلظت اکسیژن در محیط و احتمال وقوع فرآیندهای احیا، pH روند افزایشی پیدا کرده است. با توجه به نتایج حاصله می‌توان اظهار داشت که تنظیم اولیه pH با افزودن کربنات کلسیم (آهک) به مقدار توصیه شده ضرورت خواهد داشت تا بتواند بقای باکتری در کمپوست را تضمین کند. با در نظر گرفتن آهنگ کاهشی در جمعیت باکتری با گذشت زمان که امر طبیعی است، می‌توان چنین عنوان نمود که کارائی کمپوست مورد آزمایش (پس از تنظیم pH) در نگهداشت باکتری حداکثر 4/5-4 ماه می‌باشد. لذا اگر کمپوست تولید شده، با باکتری مورد نظر مایه‌زنی (غنی‌سازی) شود، تا حدود 4/5 ماه کارایی خوبی خواهد داشت و علاوه بر خواص خود کمپوست، اثرات مثبت باکتری نیز در آن مهیا خواهد بود.

فهرست منابع:

1. Aliasgharzad, N. 1997. Soil Microbiology and Biochemistry (Farsi translation). First Edition. Tabriz University Press.
2. Allen, M. J., Edberg, S.C. and Reasoner, D. J. 2004. Heterotrophic plate count bacteria what is their significance in drinking water. International Journal of Food Microbiology, 92: 265-274.
3. Adani, F., Genevini, P.L. and Tambone, F. 1995. A new index of organic matter stability. Compost science & utilization 3: 25-37.
4. Azarmi, R., Sharifi, Z. and Satari, M.R. 2008. Effect of vermicompost on growth, yield and nutrition status of tomato (*Lycopersicum esculentum*). Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 1797-1802.
5. Beauchamp, C.J., Levesque, G., Prevost, D. and Chalifour, F.P. 2006. Isolation of free-living dinitrogen fixing bacteria and their activity in compost containing de-inking paper sludge. Bioresource Technology 97: 1002–1011.

6. Combet-Blanc, Y., Kalamba, K.K. and Kergoat, P.Y. 1995. Effect of pH on *Bacillus thermoamylovorans* growth and glucose fermentation. Applied and Environmental Microbiology 61: 651–659
7. Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and molecular biology reviews 61: 47-64.
8. Edwards, C.A., Domínguez, J. and Arancon, N.Q. 2004. The influence of vermicomposts on plant growth and pest incidence. In Shakir, S.H. and W.Z.A. Mikhail (Eds.). Soil Zoology for Sustainable Development in the 21st Century, Self-Publisher; Cairo, Egypt, PP.397-420.
9. Fageria, N.K. 2009.The use of nutrients in crop plants.CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.USA. New york.
10. Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. and Doyle, M.P. 1992. Fate of *E. coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented sausage. Applied and Envionment Microbiology 58:2513-2516.
11. Heitkamp, M.A., Franklin, W. and Cferniglia, C.E. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Applied and Environment Microbiology 54:2549-2555.
12. Kapoor, K.K., Yadav, K.S., Singh, D.P., Mishra, M.M. and Tauro, P. 1983. Enrichment of compost by *Azotobacter* and phosphate solubilising microorganisms. Agricultural Wastes 5: 125-133.
13. Khoshru, B., Sarikhani, M.R. and Aliasgharzad, N. 2017. Inoculation Effect of Some Phosphatic Microbial Fertilizers on Nutritional Indices of *Zea mays* L. Journal of Water and Soil Science 25: 13-26
14. Khoshru, B., Sarikhani, M.R., Aliasgharzad, N. and Zare, P. 2015. Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin, Applied Soil Research 3: 39-52
15. Kumar, V. and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergance of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*. Biology and Fertility of Soils 28: 301-305.
16. Kumar, V. and Singh, K.P. 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. Bioresource Technology 76: 173-175.
17. Lavakush Yadav, J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K., and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecological engineering 62: 123–128
18. Li, L.M., Ding, X.L., Qian, K., Ding Y.Y. and Yin, Z.J. 2011. Effect of microbial consortia on the composting of pig manure. Journal of Animal and Veterinary Advances 10: 1738-1742.
19. Mclean, E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. pp. 199-224. In: A.L Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
20. Naeth, M.A., Bailey, A.W., Chanasyk, D.S. and Pluth, D.J. 1991. Water holding capacity of litter and soil organic matter in mixed prairie and fescue grassland ecosystems of Alberta. Journal of Range management 13-17.
21. Nelson, L.M. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. Plant Management Network.
22. Piccolo, A. 1996. Humus and soil conservation. In: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 225–264.
23. Ravindran, B., Dinesh, S.L., 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.

