نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۹، ص. ۱۴۳-۱۲۹

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 1, March-April 2020, p. 129-143

پیامد باکتری‌های *باسیلوس* در آزادسازی فسفر از پسماند جامد کارخانه روغن‌کشی در یک خاک آهکی

الهه هاشم‌پور[۱]- محمدباقر فرهنگی[۲]*- نسرین قربان‌زاده [۳]- محمود فاضلی سنگانی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۹

چکیده

پسماندها دارای مواد آلی بالا و عناصر غذایی از جمله فسفر هستند. این پژوهش با هدف بررسی فسفر قابل دسترس خاک پس از افزودن پسماند جامد کارخانه روغن‌کشی به خاک انجام شد. باکتری *باسیلوس* بومی با توان انحلال فسفر جداسازی شد. خاک با سطوح مختلف پسماند (۲ و ۴ درصد) مخلوط شد و باکتری‌های *باسیلوس* بومی و *باسیلوس پرسیکوس* (10^6 یاخته در گرم مخلوط) به آنها مایه‌زنی شد. سطوح صفر پسماند و مایه‌زنی نشده با باکتری هم به عنوان تیمارهای شاهده در آزمایش گنجانده شد. خاک‌ها در دمای آزمایشگاه و رطوبت ۰/۷ FC به مدت ۶ ماه انکوباسیون شده و در زمان‌های صفر، ۲، ۷، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶، ۸۶، ۱۱۶، ۱۴۶ و ۱۷۶ روز از آنها نمونه‌برداری شد. ویژگی‌هایی مانند pH، کربن آلی (OC)، تنفس پایه میکروبی (BR)، فسفر قابل دسترس (P_{ava}) و فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. پیامد پسماند، باکتری، زمان و برهم‌کنش آن‌ها بر بیشتر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). پسماند سبب افزایش OC، P_{ava} و BR شد و pH را کاهش داد. مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها سبب کاهش OC، P_{ava} و BR شد. بالاترین مقدار P_{ava} در خاک‌های دارای ۴٪ پسماند مایه‌زنی نشده با باکتری‌ها (۱۴۲/۷ mg Kg^{-1}) به دست آمد اما در بین خاک‌های دارای ۲٪ پسماند، خاک مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس* بومی، P_{ava} بالاتری داشت. در کل، کاربرد پسماند جامد کارخانه روغن‌کشی سبب بهبود ویژگی‌های زیستی خاک و افزایش فسفر قابل دسترس شد.

واژگان کلیدی: آنزیم فسفاتاز، باکتری‌های حل‌کننده فسفر، تنفس میکروبی، کربن آلی

مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای رشد و نمو گیاهان است. کمبود فسفر به طور گسترده در بسیاری از مناطق دنیا به ویژه زمین‌های خشک و نیمه‌خشک به دلیل مقادیر بالای کربنات کلسیم گزارش شده است (۲۴). در واقع در بیشتر خاک‌های کشاورزی در پی کاربرد پیوسته‌ی کودهای شیمیایی، ذخیره‌ی فسفر وجود دارد، اما تثبیت شدن و رسوب آن سبب کمبود فسفر در فاز محلول شده و رشد گیاهان محدود می‌شود (۱۹). فسفر آلی نقش مهمی در تغذیه گیاهان به ویژه در خاک‌های آهکی با توان تثبیت بالای فسفر دارد. فسفر آلی خاک از مواد آلی ناهمگنی تشکیل شده است و شکل‌های مختلف آن پیامدهای متفاوتی بر حاصلخیزی و کیفیت خاک دارند (۱۲). رهاسازی فسفر از بقایای آلی، تبادل فسفر جذب شده با اکسی‌آنیون‌ها، کمپلکس شدن کلسیم و افزایش حلالیت فسفات های کلسیم، دینامیک فسفر در خاک‌های آهکی تیمار شده با پسماندهای آلی را تحت تأثیر قرار داده و از این راه سبب افزایش قابلیت دسترسی فسفر در خاک می‌شوند (۳۵).

ترکیبی از عوامل محیطی و زیستی در سرعت معدنی‌شدن فسفر آلی در خاک نقش دارند. ریزجانداران خاک عامل اصلی در فروزینگی بقایای آلی هستند. به دیگر سخن، یکی از روش‌های تامین فسفر مورد نیاز گیاهان بهره‌گیری از توان زیستی خاک و استفاده از ریز جانداران حل‌کننده فسفر است (۱۸). استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفر برای افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی خاک، تثبیت زیستی نیتروژن، فروزینگی ترکیب‌های آلی پیچیده و کنترل بیماری‌های گیاهی نظر پژوهش‌گران را به خود جلب کرده است (۳۲). سویه‌هایی

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: Email: M.farhangi@guilan.ac.ir)
DOI: 10.22067/jsw.v34i1.80353

از جنس *باسیلوس*[1]، *سودوموناس*[2] و *رایزوبیوم*[3] از مهم‌ترین حل کنندگان فسفر هستند (۴).

باکتری‌های حل‌کننده فسفر قابلیت دسترسی فسفر را از راه تراوش اسیدهای آلی و تولید آنزیم‌های فسفاتاز افزایش می‌دهند، که به‌ترتیب سبب انحلال فسفر معدنی و معدنی شدن فسفر آلی شده و تغذیه فسفری گیاه بهبود می‌یابد (۱۲). باکتری‌های *باسیلوس* به دلیل توانایی تولید آنزیم‌هایی مانند پروتئاز، آمیلاز و فسفاتاز، در فروزینگی مواد آلی در خاک کارآمد بوده و نقش بسیار مهمی در چرخه‌های بیوشیمیایی دارند (۳۰). این باکتری‌ها چون توان ساخت اندواسپور دارند در برابر تنش‌های محیطی پایدار بوده و شرایط نامساعد را تحمل می‌کنند، بنابراین در سیستم‌های کشاورزی بسیار مهم‌اند (۱۱).

افزایش مصرف کودهای شیمیایی فسفر در چند سال گذشته، نه تنها عملکرد محصولات کشاورزی را چندان افزایش نداده، بلکه در مواردی سبب بر هم خوردن تعادل عناصر غذایی و کاهش محصول نیز شده است. با آشکار شدن پیامدهای نامناسب استفاده‌ی بی‌رویه از این کودها، گرایش به کاربرد کودهای آلی و روش‌های زیستی بیشتر شده است (۱۰). ضمن این‌که توجه به کشاورزی پایدار و راه‌کارهای زیستی برای کاهش آلودگی‌های زیست محیطی در این زمینه نقش برجسته‌ای داشته است (۳۴). در این راستا استفاده از بقایای آلی دارای فسفر مانند پسماندها و باکتری‌های حل‌کننده فسفر راه‌گشا هستند.

کاربرد پسماند جامد کارخانه‌های روغن خوراکی، افزون بر کمک به دفع این فراورده فرعی در صنعت تولید روغن، می‌تواند سبب بازگشت عناصر غذایی خارج شده از خاک در فرایند کشاورزی شود (۲۰). اصلاح خاک با پسماندهای کارخانه روغن‌کشی در دوره‌های کوتاه و میان مدت سبب افزایش کربن آلی، نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم قابل دسترس خاک و افزایش پایداری خاک‌دانه‌های آن می شود (۲۵). پسماندهای جامد کارخانه روغن‌کشی معمولاً اسیدی بوده و دارای کربن و پتاسیم زیاد، کلسیم، منیزیم و آهن قابل‌توجه و مقدار فسفر و نیتروژن متوسط می‌باشند (۸). بنابراین این پژوهش با فرض این‌که پسماند جامد کارخانه روغن‌کشی دارای مواد آلی و فسفر قابل توجه است و ورود آن به خاک موجب تحریک رشد میکروبی و آزاد کردن فسفر آن می‌شود و با هدف: ۱- بررسی سطح فسفر قابل دسترس در خاک پس از افزودن پسماند جامد مایه‌زنی شده با باکتری‌های *باسیلوس* به خاک و ۲- مقایسه توانایی باکتری *باسیلوس* بومی خاک با باکتری *باسیلوس پرسیکوس* در آزادسازی فسفر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک و پسماند

یک نمونه خاک مرتعی (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری) از منطقه لوشان واقع در استان گیلان نمونه‌برداری شد. خاک به آزمایشگاه منتقل و پس از هوا خشک شدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک شامل بافت، pH و قابلیت هدایت الکتریکی، کربن آلی، کربنات‌های کلسیم معادل، فسفر قابل دسترس و فسفر کل (۹) اندازه‌گیری شد.

پسماند جامد از کارخانه روغن‌کشی زیتون گنجه رودبار واقع در استان گیلان تهیه شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، خشک کردن و کوبیدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. در این کارخانه بیشتر تصفیه روغن زیتون انجام می‌شود نه روغن‌گیری و پسماند از حوضچه تصفیه کارخانه تهیه شد. ویژگی‌های پسماند شامل کربن به روش سوختن در کوره (۲۲)، فسفر کل، کربنات‌های کلسیم معادل، قابلیت هدایت الکتریکی و pH (در سوسپانسیون ۱ به ۱۰) اندازه‌گیری شد (۹).

جداسازی *باسیلوس* حل کننده فسفر از خاک

جداسازی باکتری *باسیلوس* در آزمایش‌گاه بیولوژی خاک دانشگاه گیلان انجام شد. برای این کار از همان خاک مرتعی سوسپانسیونی در آب مقطر سترون تهیه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. با این کار ریخت رویشی باکتری‌ها از بین رفته و تنها اسپورها زنده می‌مانند. از این سوسپانسیون پس از خنک شدن در محیط کشت نوترینت آگار، کشت به صورت پخش در پلیت انجام شد. چند نمونه از باکتری‌های رشد کرده در سطح پتری با ویژگی تیپیک کلنی *باسیلوس* به روش خطی جداسازی شدند و با آزمایش‌هایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، اسپور، آزمون کاتالاز و تحرک (۱۷) *باسیلوس* بودن آنها تأیید شد.

برای سنجش توان حل‌کنندگی فسفر، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *باسیلوس*های جدا شده با روش قطره‌گذاری در محیط جامد اسپربر[4] (شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم $CaCl_2$، ۰/۲۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۲/۵ گرم تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)_2$) و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. قطر منطقه شفاف (هاله) احاطه شده اطراف کلونی‌ها و همچنین قطر

1- *Bacillus*
2- *Pseudomonas*
3- *Rhizobium*
4- Sperber

کلونی پس از ۲، ۴ و ۷ روز در سه تکرار اندازه‌گیری شد. شاخص انحلال فسفر[1] (PSI) به عنوان نسبت قطر هاله (mm) به قطر کلونی (mm) محاسبه شد (۱۷) و باکتری که دارای بالاترین نسبت بود برای ادامه آزمایش انتخاب شد. باکتری شاخص *باسیلوس*[2] نیز از گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان تهیه شد و توان حل‌کنندگی فسفر آن نیز سنجیده شد.

آزمایش انکوباسیون خاک

برای هر تیمار مقدار ۶۰۰ گرم خاک در یک سینی با سطوح مختلف پسماند (صفر، ۲ و ۴ درصد) به طور کامل مخلوط شد. پس از آماده شدن مخلوط خاک-پسماند، غلظت مشخصی (10^6 سلول در هر گرم مخلوط) از زادمایه‌ی باکتری‌ها (*باسیلوس* بومی جدا شده از خاک و *باسیلوس پرسیکوس*) در حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مخلوط‌ها مایه‌زنی شد. سپس رطوبت مخلوط‌ها به حدود ۷۰ درصد گنجایش زراعی خاک رسانده شد. پس از آن مخلوط‌ها در ظروف پلاستیکی ریخته شده و در دمای آزمایشگاه (حدود ۲۵ درجه سلسیوس) به مدت ۶ ماه انکوباسیون شدند. در طول دوره انکوباسیون تلاش شد تا رطوبت آمیخته‌ها با روش وزنی در حدود ۷۰ درصد گنجایش زراعی حفظ شود. در زمان‌های صفر، ۲، ۷، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶، ۸۶، ۱۱۶، ۱۴۶ و ۱۷۶ روز از مخلوط‌ها نمونه‌برداری شد. در نمونه‌ها pH، کربن آلی و غلظت فسفر قابل جذب به روش بیان شده در بالا و تنفس پایه میکروبی (۳) و فعالیت آنزیم فسفاتاز به روش رنگ سنجی و به کمک سوبسترای پارانیتروفنل فسفات (۳۳) اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل پسماند جامد در سه سطح (صفر، ۲ و ۴ درصد)، مایه‌زنی با *باسیلوس* در سه سطح (بدون مایه زنی، مایه‌زنی با *باسیلوس* بومی و مایه‌زنی شده با *باسیلوس پرسیکوس*) و زمان نمونه‌برداری در ۱۱ سطح (صفر، ۲، ۷، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶، ۸۶، ۱۱۶، ۱۴۶ و ۱۷۶ روز) بودند. داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.4 آنالیز شدند و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

در جدول ۱ ویژگی‌های خاک و پسماند مورد مطالعه آمده است. خاک مورد استفاده در این پژوهش دارای بافت لوم، pH کمی قلیایی، فسفر قابل دسترس متوسط و کربن آلی کم بود. ضمن این‌که کربنات کلسیم معادل خاک بالا بود که امکان تثبیت فسفر در خاک را افزایش می‌دهد. پسماند به کار رفته در این پژوهش نیز دارای مقادیری قابل توجه از کربن آلی و فسفر کل بود و امکان استفاده از آن در کشاورزی طبق استاندارد محیط‌زیست برای استفاده از پسماندها و پساب‌ها وجود دارد (۷). در پژوهش‌ها (۸) گزارش شده که pH پسماندها معمولاً اسیدی است. اما از آنجا که پسماند استفاده شده در این پژوهش پسماند ناشی از حوضچه تصفیه روغن بود، بنابراین ممکن است به دلیل فرایندهای تصفیه روغن زیتون pH آن بالاتر از ۷ شده باشد.

در جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس پیامد سطوح پسماند، باکتری و زمان انکوباسیون بر ویژگی‌های خاک آمده است. پیامد پسماند، باکتری، زمان و برهم‌کنش آنها بر pH، تنفس پایه و کربن آلی معنی دار بود ($p<0/01$). اما پیامد پسماند بر فعالیت آنزیم فسفاتاز و پیامد باکتری بر غلظت فسفر قابل دسترس معنی‌دار نبود ($p>0/05$).

پیامد برهم‌کنش پسماند در باکتری بر ویژگی‌های مورد مطالعه

مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف پسماند در باکتری بر pH، تنفس پایه میکروبی، کربن آلی و فسفر قابل دسترس خاک در شکل ۱ نشان داده شده است.

pH

در شکل ۱-الف دو روند مشخص در تغییرات pH دیده می‌شود: نخست این‌که افزودن پسماند به خاک موجب کاهش pH آن شده است و دوم این‌که باکتری *باسیلوس* بومی جدا شده از خاک در مقایسه با باکتری *باسیلوس پرسیکوس* در هر ۳ سطح پسماند pH را بیشتر کاهش داده است که البته تفاوت pH در خاک دارای این دو باکتری، تنها در خاک بدون پسماند چشم‌گیر بود ($p<0/05$). شارما و همکاران (۳۰) گزارش کردند که باکتری‌های حل کننده فسفر از طریق تولید و فروزینگی انواع اسیدهای آلی، pH خاک را کاهش می دهند و از این راه سبب افزایش دسترسی به این عنصر می‌شوند.

تنفس پایه میکروبی و کربن آلی

بالاترین مقدار میانگین تنفس پایه میکروبی در تیمارهای دارای ۴٪ پسماند بود که نسبت به تیمارهای دارای ۲٪ پسماند ۱/۲۴ برابر و نسبت به تیمارهای بدون پسماند ۱/۷۳ برابر افزایش یافته بود (شکل ۱-ب).

1- Phosphorus Solubilizing Index
2- *Bacillus persicus*

جدول ۱- برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک و پسماند جامد مورد مطالعه

Table 1- Some chemical characteristics of the studied soil and solid waste

	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	فسفر کل Total phosphorus	کربن آلی Organic carbon	کربنات‌های کلسیم معادل Calcium carbonates equivalent	قابلیت هدایت الکتریکی Electrical conductivity (EC)	اسیدیته pH
	$mg.Kg^{-1}$	---------- $g.100g^{-1}$ ----------			$dS.m^{-1}$	-
خاک (Soil)	14.6	0.11	0.6	36	0.2	7.80
پسماند (Waste)	-	1.55	37	23.3	1.34	7.70

جدول ۲- تجزیه واریانس پیامد سطوح پسماند، باکتری و زمان انکوباسیون بر ویژگی‌های خاک

Table 2- Analysis of variance for soil properties as affected by waste (W), bacteria (B) and incubation time (T)

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	اسیدیته pH	کربن آلی Organic carbon	فسفر Phosphorus	تنفس پایه Basal respiration	فسفاتاز Phosphatase
پسماند (Waste)	2	2.89^{**}	88.09^{**}	238725^{**}	0.947^{**}	0.88^{ns}
باکتری (Bacteria)	2	0.13^{**}	0.50^{**}	548.78^{ns}	0.039^{*}	3.24^{**}
زمان (Time)	10	1.51^{**}	11.66^{**}	40078.14^{**}	0.217^{**}	103.82^{**}
پسماند× باکتری (Waste×Bacteria)	4	0.05^{**}	0.33^{**}	2344.32^{*}	0.028^{*}	2.53^{**}
پسماند× زمان (Wate×Time)	20	0.05^{**}	0.74^{**}	8893.37^{**}	0.074^{**}	1.57^{**}
باکتری× زمان (Bacteria×Time)	20	0.06^{**}	0.42^{**}	1294.19^{**}	0.033^{**}	0.94^{**}
پسماند× باکتری× زمان (Waste×Bacteria×Time)	40	0.02^{**}	0.20^{**}	1017.01^{**}	0.019^{**}	1.06^{**}
خطا (Error)	198	0.01	0.10	198.39	0.010	0.39

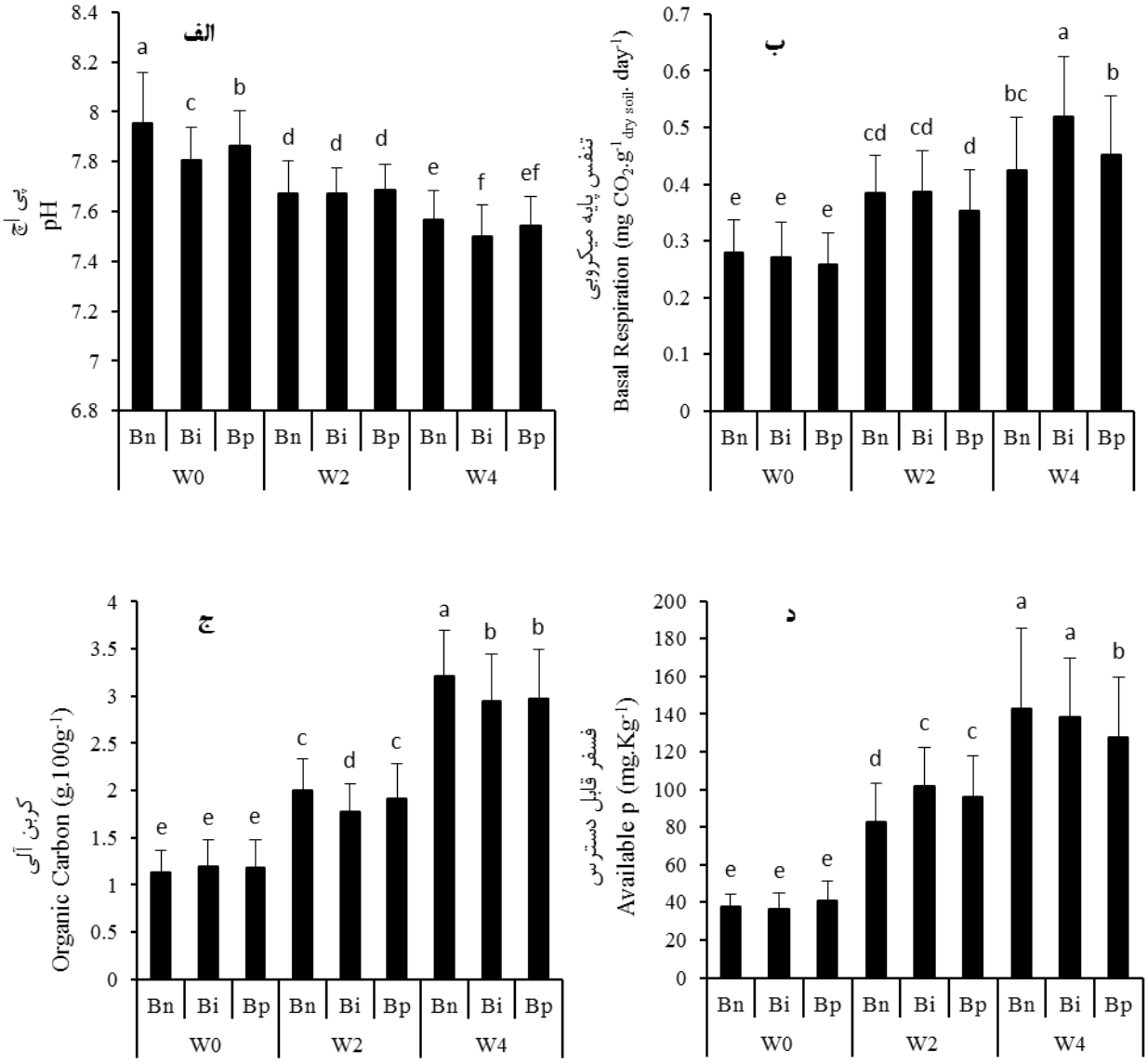
اعداد نشان‌دار شده با *و** به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد معنی‌دار هستند و ^{ns} بیانگر معنی‌دار نبودن در سطح احتمال ۵ درصد است

Values marked by * and ** are significant at 5% and 1% probability levels, respectively, and values marked by ^{ns}, are not significant at 5% probability level.

کم‌ترین مقدار تنفس هم در تیمار بدون پسماند مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس پرسیکوس* بود که با سایر تیمارهای بدون پسماند تفاوت آماری چشم‌گیری نداشت (P>۰/۰۵).

نتیجه به دست آمده در این پژوهش با یافته‌های مکی و همکاران (۲۱) هم‌سو است. آنها گزارش کردند که افزودن پسماندهای آلی سبب افزایش فعالیت تنفسی خاک می‌شود. سی‌یرا و همکاران (۳۱) افزایش میانگین تنفس پایه در خاک‌ها را پس از افزودن پساب کارخانه زیتون گزارش نمودند و علت آن را افزایش فعالیت و رشد ریزجانداران میکروبی بومی و هم‌چنین توانایی ریزجانداران در استفاده و فروزینگی ترکیب‌های آلی قابل دسترس مختلف پساب گزارش کردند. کریستن و همکاران (۱۴) نیز تغییرات ماده آلی خاک را در ارتباط با دی‌اکسیدکربن اندازه‌گیری نمودند و مشخص شد که رابطه-ی مثبت چشم‌گیری بین افزایش ماده آلی و بالا رفتن تنفس خاک و کربن زیست توده میکروبی وجود دارد.

در شکل ۱-ج مقایسه میانگین پیامد بر هم‌کنش سطوح مختلف پسماند در باکتری بر کربن آلی خاک نشان داده شده است. با افزایش درصد پسماند از صفر به ۴ درصد، کربن آلی خاک افزایش یافته است که این امر ناشی از مقدار بالای ماده آلی پسماند است. بالاترین مقدار کربن آلی در تیمار با پسماند ۴ درصد و بدون باکتری (۳/۲۱) بود که با تیمارهای دارای *باسیلوس* بومی (۲/۹۵) و *باسیلوس پرسیکوس* (۲/۹۶) تفاوت آماری چشم‌گیری داشت (p<۰/۰۵). اگرچه تفاوت کربن آلی در این دو تیمار با یکدیگر چشم‌گیر نبود (P>۰/۰۵). کمترین مقدار کربن آلی نیز در تیمار بدون باکتری و بدون پسماند (۱/۱۳) دیده شد در حالی‌که بین ۳ سطح باکتری در تیمار بدون پسماند تفاوت چشم‌گیری وجود نداشت (P>۰/۰۵).



شکل ۱- پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف پسماند در باکتری بر الف) pH و ب) تنفس پایه میکروبی، ج) کربن آلی و د) فسفر قابل دسترس خاک.

W0، W2، W4 به ترتیب بیانگر سطوح صفر، ۲ و ۴ درصد پسماند و Bn، Bi و Bp به ترتیب بیانگر خاک مایه‌زنی نشده، و مایه زنی شده با *باسیلوس بومی* و *باسیلوس پرسیکوس* است. حروف متفاوت در روی ستون‌ها در هر شکل نشان دهنده بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا انحراف از معیار می‌باشند (n=3).

Figure 1- Effect of solid waste and bacteria interactions on A) pH, B) basal microbial respiration, C) organic carbon and D) available phosphorus in soil

W0, W2, and W4 denote 0, 2 and 4% solid waste levels respectively, and Bn, Bi, and Bp denote uninoculated soil and soil inoculated with native *Bacilus* sp. and *Bacillus persicus* respectively. In each figure, different letters on columns indicate significant differences at $p< 0.05$ and error bars are deviations from the criteria (n=3).

به نظر می‌رسد افزودن پسماند به خاک سبب تحریک جامعه میکروبی خاک شده است و با افزایش تجزیه پسماند مواد آلی خاک افزایش یافته است. مکی و همکاران (۲۱) نیز گزارش کردند که افزودن پسماندهای آلی به طور قابل ملاحظه‌ای محتوای ماده آلی خاک را افزایش می‌دهد. اما مایه‌زنی *باسیلوس*ها به خاک در هر سطح پسماند سبب کاهش کربن آلی خاک شد. به نظر می‌رسد مایه‌زنی خاک با *باسیلوس* سبب اُریبی جامعه میکروبی شده و باتوجه به تراوش مواد آنتی میکروبی توسط *باسیلوس*ها به ویژه مواد ضد قارچی، دامنه فعالیت قارچ‌ها کم شده و در پیِ آن تجزیه ماده آلی توسط قارچ‌ها که هتروتروف‌های توان‌مندی هستند، کم شده است. تولید آنتی‌بیوتیک توسط باکتری‌های مفید افزاینده رشد گیاهان مانند *باسیلوس*ها و *سودوموناس*ها و حتی کنترل بیماری‌های گیاهی توسط آنها از دیرباز توسط پژوهش‌گران زیادی شناسایی شده است (۱۵، ۶). در سوی دیگر، باکتری‌ها افزون بر تولید آنتی‌بیوتیک با تولید سیدروفور هم

سبب جلوگیری از رشد قارچ‌ها می‌شوند که گفته شده این سازوکار در بازداری رشد قارچ از تولید آنتی‌بیوتیک هم نیرومندتر است. چاکرابورتی و همکاران (۵) تولید سیدروفور توسط *باسیلوس مگاتریوم* را عامل کنترل بیماری‌های قارچی در ریشه گیاه چای معرفی کردند.

فسفر قابل دسترس و فسفاتاز

در شکل ۱-د مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف پسماند و باکتری بر فسفر قابل دسترس خاک نشان داده شده است. با افزایش سطح پسماند جامد، مقدار فسفر قابل دسترس خاک افزایش معنی‌داری یافت به طوری که بیشترین مقدار فسفر خاک مربوط به تیمار دارای پسماند ۴ درصد و بدون مایه‌زنی باکتری بود که تفاوت آماری چشم‌گیری با تیمار دارای *باسیلوس* بومی خاک نداشت ($P>0/05$). با افزایش درصد پسماند از صفر به ۴ مقدار فسفر قابل دسترس افزایش یافت که این امر می‌تواند ناشی از مقدار بالای فسفر موجود در پسماند باشد.

با بررسی پیامد باکتری‌ها در هر سطح پسماند دیده شد که در خاک بدون پسماند باکتری *باسیلوس پرسیکوس* در رهاسازی فسفر کارآمد بوده، اگر چه اندازه‌ی فسفری که این باکتری آزاد کرده در مقایسه با *باسیلوس* بومی جدا شده از خاک و خاک مایه‌زنی نشده با باکتری (شاهد) تفاوت آماری چشم‌گیری نداشته است. در خاک بدون پسماند بیشتر فسفر قابل دسترس اندازه‌گیری شده از منابع معدنی فراهم شده است و از آن‌جا که زیستگاه اصلی باکتری *باسیلوس پرسیکوس* آب‌های شور الیگوتروف[1] است، انتظار می‌رود که در تغذیه از منابع معدنی فسفات کارآمد بوده و در شرایط طبیعی سخت (کم بودن غذا) موفق‌تر باشد. با افزایش سطح پسمانداز صفر به ۲٪، *باسیلوس* بومی جدا شده از خاک کارآمدتر بود، اگرچه فسفر آزاد شده توسط آن تفاوت آماری چشم‌گیری با فسفر آزاد شده توسط *باسیلوس پرسیکوس* نداشته است ($P>0/05$). این یافته سازگاری باکتری‌های بومی خاک به استفاده از مواد آلی در شرایط افزودن بقایای آلی به خاک را نشان می‌دهد که معمولاً در خاک‌های با شرایط مناسب مقدار بقایای آلی خاک پیرامون همین ۲٪ است که در این پژوهش از پسماند تامین شده است. با افزایش سطح پسماند از ۲ به ۴ درصد، که تا حدی در خاک‌ها غیرعادی است، هر دو باکتری از دامنه رقابت خارج شده و خاکی که در آن باکتری مایه‌زنی نشده و تعادل شمار ریزجانداران آن به هم نخورده و احتمالا قارچ‌ها کنترل کننده هستند، در رهاسازی فسفر کارآمدتر بوده است. این امر اهمیت همکاری باکتری‌ها در فروزینگی بقایای آلی را نشان می‌دهد که در منابع به آن مکرر اشاره شده است (۲۹ و ۳۶). چشم‌گیر نبودن تفاوت مقدار فسفر در خاک دارای پسماند ۴٪ و بدون مایه‌زنی باکتری و همین خاک که با با *باسیلوس* بومی مایه‌زنی شده هم می‌تواند تاییدی بر توانمندتر بودن باکتری‌های بومی در فروزینگی بقایای آلی افزوده شده به خاک باشد. به هر روی، در خاک دارای ۲ و ۴ درصد پسماند، میانگین مقدار فسفر قابل دسترس به ترتیب حدود ۲/۴ و ۳/۵ برابر خاک شاهد بود.

رگنی و همکاران (۲۳) پیامد مثبت کاربرد ضایعات جامد کارخانه روغن‌کشی زیتون بر فعالیت رویشی و بازدهی میوه زیتون را وابسته به معدنی شدن آن و در نتیجه آزادسازی مواد غذایی مانند پتاسیم، فسفر، کلسیم، منیزیم و آهن دانستند. ریزجانداران خاک‌زی با استفاده از منابع کربنی ترکیب‌های آلی دارای فسفر، موجب معدنی شدن فسفر آلی می‌شوند (۲۷).

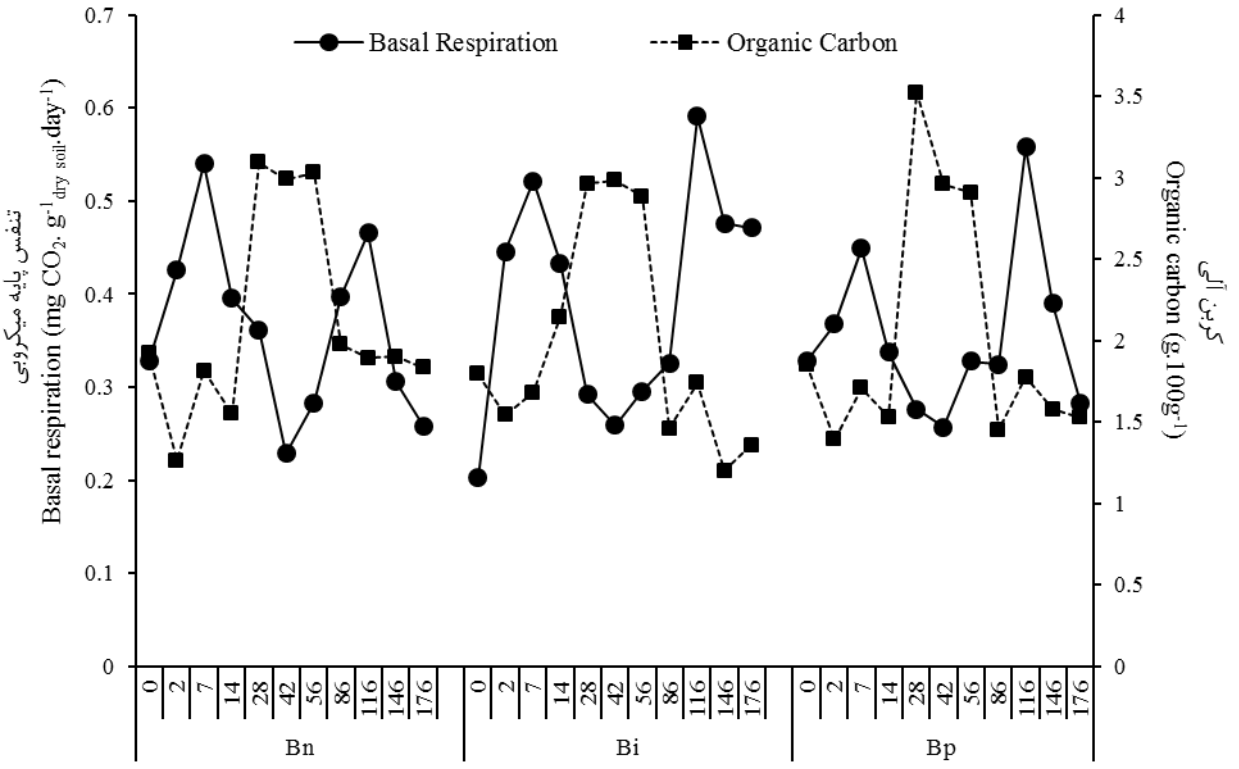
اگرچه فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک نقش مهمی را در معدنی شدن فسفر آلی بازی می‌کند اما در این پژوهش تیمارها تاثیر زیادی بر فعالیت این آنزیم نداشتند. یعنی این‌که تفاوت بین تیمارها در مقدار آنزیم فسفاتاز معنی‌دار نبود. به هر روی، بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فسفاتاز ($mg\ PNP.g\ Soil^{-1}h^{-1}$ ۱۶/۲۱) در تیمار با پسماند صفر و مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس پرسیکوس* به دست آمد و کمترین مقدار فعالیت این آنزیم ($mg\ PNP.g\ Soil^{-1}h^{-1}$ ۱۵/۳۶) در تیمار بدون باکتری و بدون پسماند (شاهد) دیده شد. در نتیجه می‌شود گفت باکتری‌های حل‌کننده فسفات نقش مهمی در تغذیه فسفر خاک با افزایش میزان دسترسی گیاهان از طریق آزادسازی از منابع آلی و معدنی فسفرخاک توسط فرآیندهای انحلال و معدنی شدن دارند (۱۳).

پیامد برهم‌کنش باکتری‌ها در زمان بر ویژگی‌های مورد مطالعه

تنفس پایه میکروبی و کربن آلی

در شکل ۲ پیامد برهم‌کنش باکتری‌های مورد مطالعه در زمان های مختلف بر مقدار تنفس پایه و کربن آلی نشان داده شده است. مقایسه میانگین پیامد باکتری در زمان بر کربن آلی خاک نوسان زیادی نداشت. نمودارها در هر سه تیمار زنگوله‌ای شکل بود و بالاترین مقدار کربن در هر سه تیمار در روز ۲۸ به دست آمد و تا ماه دوم (روز ۵۶) ادامه یافت. کمترین مقدار کربن خاک هم در روز ۱۴۶ تیمار با باکتری *باسیلوس* بومی به دست آمد. بالاترین مقدار تنفس پایه خاک در روز ۱۱۶ و در تیمار مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس* بومی دیده شد که با روز ۷ همان سطح باکتری و تیمار شاهد و روز ۱۱۶ تیمار مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس پرسیکوس* تفاوت آماری چشم‌گیری نداشت ($P>0/05$). در نتیجه می‌توان گفت که بین سطوح باکتری در روند تنفس پایه میکروبی تفاوتی وجود ندارد.

1- Oligotrophic



شکل ۲- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش باکتری در زمان (روز) بر تنفس پایه میکروبی و کربن آلی خاک

Bn، Bi و Bp به ترتیب بیانگر خاک مایه‌زنی نشده، و مایه‌زنی شده با *باسیلوس بومی* و *باسیلوس پرسیکوس* است.

Figure 2- Effect of bacteria and time interactions on microbial basal respiration and organic carbon in soil

Bn, Bi, and Bp denote uninoculated soil and soil inoculated with native *Bacilus* sp. and *Bacillus persicus* respectively.

کمترین مقدار تنفس پایه نیز مربوط به روز صفر تیمار مایه‌زنی شده با *باسیلوس* بومی بود که بازهم با بسیاری از تیمارها تفاوت آماری چشم‌گیری نداشت (P>۰/۰۵). به طور کلی میانگین تنفس میکروبی تیمارها به ترتیب در خاک شاهد، مایه‌زنی شده با *باسیلوس بومی* و *پرسیکوس*، ۰/۳۶، ۰/۳۹ و ۰/۳۵ میلی‌گرم دی اکسید کربن در گرم خاک خشک در روز بود.

فسفر قابل دسترس و فسفاتاز

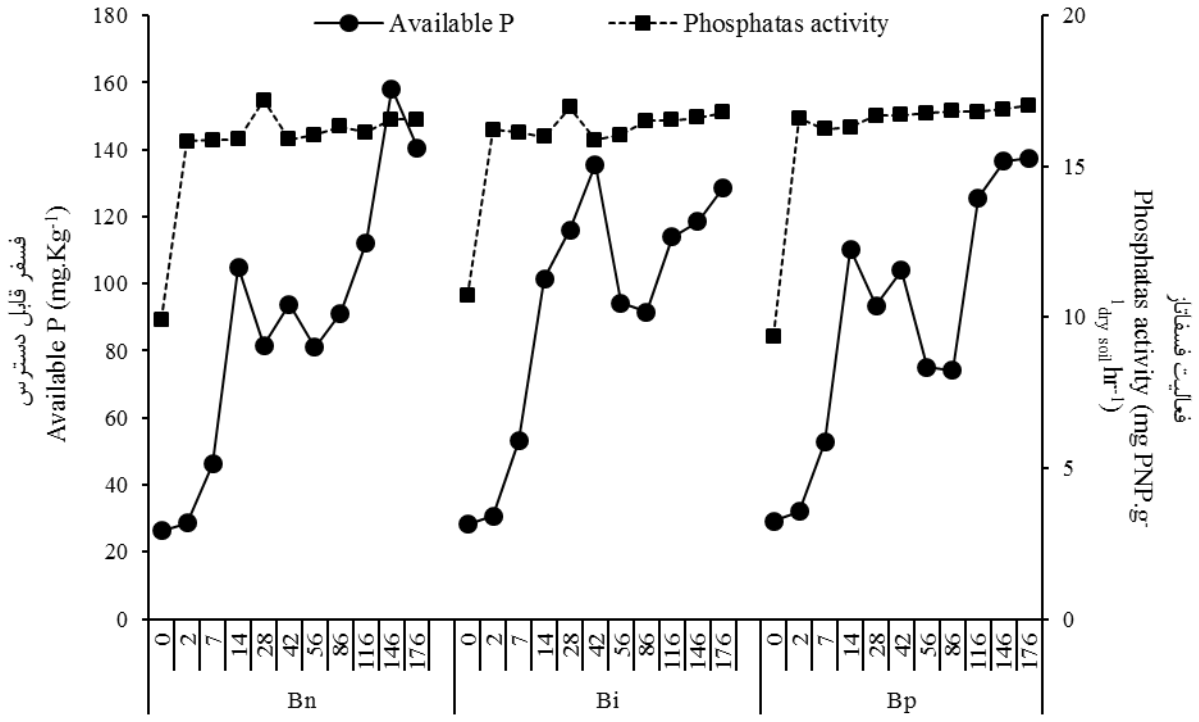
در شکل ۳ پیامد برهم‌کنش باکتری‌های مورد مطالعه در زمان های مختلف بر مقدار فسفر قابل دسترس و فعالیت آنزیم فسفاتاز نشان داده شده است. بیشترین مقدار فسفر خاک در روز ۱۴۶ تیمار بدون مایه‌زنی باکتری و کمترین مقدار آن نیز در روز صفر همین تیمار به دست آمد که با روزهای صفر و ۲ دو تیمار دیگر تفاوت آماری چشم‌گیری نداشت (P>۰/۰۵). در تیمار شاهد رهاسازی فسفر از منابع آلی و معدنی بیشتر تحت تاثیر قارچ‌ها بوده و روند افزایشی داشته است. احتمالاً مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها سبب اُریبی در جامعه میکروبی و کاهش جمعیت قارچ‌ها شده و روند آزادسازی فسفر تحت تأثیر قرار گرفته است. به هر روی، میانگین فسفر آزاد شده از خاک در ۶ ماه انکوباسیون در خاک مایه‌زنی شده با باکتری *باسیلوس* بومی بیشتر از *باسیلوس پرسیکوس* و آن‌هم بیشتر از خاک شاهد بود.

بالاترین مقدار فعالیت آنزیم فسفاتاز مربوط به روز ۱۴ خاک شاهد بود هر چند که با بسیاری از تیمارها تفاوت چشم‌گیری نداشت (P>۰/۰۵). در واقع بودن فسفاتازها در خاک که فسفر را از فاز آلی به شکل محلول درمی‌آورند، شاخصی از حاصل‌خیزی خاک است (۲).

پیامد برهم‌کنش سطوح پسماند در زمان بر ویژگی‌های مورد مطالعه

تنفس پایه میکروبی و کربن آلی

در شکل ۴ پیامد برهم‌کنش سطوح پسماند در زمان‌های مختلف بر مقدار تنفس پایه و کربن آلی نشان داده شده است. روند تغییرات کربن آلی خاک با گذشت زمان نوسان زیادی نداشت به طوری که نمودارها در هر سه تیمار زنگوله‌ای شکل بودند و بالاترین مقدار کربن در هر سه تیمار در روز ۲۸ به دست آمد (که برای تیمار ۴٪ با تفاوت آماری چشم‌گیر از همه بالاتر بود).



شکل ۳- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش باکتری در زمان (روز) بر مقدار فسفر قابل دسترس و فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک

Bn، Bi و Bp به ترتیب بیانگر خاک مایه‌زنی نشده، و مایه‌زنی شده با *باسیلوس* بومی و *باسیلوس پرسیکوس* است.

Figure 3- Effect of bacteria and time interactions on available phosphorus and phosphatase activity in soil

Bn, Bi, and Bp denote un-inoculated soil and soil inoculated with native *Bacilus* sp. and *Bacillus persicus* respectively.

یعنی این‌که بالاترین اندازه‌ی فروزینگی پسماند و رهاسازی کربن آن در ماه اول بوده است. سآدی و همکاران (۲۶) نیز گزارش کردند که بیشترین مقدار فروزینگی در پسماند زیتون افزوده شده به خاک و از دست رفتن دی‌اکسید کربن در ۸ روز اول رخ داده و شدت فروزینگی تابعی از فعالیت میکروبی و رطوبت خاک بوده است. کربن آلی خاک در طول ماه دوم انکوباسیون هم در همان محدوده‌ی مقدار کربن به دست آمده در ماه اول و بالا بود. پس از آن کربن آلی خاک هم‌زمان با افزایش تنفس کاهش یافته است. مقایسه این نمودار با روند تنفس ناشی از افزودن پسماند در طول زمان به خوبی بیانگر این رخدادهاست. روند تغییرات تنفس اندازه‌گیری شده در طول زمان انکوباسیون نیز بیانگر این است که ۴۸ ساعت پس از افزودن پسماند به خاک، تنفس پایه افزایش چشم‌گیر یافته است که نشان از شوک اولیه ورود منبع کربن به خاک و بهینه بودن شرایط خاک از نظر رطوبت و دما است. این روند می‌تواند با مصرف مواد ساده تجزیه شونده‌ی پسماند توسط ریزجانداران فرصت‌طلب در ماه اول انکوباسیون و در ادامه با فروزینگی پسماند توسط باکتری *باسیلوس* با شدت تجزیه پایین توجیه شود.

در این رابطه اجمی و همکاران (۱) بیان داشتند رابطه خطی مثبت میان تنفس میکروبی با ماده آلی خاک وجود دارد. کریستن و همکاران (۱۴) نیز تغییرات ماده آلی خاک را در ارتباط با دی اکسیدکربن اندازه‌گیری نمودند و مشخص شد که رابطه‌ی مثبت چشم‌گیری بین افزایش ماده آلی و بالا رفتن تنفس خاک وجود دارد.

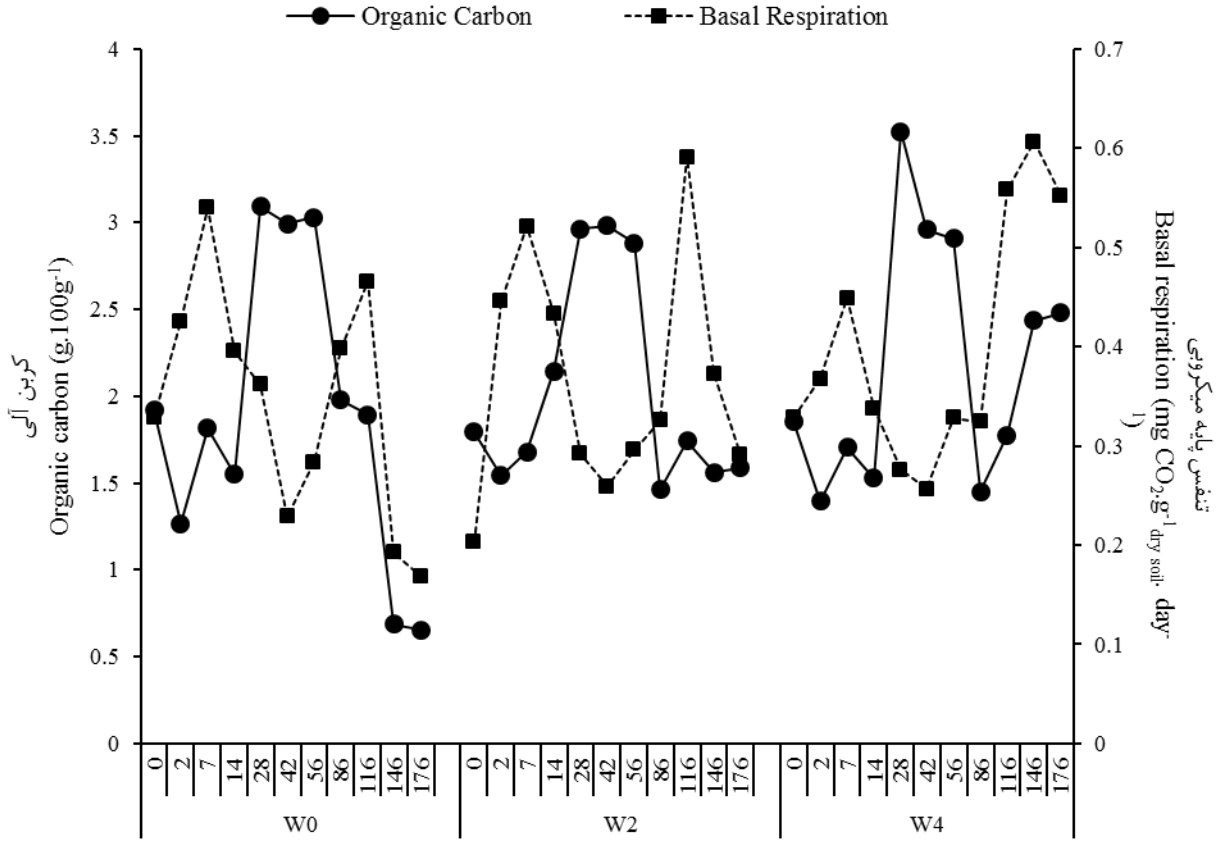
فسفر قابل دسترس و فسفاتاز

در شکل ۵ پیامد برهم‌کنش سطوح پسماند در زمان‌های مختلف بر مقدار فسفر قابل دسترس و فعالیت آنزیم فسفاتاز نشان داده شده است. مقدار فسفر خاک در تیمارهای صفر و ۴ درصد پسماند تا روز ۱۴ انکوباسیون و در تیمار ۲٪ پسماند تا روز ۴۲ روند افزایشی داشته و پس از آن دچار نوسان شده است. به طوری‌که در خاک بدون پسماند در ماه‌های ۵ و ۶ نمونه‌برداری افت کرده است. بنابراین، می‌توان گفت دلیل اصلی افزایش فسفر خاک، فسفر قابل استفاده موجود در پسماند و همچنین معدنی شدن فسفر آلی آن در مدت زمان انکوباسیون است. فعالیت آنزیم فسفاتاز نمایه‌ای از رهاسازی فسفر آلی است. با توجه به نمودار مشخص است که با گذشت ۴۸ ساعت از

انکوباسیون فعالیت فسفاتاز در خاک افزایش چشم‌گیر پیدا کرده و پس از آن هم کم و بیش روند افزایشی داشته است. اما شیب این افزایش در خاک دارای پسماند ۴٪ بیشتر است. به طوری‌که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فسفاتاز در روز ۱۷۶ تیمار دارای پسماند ۴ درصد به دست آمد. کورتف و همکاران (۱۶) گزارش کردند که افزودن پسماندهای گیاهی به خاک می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیمی در خاک شود که نتایج این پژوهش نیز با آن هم‌سو است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش پیامد افزودن پسماند کارخانه روغن‌کشی بر یک خاک لوم آهکی در حضور باکتری‌های *باسیلوس* بررسی شد. افزودن پسماند و مایه‌زنی *باسیلوس*ها به خاک سبب کاهش pH، افزایش فسفر قابل دسترس و آنزیم فسفاتاز قلیایی شد. در روند آزادسازی فسفر با زمان دیده شد که خاک‌های دارای پسماند ۴٪ و مایه‌زنی شده با *باسیلوس* بومی بالاترین شیب آزادسازی را در بین خاک‌های نظیر خود داشتند. بنابراین از پسماند جامد کارخانه روغن‌کشی می‌توان در بهبود شرایط زیستی خاک و افزایش سطح عناصر غذایی آن استفاده کرد. پسماند با دارا بودن کربن آلی به عنوان منبع کربن و انرژی می‌تواند برای فعالیت ریزجانداران خاک استفاده شود و شرایط زیستی خاک را بهبود بخشد. ضمن این‌که پسماند افزون بر این که خود دارای عناصر غذایی مانند فسفر است، می‌تواند با پایین آوردن pH و افزایش فعالیت ریزجاندارن خاک سبب فراهم شدن فسفر تثبیت شده در خاک‌های آهکی شود. اگرچه در این راستا به پژوهش های بیشتر با حضور گیاهان نیاز است.

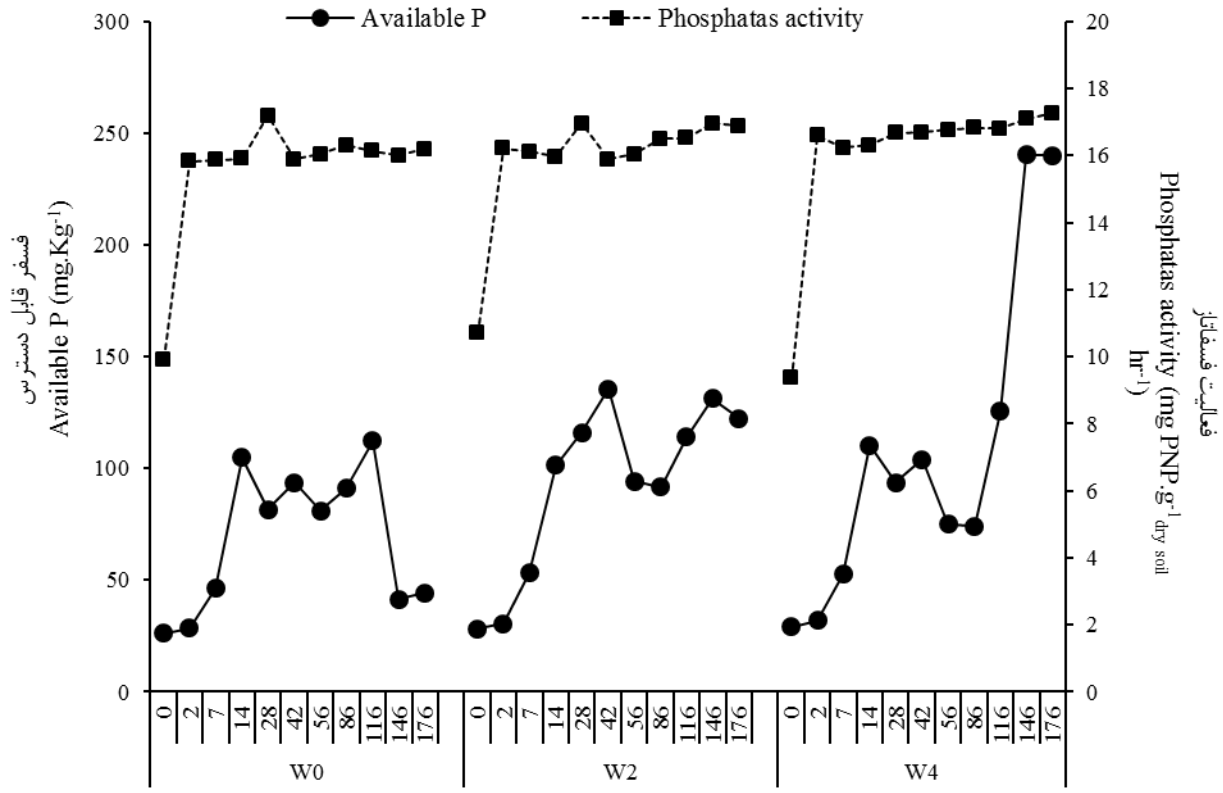


شکل ٤- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش پسماند در زمان (روز) بر تنفس پایه میکروبی و کربن آلی خاک

W0، W2، W4 به ترتیب بیانگر سطوح صفر، ۲ و ۴ درصد پسماند است.

Figure 4- Effect of solid waste and time interactions on basal microbial respiration and organic carbon in soil

W0, W2, and W4 denote 0, 2 and 4% solid waste levels respectively.



شکل ۵- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش پسماند در زمان (روز) بر مقدار فسفر قابل دسترس و فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک

W0، W2، W4 به ترتیب بیانگر سطوح صفر، ۲ و ۴ درصد پسماند است.

Figure 5- Effect of waste and time interactions on available phosphorus and phosphatase activity in soil

W0, W2, and W4 denote 0, 2 and 4% solid waste levels, respectively.

منابع

1- Ajami M., Khormali F., Ayoubi Sh., and Amoozadeh Omrani R. 2006. Changes in soil quality attributes by conversion of land use on a loess hillslope in Golestan Province, Iran. 1th international soil meeting (ISM) on soil sustaining life on earth, Managing Soil and Technology, 501-504.

2- Alvarez M., Huygens D., Diaz L.M., Villanueva C.A., Heyser W., and Boeckx P. 2012. The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissue depend on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake. Plant, Cell and Environment 35: 126-135.

3- Anderson T.H., and Domsch K.H. 1993. The metabolic quotient from CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Soil Biology and Biochemistry 25: 393-395.

4- Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. 2001. Effect of seed bacterization with fluorescent *Pseudomonas* on growth promotion of Jute in Terai zone of west Bengal, India. International Journal of current Microbiology and Applid Scienes 4: 343-350.

5- Chakarborty U., Chakraborty B.N., and Basnet M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia chninesis* by *Bacillus megatarium*. Journal of Basic Microbiology 46(3): 186-195.

6- Choudhary D.K., and Johri B.N. 2009. Interactions of *Bacillus spp.* and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research 164: 493-513.

7- Environmental regulations for reuse and recycling of waste water, 1389. Bulten No 535, Deputy Director of Strategic Control, Ministry of Energy, Iran. (In Persian)

8- Gomez-Munoz B., Hatch D.J., Bol R., and García-Ruiz R. 2012. The compost of olive mill pomace: from a waste to a resource – environmental benefits of its application in olive oil groves. Chapter 20.

9- Gregorich E.G. and Carter M.R., 2007. Soil Sampling and Methods of Analysis. CRC press.

10- Hammond J.P., Broadley M.R., and White P.J. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. Annals of

Botany 94: 323-332.
11- Henkin T.M. 2016. Classic spotlight: bacterial endospore resistance, structure, and genetics. Journal of Bacteriology 198(14): 1904.
12- Khan A., Jilani G., Akhtar M.S., Saqlan Naqv S.M., and Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. Agricultural Biology Science 1(11): 48-58.
13- Khosro M. 2012. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production, Resources and Environment 2(1): 80-85.
14- Kirsten S.H., Donald R.Z., Kelly K.M., and Julie D.J. 2011. Changes in forest soil organic matter pools after a decade of elevated CO_2 and O_3, Soil Biology and Biochemistry, 43(7): 1518-1527.
15- Kloepper J.W., Ryu C. M., and Zhang S. 2004. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259-1266.
16- Kourtev P.S., Ehrenfeld J.G., and Huang W.Z. 2002. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. Soil Biology and Biochemistry 34: 1207-1218.
17- Leboffe M.J., and Pierce B.E. 2012. Microbiology: Laboratory Theory and Application," Morton Publishing Company.
18- Loveland P., and Webb J. 2003. Is there a critical level of organic matter in the agricultural soils of temperate regions: a Review. Soil and Tillage Research 70: 1-18.
19- Marhual N.P., Pradhan N., Mohanta N.C., Sukla L.B., and Mishra B.K. 2011. Dephosphrization of LD slag by phosphorus solubilising bacteria, International Biodeterioration and Biodegradation 65: 404-409.
20- Marin L., and Fernandez-Escobar R. 1997. Optimization of nitrogen fertilization in olive orchards. In: Val, J., Montanes, L., Monge, E., (Eds.), Proceedings of the Third International Symposium on Mineral Nutrition of Deciduous Fruit Trees, Zaragoza, Spain, 411-414.
21- Mekki A., Arous F., Aloui F., and Sayadi S. 2013. Disposal of agro-industrials wastes as soil amendments. American Journal of Environmental Science 9(6): 458-469.
22- Navaro A.F., Cegarra J., Roig A., and Garcia D. 1993. Relationship between organic matter and carbon contents of organic wastes. Bioresource Technology 44(33): 203-207.
23- Regni L., Nasini L., Ilarioni L., Brunori A., Massaccesi L., Agnelli A., and Proietri P. 2017. Long term amendment with fresh and composted solid olive mill waste on olive grove affects carbon sequestration by pruning, fruits, and soil. Front Plant Science 7: 2042.
24- Rodriguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17: 319–339.
25- Roldan A., Salinas G.J.R., Alguacil M.M., Diaz E., and Caravaca F. 2005. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. Geoderma 129: 178–185.
26- Saadi I., Laor Y., Raviv M., and Medina S. 2007. Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. Chemosphere 66(1): 75-83.
27- Sankaralingam S., Harinathan B., Shankar T., Prabhu D., and Peer M. 2014. Effect of phosphate solublizing bacteria on growth and development of *Sesbania grandiflora* and *Moringa oleifera*. Sciences Agriculture 3(2): 88-96.
28- Shahab S., and Ahmed N., and Khan N.S. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African Journal of Agricultural Research 4(11): 1312-1316.
29- Sharma K., Dak G., Agarwal A., Bhatnagar M., and Sharma R. 2007. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the the germination of *Cicer arienatum* seeds and seedling growth. Journal of Herbal Medicine and Toxicology 1(1): 61-63l.
30- Sharma R.K., Arawal M., and Marshalla F.M. 2006. Heavy metal contamination in vegetables grown in wastewater irrigated areas of Varanasi, India. Bulletion of Environmental contamination and Toxicology 77: 312-318.
31- Sierra J., Fontaine S., and Desfontaines L. 2001. Factors controlling N mineralization, nitrification and nitrogen losses in an Oxisol amended with sewage sludge. Soil Research 39: 519-534.
32- Sturz A.V., and Christie B.R. 2003. Beneficial microbial alleloplathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. Soil and Tillage Research 72: 107-123.
33- Tabatabai M.A. 1982. Soil enzymes, Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, 539–579.
34- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571–586.
35- Violante A., and Pigna M. 2002. Competitive sorption of arsenate and phosphate on different clay minerals and soils. Soil Science Society of American Journal 66: 1788-1796.
36- Williams M.A., Myrold D.D., and Bottomley P.J. 2006. Carbon flow from ^{13}C-labeled straw and root residues into the phospholipid fatty acids of a soil microbial community under field conditions. Soil Biology and Biochemistry 38: 759–768.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 1, March-April 2020, p. 129-143

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۹، ص. ۱۴۳-۱۲۹

The Effect of *Bacillus* Bacteria on Phosphorus Release from Oil Refinery Plant-solid Waste in a Calcareous Soil

E. Hashempour[1]- M.B. Farhangi[2]*- N. Ghorbanzadeh[3]- M. Fazeli Sangani[4]

Received: 10-06-2019
Accepted: 30-11-2019

Introduction: Due to the increasing development of edible oil processing industries, large amounts of wastewater and solid wastes (SW) are inevitable in these industries. Organic wastes can be used as soil conditioners in agriculture due to the high content of organic matter and nutrient loads. Phosphorus solubilizing bacteria including *Bacillus* spp., Pseudomonads and *Rhizobium* spp. can release phosphorus from insoluble organic and mineral sources in soil. Most soils in the semi-arid regions, including southern parts of Guilan province, have low organic matter content and do not support plant cultivation due to the low fertility and instability of soils. Hence, industrial wastes can be applied as a suitable and low-cost source of organic materials and nutrients in these soils. As phosphorus is one of the most important essential nutrients in plant nutrition which is also present in oil refinery soild wastes and P solubilizing bacteria can release phosphorus from the organic phase of the wastes and make it available in the soil solution, this study aimed to investigate the available phosphorus (P_{ava}) content of soil after simultaneous addition of olive refinery-solid wastes and P solubilizing *Bacillus* spp.

Materials and Methods: the solid waste obtained from Ganje Rudbar oil refinery plant (located in Rudbar, Guilan province) and a soil sample was collected from a surface layer (0-30 cm) of a pasture, located in Lowshan area (Guilan province). A native strain of *Bacillus* sp. was isolated from the sampled soil based on its P-solubilizing ability in Sperber medium. An indicator strain, *Bacillus persicus* was also included in the experiments. P-solubilizing ability of the indicator strain was also evaluated in Sperber medium. The experiment was conducted in a completely randomized design based on factorial arrangement and three replications. Factors included three levels of solid waste (0, 2 and 4%), three levels of inoculated bacteria (no bacteria, native *Bacillus* sp. and *Bacillus persicus*) and eleven sampling times (0, 2, 7, 14, 28, 42, 56, 86, 116, 146, and 176 days). Different levels of solid waste were added to the soil, inoculated with bacteria (10^6 cell/g), and incubated at laboratory condition (~25 ºC) for six months. The moisture content of the soil mixtures fixed around 0.7 FC and kept constant during the incubation period. Sampling was done at desired times. The pH, organic carbon (OC), soil Basal Respiration (BR), available phosphorus concentration (P_{ava}), and phosphatase enzyme activity were measured in soil samples. Data analysis and means comparison were done by Duncans' test using SAS software package.

Results and Discussion: The studied soil was loam in texture, and had slightly alkaline pH, moderate P_{ava}, and low OC content. The studied solid waste contained considerable OC and total P load. The effect of solid waste (SW), bacteria, sampling time and their interactions were significant on most of the measured characteristics ($p < 0.05$). SW application decreased soil pH and mixtures inoculated with native *Bacillus* sp. had lower pH values compared to those inoculated with *Bacillus persicus*, probably due to the greater effect of *Bacillus* spp. on SW decomposition compared with *B. persicus.* The highest average BR was attained in mixtures contained 4% SW which was 1.24 and 1.73 times greater than that in mixtures contained 2 and 0% SW, respectively. While the effect of SW on soil BR was obvious, bacteria inoculation had different impact on soil organic material decomposition and the lowest BR was measured in soil (0% SW) inoculated with *Bacillus persicus.* OC content of mixtures increased with SW application. The highest OC level (3.21 g $100g^{-1}$) was obtained in uninoculated mixture contained 4% SW, which was significantly greater than OC levels in mixtures inoculated with bacteria ($p < 0.05$). The lowest OC level (3.21 g $100g^{-1}$) was observed in uninoculated soil (0% SW). SW application significantly increased P_{ava}. The greatest P_{ava} concentration (142.77 mg Kg^{-1}) was attained in uninoculated mixture contained 4% SW which was not significantly different from P_{ava} concentration in 4%

1, 2, 3 and 4 -Former M.Sc. Student and Assistant Professors of Soil Science and Engineering, College of Agricultural Science, University of Guilan, respectively.
(*- Corresponding Author Email: M.farhangi@guilan.ac.ir)
DOI: 10.22067/jsw.v34i1.80353

SW-mixture inoculated with native *Bacillus* sp. ($P > 0.05$). In control treatments (0% SW), *Bacillus persicus* was efficient in P release from soil native organic carbon and/or phosphate minerals. However, among the soils contained 2% SW, those inoculated with native *Bacillus* sp. had the highest P_{ava} concentration. The average P_{ava} concentration in the 4% SW-mixtures was 136.33 mg Kg^{-1} which was 3.5 times greater than that in control treatment (0% SW). Although soil P_{ava} was related to phosphatase enzyme, this enzyme activity was not affected by treatments. In the P-releasing trend, it was found that 4% SW-mixtures had the highest P_{ava} concentration after 6 months of incubation, and bacteria inoculation made the P-release trend to be flatter compared to control.

Conclusion: The application of oil refinery plant-solid waste improved the basal respiration of the studied soil and increased available phosphorus concentration. The comparison of applied solid waste levels showed that the inoculation of soil with *Bacillus* bacteria had a positive effect on available phosphorus concentration only at 2% solid waste level.

Keywords: Microbial respiration, Organic carbon, Phosphatase, Phosphate solubilizing bacteria