24. Sarikhani, M.R., Oustan, S., Ebrahimi, M. and Aliasgharzad, N. 2018. Isolation and identification of potassium releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European Journal of Soil Science.
25. Sarikhani, M.R., Khoshru, B. and Oustan, S. 2016. Efficiency of Some Bacterial Strains in Potassium Release from Mica and Phosphate Solubilization under in-vitro Conditions. Geomicrobiology Journal 33: 832-838.
26. Sarikhani, M.R., Malboobi, M.A., and Ebrahimi, M. 2014. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of bacteria and phosphate solubilizing genes, Mechanism and genetics of phosphate solubilization. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 76-110.
27. Shakeela, S., Padder, S.A. and Bhat, Z.A. 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant *Picrorhiza Kurroa*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6: p.157.
28. Singh, K. 2009. Microbial and Nutritional Analysis of Vermicompost, Aerobic and Anaerobic Compost. 40 CP Honors Project for Master in Environmental Engineering; Griffith University, Brisbane, Australia; (Supervisors: Dr. Rajiv K. Sinha & Dr. Sunil Heart)
29. Talashilkar, S.C. 1985. Effect of microbial culture (*Azotobacter chroococcum*) on humification and enrichment of mechanized compost. Indian journal of agricultural chemistry 22: 193-195.
30. Turkamani, N. and Alikhani, H. 2008. Comparison of vermicompost from bovine, sheep and poultry fertilizers in different moisture content. Third Congress on Recycling and Use of Renewable Organic Resources in Agriculture. Esfahan. Iran.
31. Vengadaramana, A. and Jashothan, P.T.J. 2012. Effects of organic fertilizers on the water holding capacity of soil in different terrains of Jaffna peninsula in Sri Lanka. Journal of Natural Product and Plant Resources 2: 500-503.
32. Yazdani, M., Bahmanyar, M.A., Pirdashti, H. and Esmaili, M.A. 2009. Effect of Phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and components of Corn (*Zea mays* L.). World Academy of Science, Engineering and Technology 37: 90-92.
33. Wang, P.C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K. and Ohtake, H. 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 55:1665-1669.
34. Wang, X., Selvam, A., Lau, S.S. and Wong, J.W. 2018. Influence of lime and struvite on microbial community succession and odour emission during food waste composting. Bioresource technology 247: 652-659.

The Effect of pH Adjustment of Municipal Compost on its Enrichment with Plant Growth Promoting Bacterium *"Enterobacter Cloacae"*

B. Khoshru[1], N. Aliasgharzad, and A. Jodmand
PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran;
E-mail: bahmankhoshru@yahoo.com
Professor of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran; E-mail: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir
PhD Student of Biology, Faculty of Science, University. of Tabriz Iran;
E-mail: jodmand.a@gmail.com
Received: August, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

Elemental and microbial enrichment of compost are basic solutions to increase its quality. The addition of beneficial bacteria and plant growth promoters are confirmed by various environmental aspects. The pH of compost is a critical factor affecting bacterial persistence. In this study, the municipal compost was sterilized and divided into two parts: compost with initial pH (5.6) and compost with pH adjusted to 7 by calcium carbonate addition. Incubation of compost with *Enterobacter cloacae* was performed with 10^9 CFU g^{-1} population. The moisture content of the compost adjusted to about 40% of the water holding capacity and the samples were kept in an incubator at 26 °C. The microbial counting and pH measurement were accomplished at 3, 15, 45, 75, 105, 135, 165 and 195 days after inoculation. The results of microbial counting showed that the effect of pH on bacterial viability in the compost was significant ($p<0.01$). Forty-five days after inoculation, the microbial count in non-amended compost declined to about 10^4 CFU g^{-1} while in the amended compost it was 10^9 CFU g^{-1}. Regardless of the fluctuations of microbial population in non-amended compost, the bacterial population was 10^7 CFU g^{-1} in both divisions of compost after 135 days' incubation. The number of bacteria in amended and non-amended composts was below the standard limit (10^6 CFU g^{-1}) after 165 and 140 days incubation, respectively.

Keywords: Compost, microbial enrichment, phosphate solubilizing bacteria, pH

[1.] Corresponding author: Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran