تاثیر کاربرد کود مرغی حاوی انروفلوکساسین بر تنفس، بیوماس میکروبی و جمعیت برخی باکتری‌های مفید خاک

مهسا محمدزاده[۱]، فروزان قاسمیان رودسری[۲]، اکبرحسنی*[۳] ، عباسعلی زمانی[۴]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۳/۲۱
تاریخ پذیرش :۱۳۹۸/۱/۳۱

چکیده

غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر اضافه کردن کود مرغی آلوده به آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد و ممکن است جامعه میکروبی خاک را تحت تاثیر قرار دهد. هدف این پژوهش تاثیر اضافه نمودن کود مرغی محتوی انروفلوکساسین به خاک بر جمعیت Azotobacter spp.، Pseudomonas fluorescens و Pseudomonas putida و همچنین بیوماس میکروبی و تنفس میکروارگانیسم‌های خاک است. یک آزمایش در آزمایشگاه به مدت ۴۵ روز با ۷ تیمار و سه تکرار انجام شد. این آزمایش شامل کود مرغی تازه و کمپوست شده محتوی آنتی‌بیوتیک در دو سطح غلظتی بالا (۲۶/۲mg kg-1) و پایین (۴/۲۳mg kg-1) و کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک بر مبنای طرح کرت‌های به‌طورکامل تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد کاربرد کود مرغی حاوی آنتی‌بیوتیک منجر به کاهش جمعیت Azotobacter spp. (۲۸٪)، Pseudomonas fluorescens (۷۳٪) و Pseudomonas putida(۱۴/۶٪) در خاک‌ها شد. کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه اثر منفی آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت. کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی بیوتیک سبب افزایش ۱۲۷ درصدی تنفس میکروبی خاک نسبت به شاهد شد اما بین سایر تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی تفاوت معنی‌دار دیده نشد. کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد (۹۵٪). وجود آنتی‌بیوتیک در کود مرغی تاثیر منفی بر غلظت کربن بیوماس میکروبی داشت. به طور کلی رهاسازی و انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر افزودن کود مرغی به مزارع حتی اگر قبل از مصرف کمپوست شده باشد، باعث کاهش رشد گروه‌های باکتریایی مفید خاک شد.

واژه‌های کلیدی : *Azotobacter، Pseudomonas putida ، Pseudomonas fluorescens ، کمپوست، کود مرغی*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم محیط زیست، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان
۲ - استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه زنجان
۳-استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، نویسنده مسئول
* (نویسنده مسئول : Akbar.Hassani@znu.ac.ir)
۴ - استادیار گروه علوم محیط زیست، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله داروهایی هستند که در علوم پزشکی دام و طیور جدید بیشترین تجویز را دارند. تاثیر آنتی-بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی بیشترین کاربرد را یافته است و امروزه بیش از یکصد نوع آنتی‌بیوتیک وجود دارد که برای درمان بیماری‌های خفیف تا عفونت‌های شدید مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lewis, 2013). انروفلوکساسین[1] یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف باکتریوسید از نوع فلوروکینولون می‌باشد که از طریق مهار غیرقابل برگشت آنزیم ژیراز باعث ممانعت از همانندسازی اسید نوکلئیک و در نتیجه مرگ باکتری‌ها می‌گردد (Kuhlmann *et al*., 2012).

شرکت‌های متعددی در دنیا به تولید انواع مختلف آنتی‌بیوتیک می‌پردازند که فاضلاب آنها محتوی بقایای آنتی‌بیوتیکی می‌باشد و ورود این فاضلاب به محیط زیست موجب انتشار آن می‌شود. با این وجود، اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها پس از استفاده توسط انسان‌ها و یا دام‌ها وارد محیط زیست می‌شوند (Grenni et al., 2018). زمانی که یک آنتی‌بیوتیک توسط موجود زنده مصرف می‌شود، تقریباً تمام آن آنتی‌بیوتیک پس از مدتی به شکل دست نخورده و یا با تغییر جزئی در ترکیب شیمیایی از طریق ادرار و مدفوع موجود زنده دفع می‌شود (Thiele-Bruhn, 2003). آنتی‌بیوتیک‌های دفع شده از طریق انسان‌ها از طریق فاضلاب شهری وارد محیط زیست می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌های صنعت دام و طیور نیز ممکن است به طور طبیعی وارد محیط زیست شوند ولی اغلب این آنتی‌بیوتیک‌ها به دست عوامل انسانی و به شکل کودهای دامی وارد محیط زیست می‌شوند. قسمت عمده آزادسازی این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل کاربرد کودهای دامی به شکل تازه یا کمپوست شده در زمین‌های کشاورزی می‌باشد (Kim *et al*., 2011).

غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر اضافه کردن کود دامی تازه و یا کمپوست شده و همچنین آبیاری با فاضلاب آلوده به آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد تا جایی‌که غلظت آن ممکن است به دو تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز برسد (Thiele-Bruhn, 2003). آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک ممکن است توسط میکروارگانیسم‌ها تغییرشکل پیدا کنند و یا اینکه برعکس، متابولیت‌های آنها به حالت اولیه برگردد (Zarfl *et al*., 2009). به طور کلی آنتی‌بیوتیک‌هایی که از طریق کودهای دام و طیور وارد خاک می‌شوند به‌سادگی توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه نمی‌شوند (Kim *et al*., 2011). کاربرد کودهای دامی و طیور در کنار مزایایی که برای خاک‌های کشاورزی دارد، تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را نیز وارد خاک می‌کند (Poulsen *et al*., 2013). این موضوع می‌تواند منجر به تغییر قابل توجهی در پویایی جامعه میکروبی خاک شود (Ding *et al*., 2014). جمعیت بالای میکروبی در خاک‌ها، تغییر و تبدیلات ژنتیکی در آنها را زیاد نموده و ایجاد ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهد (Ding and He, 2010). علاوه بر این، وقتی خاک در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها قرار بگیرد، ساختار میکروبی خاک نیز ممکن

1 - enrofloxacin

است تغییر کند. این موضوع به این دلیل است که آنتی‌بیوتیک‌ها معمولاً روی میکروب‌ها تاثیر انتخابی دارد و یک آنتی‌بیوتیک ممکن است روی طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها و باکتری‌ها موثر باشد و آنتی‌بیوتیکی دیگر فقط روی یک گونه میکروبی تاثیرگذار باشد. در نتیجه تاثیر انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها، فراوانی نسبی گونه‌های میکروبی را تغییر می‌دهند و در نتیجه تعاملات بین گونه‌های مختلف میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Ding and He, 2010). وی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین باعث کاهش جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک می‌شود. همسفر و همکاران (۲۰۰۸) ساختار میکروبی خاک کشاورزی محتوی ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفادیازین را با اسیدهای چرب گرفته شده از فسفولیپید[1] (PLFA) و ژل الکتروفورز با گرادیان شیب ماده۲ بررسی کردند و نشان دادند که کل فسفولیپید اسیدهای چرب و نسبت باکتری به قارچ کاهش یافت در حالی‌که اثرات آن بر *Pseudomonas* و *Betaproteobacteria* اندک بود (Hammesfahr *et al*., 2008). وستگراد و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند که بر اثر اضافه نمودن تایلوزین به خاک یک تغییر دائمی در ساختار جمعیتی باکتری‌ها به وجود می‌آید (Westergaard *et al*., 2001). دیاو و همکاران (۲۰۰۳) نیز تاکید کردند که آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آپرامایسین۳ موجب جلوگیری از رشد باکتری‌ها در خاک می‌شود (Diao *et al*., 2004). در برخی پژوهش‌ها نیز تاثیرات بازدارنده کلروتتراسایکلین و سولفودیازین روی رشد میکروارگانیسم‌های خاک گزارش شده است (Fründ *et al*., 2000; Kotzerke *et al*., 2008). کوتزرک و همکاران (۲۰۰۴) با اضافه کردن سولوفادیازین به کود خوکی مایع، تغییرات کوچکی در جامعه میکروبی نیمرخ خاک مشاهده کردند (Kotzerke et al., 2008). بر خلاف این نتایج، هاندریک و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که اضافه کردن تتراسایکلین۴ تاثیری بر ساختار میکروبی خاک ندارد (Hund-Rinke *et al*., 2004). در مطالعه مشابهی زیلنزی و همکاران (۲۰۰۶) تاکید نمودند که تاثیرات بازدارندگی رشد آنتی‌بیوتیک‌های اضافه شده به خاک به دلیل جذب سطحی آنها توسط ذرات خاک، ناچیز می‌باشد (Zielezny *et al*., 2006). تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های دامی بر جمعیت‌های میکروبی به ویژگی‌های خاک (Čermák *et al*., 2008)، گروه‌های میکروبی (Hammesfahr *et al*., 2008) و مقدار آنتی‌بیوتیک وارد شده به خاک (Zielezny *et al*., 2006) بستگی دارد. علاوه بر این، گروه‌های مختلف باکتریایی به علت ساختار متفاوتی که در دیواره سلولی خود دارند، واکنش متفاوتی خواهند داشت؛ به عنوان مثال سولفودیازین نسبت باکتری‌های گرم مثبت به گرم منفی را تغییر نداد (Hammesfahr *et al*., 2008) در حالی‌که تتراسایکلین این نسبت را کاهش داد زیرا باکتری‌های مقاوم به تتراسایکلین بیشتر از نوع گرم منفی هستند (Hund-Rinke *et al*., 2004). لیو و همکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند که آنتی‌بیوتیک‌های کلروتتراسایکلین، تتراسایکلین،تایلوزین، سولفامتوکسازول و تری‌متوپریم، فعالیت‌های میکروبی و آنزیم‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

[1] - phospholipid-derived fatty acids

[2] -denaturing gradient gel electrophoresis

[3] - apramycin

[4] - tetracycline

آنها در مطالعات خود متوجه شدند که این آنتی‌بیوتیک‌ها اثر بازدارندگی روی تنفس خاک و فعالیت آنزیم فسفاتاز دارند (Liu *et al.*, 2009).

Azotobacter باکتری گرم منفی، هوازی، شیمیوارگانوتروف و قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیرهمزیست می‌باشد. این باکتری می‌تواند انواع اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و هورمون‌های محرک رشد گیاه را سنتز کند. *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* نیز دو باکتری گرم منفی از شاخه proteobacteria و جنس Pseudomonas می‌باشند که در خاک با اعمالی مانند تولید برخی هورمون‌های محرک رشد، افزایش انحلال عناصر غذایی و مقابله با برخی بیماری‌ها به رشد گیاهان در خاک کمک می‌کنند (Hayat *et al*, 2010). با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که اطلاعات و دانش موجود هم‌چنان اندک می‌باشد و تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر گروه‌های مختلف میکروبی خاک هنوز نیاز به بررسی بیشتری دارد. تاثیر انروفلوکساسین بر روی جامعه میکروبی خاک مورد بررسی قرار نگرفته است و در مورد باکتری‌های مفید خاک مانند Azotobacter و Pseudomonasها هنوز مطالعات کافی انجام نشده است. این باکتری‌ها اعمال حیاتی مهمی همچون تثبیت زیتس نیتروژن اتمسفری و ترشح محرک‌های رشد برای گیاهان انجام می‌دهند و افزایش فعالیت این سه گروه باکتری همراه با سایر باکتری‌های مفید، در حقیقت نشان‌دهنده افزایش کیفیت خاک می‌باشد که با ورود آنتی‌بیوتک‌ها به خاک ممکن است کیفیت خاک نیز کاهش یابد و به نظر می‌رسد این موضوع به بررسی بیشتری نیاز دارد. هدف اصلی از این پژوهش تاثیر اضافه نمودن کود مرغی حاوی آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین به خاک بر جمعیت برخی باکتری‌های مفید خاک مانند Azotobacter، Pseudomonas putida و Pseudomonas fluorescens می‌باشد. فرضیه موجود این بود که حضور انروفلوکساسین در کود مرغی، سه گروه باکتری مورد مطالعه را تحت تاثیر قرار خواهد داد و جمعیت آنها را کاهش می‌دهد اما با کمپوست نمودن کود مرغی قبل از کاربرد آنها در مزرعه این اتفاق نخواهد افتاد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه زنجان انجام شد. ابتدا سه نمونه کود مرغی گوشتی تازه از مرغداری پژوهشی واقع در مزرعه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان تهیه شد. در بخشی از مرغ‌ها سطح پایینی (۱۸ mg kg-1) از آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در برنامه غذایی طیور استفاده شده بود. در بخش دیگر سطح بالایی (۵۰mg kg-1) از آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین استفاده شده و در بخش آخر نیز هیچگونه آنتی‌بیوتیکی استفاده نشده بود. انروفلوکساسین از روز بیست و پنجم تولید به مدت ۵ روز همراه با آب آشامیدنی به مرغ‌های گوشتی داده شد و در انتهای روز پنجم فضولات ۱۵ مرغ که به طور تصادفی از بین سایر مرغ‌ها انتخاب شده بود جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌برداری، بخشی از کودهای تهیه شده در آزمایشگاه به روش سلنا و سولنردانس (۲۰۱۶) به صورت هوازی و به مدت ۷۵ روز کمپوست شدند. غلظت آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در

نمونه‌های تازه و کمپوست شده به روش سلنا و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. در این روش ۴۴ میلی‌لیتر از محلول بافر (شامل ۱۵ گرم K2HPO4، ۱۵۰ میلی‌گرم EDTA، ۴ میلی‌لیتر اسید فسفریک غلیظ، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل) به ۲۵ گرم نمونه اضافه شد و به مدت ۹۰ ثانیه روی دستگاه همزن قرار گرفت. پس از آن نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد و دوباره روی دستگاه همزن به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفت. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه با ۳۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره صاف رویی جدا شد. این عمل ۳ مرتبه دیگر نیز تکرار شد و همه عصاره‌ها یکجا جمع و از کاغذ صافی عبور داده شدند تا برای آنالیز آماده شوند (Slana *et al.*, 2014). کود مرغی تهیه شده محتوی ۱۹/۷ درصد کربن آلی، ۶۲/۶ درصد رطوبت اولیه، ۱/۴۷ درصد نیتروژن کل بود و pH آن نیز ۸/۱۱ اندازه‌گیری شد. غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های کود تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح بالای آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۲۶/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت آن در نمونه‌های تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح پایین آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۴/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

در مرحله بعد یک طرح آزمایشی با ۷ تیمار و سه تکرار T1- خاک بدون کاربرد کود مرغی T2- کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کاربرد کود مرغی تازه محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده T7- کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده در خاک بر مبنای طرح کرت‌های به‌طورکامل تصادفی در آزمایشگاه انجام شد.

بدین منظور مقداری نمونه خاک بکر و دست نخورده از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری از محوطه دانشگاه زنجان تهیه شد. نمونه خاک پس از کوبیدن و خشک شدن در هوای آزاد از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس یک کیلوگرم خاک به ظرف‌های مخصوص پلاستیکی با حجم یک و نیم لیتر (قوطی دربدار) ریخته و به هر ظرف با توجه به نوع تیمار، ۱۰ گرم کود مرغی خشک شده در هوای آزاد اضافه و به خوبی مخلوط شد. رطوبت خاک در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به روش وزنی حفظ شده و خاک‌ها به مدت ۴۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در فواصل زمانی هر پنج روز یک‌بار جمعیت *Azotobacter*، *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* به عنوان باکتری‌های مفید خاک در آنها اندازه‌گیری شد. خاک مورد استفاده یک نمونه خاک بکر و دست نخورده بود که هیچگونه آنتی‌بیوتیکی از منابع خارجی دریافت نکرده بود و عملیات کشاورزی نیز روی آن انجام نشده بود. خاک آهکی (۱۵/۴ درصد کربنات کلسیم معادل) و مقدار pH آن ۷/۳۷، مقدار قابلیت هدایت الکتریکی عصاره گل اشباع در آن ۱/۷ دسی‌زیمنس بر متر و مقدار کربن آلی نیز ۰/۲۳ درصد بود. بافت خاک نیز لوم بود.

شمارش باکتری‌های *Azotobacter*

تعداد جمعیت باکتری‌های Azotobacter در نمونه‌ها با استفاده از شمارش CFU انجام شد. برای شمارش کل باکتری‌ها ابتدا یک نمونه خاک تازه از تمام نیمرخ خاک[1] هر ظرف آزمایشی به وسیله اوگر[2] مخصوص تهیه شد. سپس ۱۰ گرم از نمونه خاک تازه تهیه شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد (۱-۱۰). سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. این محلول به مقدار ۶-۱۰ مرتبه در آب مقطر استریل رقیق شد و از هر رقت ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت Azotobacterمانیتول‌آگار[3] (DSMZ medium 320) محتوی ۵ گرم گلوکز، ۵ گرم مانیتول، ۰/۱ گرم کلسیم کلراید (CaCl2.2H2O)، ۰/۱ گرم منیزیم سولفات (MgSO4.7H2O)، ۰/۹ گرم دی پتاسیم فسفات (K2HPO4)، ۰/۱ گرم مونوپتاسیم فسفات (KH2PO4)، ۵ گرم کلسیم کربنات (CaCO3)، ۰/۰۱ گرم آهن سولفات (FeSO4.7H2O)، ۵ میلی‌گرم سدیم مولیبدات (Na2MoO4.2H2O)، ۱۵ گرم آگار و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با مقدار pH برابر با ۷/۳ کشت داده شد. کلسیم کربنات در این محیط به عنوان بافر عمل می‌کند و در ته پلیت ته نشین شده و لایه سفید رنگ ماتی ایجاد می‌کند. با رشد باکتری، اسید تولید می‌شود و با کلسیم کربنات واکنش می‌هد و آن را حل می‌کند و یک هاله شفاف در اطراف و زیر پلیت تشکیل می‌شود که معرف کلونی Azotobacter می‌باشد. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاین به محیط کشت باکتری اضافه شد. پس از یک هفته انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس شمارش کلونی‌ها انجام شد (Davis et al., 2005). پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

شمارش باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens*

تعداد جمعیت باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* در نمونه‌ها با استفاده از شمارش CFU و در محیط کشت مخصوص آن انجام شد. برای شمارش این باکتری‌ها از رقت‌های تهیه شده قبلی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت کینگز بی[4] (King *et al*, 1954) محتوی ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲۰ گرم پروتئوز پپتون، ۱/۵ گرم دی‌پتاسیم فسفات (K2HPO4)، ۱/۵ گرم منیزیم سولفات (MgSO4.7H2O)، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۵ گرم آگار در حجم نهایی یک لیتر محیط کشت و pH برابر ۷ استفاده شد. یک گرم دزوکسیکولات نیز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت استفاده گردید. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاتین[5] به محیط کشت اضافه شد. پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۸

[1] - soil profile

[2] - auger

[3] - Azotobacter mannitol agar

[4] - Kings B

[5] - nistatin

درجه سلسیوس در انکوباتور، پلیت‌ها با استفاده از لامپ فرابنفش از نظر وجود کلونی‌هایی با خاصیت پرتو افشان (فلوروسنس) بررسی شدند و پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

شمارش باکتری‌های *Pseudomonas putida*

شمارش تعداد باکتری‌های Pseudomonas putida در نمونه‌ها با استفاده از کشت پلیت انجام شد. برای شمارش این باکتری‌ها از رقت‌های دهدهی تهیه شده به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت اختصاصی Pseudomonas putidaمحتوی ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، یک گرم سدیم هیپورات ($C_6H_5CONHCH_2COONa \cdot xH_2O$)، یک گرم مونوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات ($MgSO_4.7H_2O$)، ۰/۲ گرم پتاسیم کلرید، ۵ گرم سدیم نیترات ($NaNO_3$)، یک گرم دزوکسیکولات و ۱۵ گرم آگار در حجم نهایی یک لیتر محیط کشت با pH برابر با ۷/۲ استفاده شد. در پایان محیط کشت در اتوکلاو استریل شد. این محیط کشت توسط کاتو و ایتو (۱۹۸۳) برای جداسازی Pseudomonas putida از سایر Pseudomonasها ارائه شد (Katoh and Itoh, 1983). در این محیط کشت، سدیم هیپورات به عنوان تنها منبع کربنی به‌کار می‌رود که فقط Pseudomonas putida قادر به استفاده از آن می‌باشد. از دزوکسیکولات نیز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت استفاده شد. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاتین به محیط کشت اضافه گردید. پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

اندازه‌گیری بیوماس میکروبی

اندازه‌گیری کربن بیوماس میکروبی نیز به روش تدخین– استخراج[1] (Vance *et al.*, 1987) در نمونه‌های تهیه شده برای شمارش میکروبی در روزهای ۵، ۱۵، ۲۵ و ۴۵ انجام شد. در این روش نمونه‌های خاک ۱۰۰ گرمی تهیه شده از کل عمق ظرف آزمایشی به مدت ۲۴ ساعت با کلروفرم تدخین و با محلول سولفات پتاسیم استخراج شد. هم‌زمان یک نمونه خاک تدخین نشده نیز با سولفات پتاسیم عصاره‌گیری شد. کربن آلی در عصاره‌های حاصله به روش احتراق تر با دی کرومات پتاسیم تعیین و با استفاده از رابطه ۱ به کربن بیوماس میکروبی تبدیل شد.

$$MBC\ (mg/kg) = S\ (mg/kg) - C\ (mg/kg) / 0.35 \qquad \text{رابطه ۱}$$

[1] - Fumigation extraction

در این رابطه MBC[1] مقدار کربن بیوماس میکروبی، S مقدار کربن آلی در خاک تدخین شده و C مقدار کربن آلی در خاک تدخین نشده، می‌باشد.

اندازه‌گیری تنفس میکروبی خاک

تنفس میکروبی خاک در تیمارهای مورد مطالعه و در زمان‌های مشابه در ظرف‌های جداگانه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری تنفس میکروبی، گاز کربن دی‌اکسید متصاعد شده از خاک ناشی از تنفس میکروبی به‌روش حبس در محلول سدیم هیدروکسید (Anderson and Domsch, 1978) و تیتراسیون با محلول هیدروکلریک اسید اندازه‌گیری شد. در این روش ۲۵ گرم خاک مرطوب و تازه به یک بشر پلاستیکی منتقل و بشر محتوی خاک داخل یک ظرف پلاستیکی دربدار ۱ لیتری گذاشته شد. درون بشر دیگری هم ۲۰ میلی لیتر از محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار ریخته شد و آن ظرف محتوی هیدروکسید سدیم نیز به ظرف پلاستیکی در کنار خاک منتقل شد. سه ظرف نیز فقط محتوی محلول هیدروکسید سدیم و بدون خاک به عنوان شاهد برای حبس دی اکسید کربن موجود در هوای درون ظرف در نظر گرفته شد. درب ظرف به طور کامل مسدود شد تا تبادل هوای بیرون و درون در آن انجام نشود. سپس برای مدت معین دردمای مناسب (۲۸ درجه سلسیوس) قرار داده شد. در این مدت گاز دی اکسید کربن تولید شده ناشی از تنفس میکروارگانیسم‌های خاک درون محلول هیدروکسید سدیم حبس شده و غلظت هیدروکسید سدیم در محلول کاهش می یابد. در پایان محتویات محلول هیدروکسید سدیم به وسیله اسید هیدروکلریک (HCl) یک مولار تیتر شد. قبل از تیتراسیون از کلرید باریم به منظور رسوب کربنات باریم استفاده شد. پس از تیتراسیون، ظرف محتوی هیدروکسید سدیم دوبار با یک محلول جدید پر شد و داخل قوطی قرار گرفت تا آزمایش برای روزهای بعد ادامه یابد. تیتراسیون به طور میانگین هر پنج روز یکبار و به مدت ۴۵ روز انجام شد. مقدار تنفس بر حسب میلی گرم گاز دی اکسید کربن بر هر گرم خاک در طول دوره محاسبه و گزارش شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه واریانس همه داده‌ها پس از نرمال‌سازی در هر سه آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1.3 portable انجام شد و جهت مقایسه میانگین‌ها آزمون LSD در سطح پنج درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

[1] - Microbal Boimass Carbon

نتایج

غلظت انروفلوکساسین در کود مرغی

غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های کود تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح بالای آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۲۶/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت آن در نمونه‌های تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح پایین آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۴/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. پس از کمپوست نمودن، غلظت انروفلوکساسین در کود مرغی به ترتیب به ۱۶/۸۵ و ۲/۲۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید که نشان می‌دهد فرایند کمپوست نمودن باعث کاهش غلظت انروفلوکساسین در کود مرغی می‌شود.

تاثیر بر جمعیت *Azotobacter*های خاک

تاثیر کاربرد کودهای مرغی بر جمعیت Azotobacterهای خاک در جدول ۱ دیده می‌شود. جمعیت Azotobacterها در خاک شاهد بدون کاربرد کود مرغی بین ۲۳۴۵ تا ۲۵۶۸ سلول در هر گرم خاک متغیر بود و در طول دوره جمعیت آن تغییر معنی‌داری نداشت. در تیمار دوم با کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک جمعیت Azotobacter افزایش یافت و در روز سی‌ام به حداکثر مقدار خود، ۴۱۷۶ سلول در هر گرم خاک رسید که ۷۴ درصد نسبت به روز اول افزایش داشت. در تیمار سوم، کود مرغی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا به خاک اضافه و دیده شد که جمعیت Azotobacter از روز دهم کاهش یافت و در روز پانزدهم به کمترین مقدار خود، ۱۷۷۶ سلول در هر گرم خاک رسید که نسبت به روز اول ۲۸ درصد کاهش نشان داد. با گذشت زمان جمعیت دوباره رو به افزایش گذاشت و در پایان نیز جمعیت با روز اول اختلاف معنی‌دار نداشت. در تیمار چهارم که در آن کود مرغی تازه با غلظت پایین آنتی‌بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت Azotobacter خاک کاهش یافت که شدت آن کمتر از تیمار سوم بود (۱۳ درصد کاهش نسبت به روز اول) و البته در پایان دوره جمعیت Azotobacter بیشتر از مقدار آن در روز اول بود. با توجه با این نتایج مشخص می‌شود که کاربرد کودهای تازه محتوی آنتی‌بیوتیک منجر به کاهش جمعیت Azotobacter در خاک می‌شود اگرچه غلظت آنتی‌بیوتیک نیز اهمیت دارد. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده منجر به افزایش جمعیت Azotobacter شد ولی تاثیر آن کمتر از کود تازه بود. این نتیجه نشان داد که کود مرغی تازه نسبت به کود مرغی کمپوست شده تاثیر بیشتری در افزایش جمعیت این گروه باکتریایی داشت. در تیمار ششم و هفتم با کاربرد کود مرغی کمپوست شده محتوی آنتی‌بیوتیک دیده شد که جمعیت Azotobacter در میانه دوره کاهش یافت (به ترتیب ۲۱/۸ و ۷/۴ درصد کاهش) و در پایان نیز جمعیت آن در تیمار ششم کمتر از روز اول و تیمار هفتم بیشتر از روز اول بود.

جدول ۱: جمعیت *azotobacter* در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی برحسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	^{A}۲۳۴۵±۱۴a	^{D}۲۳۹۸±۱۲a	^{A}۲۴۶۷±۱۶a	^{B}۲۳۸۸±۱۶a	^{C}۲۲۵۷±۱۴ab	^{A}۲۴۶۷±۹a	^{C}۲۴۲۵±۱۷a
۵	^{A}۲۴۷۶±۱۲a	^{D}۲۴۸۹±۲۱a	^{A}۲۴۵۳±۲۲a	^{B}۲۴۶۷±۱۷a	^{C}۲۳۱۱±۲۵a	^{A}۲۴۱۰±۱۸a	^{C}۲۴۷۸±۲۱a
۱۰	^{A}۲۵۶۸±۲۲b	^{C}۲۷۸۳±۲۱a	^{A}۲۳۴۶±۲۴c	^{A}۲۵۸۰±۲۳b	^{B}۲۵۸۳±۲۳b	^{A}۲۵۲۵±۲۵bc	^{AB}۲۷۹۸±۲۳a
۱۵	^{A}۲۵۴۶±۲۳b	^{C}۲۸۶۹±۱۸a	^{C}۱۷۷۶±۲۷d	^{C}۲۰۶۷±۲۱cd	^{B}۲۶۴۰±۲۵b	^{B}۱۹۲۷±۱۸d	^{CD}۲۲۴۴±۲۳c
۲۰	^{A}۲۴۴۸±۱۸b	^{C}۲۷۹۹±۲۷a	^{BC}۱۸۲۷±۲۱c	^{BC}۲۱۹۳±۲۵c	^{B}۲۵۸۰±۲۷ab	^{B}۱۹۶۰±۲۴cd	^{C}۲۳۸۵±۱۸b
۲۵	^{A}۲۳۸۹±۱۶c	^{B}۳۴۷۸±۲۲a	^{B}۱۹۶۷±۱۲d	^{B}۲۲۸۸±۱۵cd	^{B}۲۷۶۷±۱۴b	^{B}۲۱۱۷±۱۵cd	^{C}۲۴۸۰±۱۹c
۳۰	^{A}۲۴۳۱±۲۳d	^{A}۴۱۷۶±۲۱a	^{AB}۲۲۷۸±۲۳d	^{A}۲۵۰۵±۲۵cd	^{A}۳۲۱۰±۱۹b	^{A}۲۴۴۳±۲۲d	^{B}۲۷۰۰±۲۲c
۳۵	^{A}۲۴۲۱±۲۶e	^{A}۴۱۲۷±۲۱a	^{B}۲۲۳۸±۱۸e	^{A}۲۶۳۳±۱۶cd	^{A}۳۲۳۷±۲۴b	^{A}۲۵۶۰±۲۵d	^{A}۲۸۶۷±۲۶c
۴۰	^{A}۲۴۸۹±۱۳d	^{A}۴۰۷۳±۲۲a	^{A}۲۲۸۹±۲۴d	^{A}۲۷۵۳±۲۵cd	^{A}۳۲۴۳±۲۶b	^{A}۲۵۴۸±۲۱d	^{A}۲۹۷۲±۲۷bc
۴۵	^{A}۲۴۲۱±۲۵d	^{A}۳۹۴۵±۲۳a	^{A}۲۳۳۰±۲۰de	^{A}۲۶۷۸±۲۱cd	^{A}۳۳۰۱±۲۴b	^{A}۲۴۲۵±۲۶d	^{A}۲۹۰۴±۲۸c

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

تاثیر بر جمعیت *Pseudomonas fluorescens*

تاثیر کاربرد کودهای مرغی بر جمعیت Pseudomonas fluorescens خاک در جدول ۲ دیده می‌شود. جمعیت Pseudomonas fluorescens در خاک شاهد در طول دوره آزمایش بین ۴۴۵۰ تا ۴۸۶۰ سلول در هر گرم خاک متغیر بود که البته با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند. در تیمار دوم با کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک جمعیت Pseudomonas fluorescens افزایش یافت و در روز پانزدهم به حداکثر مقدار خود، ۷۸۳۰ سلول در هر گرم خاک رسید که نسبت به روز اول ۷۳ درصد افزایش نشان داد. در تیمار سوم، کود مرغی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا جمعیت این باکتری را از روز پانزدهم به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد و تقریباً به نصف مقدار آن (۵۱ درصد) در روز اول رساند و در پایان نیز جمعیت همچنان ۲۳ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار چهارم که در آن کود مرغی تازه با غلظت پایین آنتی‌بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت باکتری کاهش یافت ولی شدت آن کمتر از تیمار سوم بود (۳۹ درصد کاهش) و کمترین تعداد در روز بیستم دیده شد و البته در پایان دوره نیز جمعیت Pseudomonas fluorescens ۵/۶ درصد کمتر از مقدار آن در روز اول بود اما با آن تفاوت معنی‌دار نداشت. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده منجر به افزایش جمعیت Pseudomonas fluorescens شد (۵۸ درصد نسبت به روز اول) ولی تاثیر آن کمتر از کود تازه بود. این نتایج نشان داد که کود مرغی تازه نسبت به کود مرغی کمپوست شده تاثیر بیشتری در افزایش جمعیت Pseudomonas fluorescens داشت. در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده به روش هوازی دیده شد که جمعیت Pseudomonas fluorescens از روز دهم شروع به

کاهش کرد و در روز سی‌ام به حداقل مقدار خود رسید (۲۹/۸ درصد کاهش نسبت به روز اول) و در پایان نیز جمعیت آن ۲۴/۲ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار هفتم جمعیت این باکتری تا روز سی‌ام تفاوت معنی دار نداشت اما پس از آن به طور معنی‌دار افزایش یافت کاهش یافت در پایان جمعیت آن بیشتر از روز اول بود (۲۶ درصد).

جدول ۲: جمعیت Pseudomonas fluorescens در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی برحسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	A۴۴۵۰±۳۳a	D۴۵۱۰±۴۳a	A۴۳۸۹±۴۶a	A۴۴۳۸±۳۶a	D۴۲۸۰±۴۴a	A۴۳۲۵±۳۳a	B۴۴۷۸±۴۷a
۵	A۴۵۲۱±۴۲a	D۴۷۲۸±۴۱a	A۴۳۶۷±۲۲a	A۴۳۷۸±۴۷a	D۴۴۳۶±۴۵a	A۴۱۴۵±۳۸ab	B۴۳۷۳±۳۸a
۱۰	A۴۸۶۰±۴۶a	D۴۸۲۱±۴۱a	A۴۲۷۸±۳۹bc	A۴۲۰۰±۴۳bc	D۳۹۸۰±۳۳c	B۳۷۸۰±۳۵c	B۴۴۸۰±۳۹b
۱۵	A۴۸۲۲±۴۴b	C۵۴۲۰±۴۸a	D۲۱۴۶±۴۹e	B۳۸۷۰±۳۱d	D۴۴۷۰±۳۴bc	B۳۵۶۸±۳۸d	B۴۲۵۷±۴۳c
۲۰	A۴۶۵۰±۴۷c	ABv۳۵۰±۴۷a	D۲۲۶۷±۲۲ef	D۲۶۷۵±۲۷e	C۵۴۷۸±۳۶b	B۳۴۷۸±۳۴d	B۴۵۲۰±۴۸c
۲۵	A۴۵۶۷±۴۱c	A۷۷۶۵±۴۲a	D۲۳۵۰±۲۱e	C۲۹۸۶±۲۵d	AB۶۳۹۲±۵۱b	C۳۱۷۸±۳۵d	B۴۷۵۰±۴۹c
۳۰	A۴۶۱۰±۳۸d	A۷۸۳۰±۴۱a	C۲۶۷۸±۲۳f	C۳۱۰۰±۲۹e	A۶۴۸۹±۴۷b	C۳۰۳۵±۳۲e	AB۵۱۰۰±۴۲c
۳۵	A۴۵۸۰±۴۳d	A۷۷۸۵±۴۱a	BC۲۸۹۰±۲۸f	BC۳۴۱۰±۳۶e	A۶۴۵۸±۴۳b	B۳۳۳۰±۴۵e	A۵۴۲۰±۴۶c
۴۰	A۴۴۶۷±۴۲d	A۷۶۵۱±۴۲a	B۳۱۲۷±۳۴de	B۳۶۸۰±۳۵d	A۶۳۶۹±۴۸b	B۳۳۴۶±۳۷d	A۵۶۵۰±۴۷c
۴۵	A۴۳۸۲±۳۹d	B۷۲۸۳±۴۳a	B۳۳۶۰±۲۸e	A۴۱۸۷±۴۱d	A۶۷۸۹±۵۰b	BC۳۲۷۸±۳۶e	A۵۶۷۵±۳۶c

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

تاثیر بر جمعیت *Pseudomonas putida*

تاثیر کاربرد کودهای مرغی بر جمعیت Pseudomonas putida خاک در جدول ۳ دیده می‌شود. جمعیت Pseudomonas putidaدر خاک شاهد بدون کاربرد کود مرغی بین ۳۱۶۷ تا ۳۶۳۳ سلول در هر گرم خاک متغیر بود. جمعیت باکتری در روز آخر به طور معنی‌داری کمتر از سایر روزها بود. کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک در تیمار دوم منجر به افزایش معنی‌دار جمعیت Pseudomonas putida شد و در روز بیستم به حداکثر مقدار خود، ۵۱۲۰ سلول در هر گرم خاک رسید که ۵۳ درصد نسبت به روز اول افزایش نشان داد. کاربرد کود مرغی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا، جمعیت باکتری را از روز دهم کاهش داد و کمترین جمعیت در روز ۲۵ دیده شد که نسبت به روز اول ۱۴/۶ درصد کاهش داشت. در پایان نیز جمعیت همچنان ۱۱/۵ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار چهارم که در آن کود مرغی تازه با غلظت پایین آنتی‌بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت Pseudomonas putidaدر روز پانزدهم در خاک به کمترین مقدار رسید و ۱۴/۴ درصد کمتر از روز اول بود اما از

روز ۲۵ به بعد رو به افزایش گذاشت و در پایان به ۳۷۲۵ سلول در گرم خاک (۱۱/۳ درصد بیشتر از روز اول) رسید. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده منجر به افزایش جمعیت باکتری شد و در پایان دوره جمعیت آن به ۴۷۱۳ سلول در هر گرم خاک رسید که مشابه کاربرد کود مرغی تازه بود. این نتایج نشان داد که تاثیر کود مرغی تازه و کود مرغی کمپوست شده بر جمعیت Pseudomonas putidaتقریبا یکسان بود. در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده به روش هوازی دیده شد که جمعیت Pseudomonas putidaابتدا اندکی افزایش یافت ولی چند روز بعد در روز پانزدهم دوباره کاهش یافت (هفت درصد) و این جمعیت تا پایان تقریباً به همین شکل باقی ماند. در تیمار هفتم کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده به روش هوازی تاثیر معنی داری بر جمعیت Pseudomonas putida نداشت.

جدول ۳: جمعیت Pseudomonas putidaدر خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی برحسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	A۳۳۳۰±۳۶a B	D۳۳۴۵±۲۳a	A۳۲۵۰±۳۶a	AB۳۳۴۷±۲۹a	C۳۲۷۴±۳۴a	B۳۳۴۸±۲۴a	A۳۴۶۸±۳۷a
۵	A۳۳۸۶±۳۳a	D۳۴۷۶±۲۱a	A۳۲۳۶±۳۲a	B۳۲۸۴±۲۶a	C۳۲۲۸±۲۵a	AB۳۴۷۸±۳۱a	A۳۳۴۰±۲۸a
۱۰	A۳۶۳۳±۴۱a	D۳۵۶۸±۳۱a	A۳۲۵۸±۲۹bc	B۳۱۰۸±۲۹bc	C۲۹۴۵±۲۳c	A۳۷۶۰±۳۳a	A۳۳۱۵±۳۱b
۱۵	A۳۶۱۵±۴۲b	C۴۱۲۷±۲۸a	B۲۸۷۹±۲۹e	C۲۸۶۳±۲۱e	BC۳۳۰۷±۲۴c	B۳۲۲۶±۳۱c	A۳۲۷۰±۳۳c
۲۰	۳۴۸۹±۴۱bc A	A۵۱۲۰±۲۷a	B۲۸۸۰±۲۷d	B۳۱۶۵±۳۷c	B۳۷۸۰±۲۶b	B۳۲۲۵±۳۵c	A۳۴۶۹±۲۸bc
۲۵	A۳۴۹۷±۲۷c	A۵۰۸۰±۳۲a	B۲۷۷۵±۲۳e	B۳۲۲۰±۳۵d	B۳۸۸۹±۳۱b	BC۳۱۰۸±۳۰d	A۳۵۱۵±۲۹c
۳۰	A۳۵۰۵±۳۵c	A۵۱۱۰±۲۱a	B۲۹۰۰±۲۴e	B۳۲۷۰±۲۸c	A۴۷۶۹±۲۷b	B۳۲۴۸±۳۲c	A۳۲۶۸±۳۲cd
۳۵	A۳۴۷۸±۳۳b	AB۴۸۵۸±۲۱a	B۲۸۶۰±۲۵d	A۳۵۶۷±۲۱b	A۴۷۷۸±۳۳a	B۳۲۰۹±۳۵c	A۳۳۲۵±۳۶bc
۴۰	A۳۲۷۸±۳۲c B	B۴۷۶۸±۳۲a	B۲۹۷۴±۳۱d	A۳۶۷۰±۲۷b	A۴۷۶۵±۳۸a	AB۳۴۷۶±۳۱b	A۳۲۵۰±۲۷c
۴۵	B۳۱۶۷±۳۰c	B۴۷۶۹±۳۳a	B۲۸۷۴±۲۱d	A۳۷۲۵±۳۱b	A۴۷۱۳±۳۰a	BC۳۲۷۰±۳۰c	A۳۲۵۵±۲۶c

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

تاثیر بر تنفس خاک

نتایج کاربرد کود مرغی در تیمارهای مختلف بر مقدار تنفس تجمعی خاک مورد آنالیز در طی دوره ۴۵ روزه در جدول ۴ دیده می‌شود. به طور کلی مقدار تنفس تجمعی روندی رو به افزایش داشت و بیشترین مقدار تنفس تجمعی در طول دوره به ویژه ابتدا و انتهای دوره به تیمار سوم با کاربرد کود مرغی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا تعلق داشت. مقدار تنفس کل دوره

۴۵ روزه نیز در جدول ۴ دیده می‌شود. بیشترین مقدار تنفس در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی حاوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده با ۱۲۷ درصد افزایش نسبت به شاهد دیده شد. مقدار کل تنفس در این تیمار با تیمارهای سوم، چهارم و هفتم تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین مقدار تنفس نیز در تیمار اول و بدون کاربرد کود مرغی دیده شد. مقدار کل تنفس در همه تیمارهای کودی بیشتر از تیمار اول بود.

جدول ۴: مقدار تنفس تجمعی در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی برحسب میلی‌گرم گاز CO_2 در هر گرم خاک.

تیمار	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۵	۴۵
T1	۰/۷±۰/۱۱d	۶/۰±۰/۳۱d	۹/۹±۰/۸۸c	۱۱/۱±۱/۱b	۱۵/۱±۱/۱b	۱۹/۷±۱/۱c	۲۱/۷±۱/۱c
T2	۷/۶±۰/۳۳bc	۱۵/۵±۰/۶۳b	۲۱/۴±۱/۶a	۲۷/۳±۱/۴a	۳۳/۸±۱/۹a	۳۶/۶±۱/۹b	۴۳/۴±۲/۳b
T3	۱۰/۲±۰/۴۱a	۱۸/۰±۱/۱a	۲۲/۶±۱/۲a	۲۶/۳±۱/۳a	۳۴/۳±۱/۶a	۴۲/۷±۱/۶a	۴۷/۱±۲/۴ab
T4	۸/۱±۰/۳۴b	۱۶/۷±۰/۷۸b	۲۱/۳±۱/۵a	۲۷/۵±۱/۷a	۳۳/۱±۲/۱a	۳۹/۰±۲/۱ab	۴۴/۵±۲/۳b
T5	۵/۶±۰/۲۶c	۱۰/۱±۰/۵۶c	۱۶/۷±۱/۵b	۲۶/۳±۱/۱a	۳۳/۵±۲/۲a	۳۶/۴±۲/۲b	۴۷/۲±۲/۳ab
T6	۵/۷±۰/۲۷c	۱۰/۵±۰/۶۷c	۱۷/۲±۱/۶b	۲۶/۱±۱/۳a	۳۲/۶±۱/۷a	۳۶/۵±۱/۷b	۴۹/۳±۲/۴a
T7	۵/۶±۰/۳۰c	۱۰/۵±۰/۶۰c	۱۷/۳±۱/۶b	۲۷/۱±۱/۴a	۳۳/۴±۲/۴a	۳۵/۹±۲/۴b	۴۸/۹±۲/۵a

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده. حروف یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

تاثیر بر بیوماس میکروبی

نتایج کاربرد کود مرغی در تیمارهای مختلف بر مقدار کربن بیوماس میکروبی خاک مورد آنالیز در طی دوره ۴۵ روزه در جدول ۵ دیده می‌شود. در روز پنجم بیشترین بیوماس میکروبی به تیمار دوم و چهارم با کاربرد کود دامی تازه بدون آنتی‌بیوتیک و یا حاوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین تعلق داشت که به ترتیب ۹۳ و ۹۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داشتند. پس از آن نیز تیمار سوم، کربن بیوماس میکروبی بالاتری نسبت به بقیه داشت. کمترین بیوماس میکروبی نیز در تیمار اول در خاک شاهد دیده شد. در روز پانزدهم و با گذشت زمان بیشتری از کاربرد کودها، مقدار کربن بیوماس میکروبی نسبت به روز پنجم افزایش یافت و مانند قبل بیشترین مقدار آن در تیمارهای دوم و سوم دیده شد. در روز ۲۵ روند افزایش کربن بیوماس میکروبی همچنان حفظ شد و بیشترین مقدار کربن بیوماس میکروبی در طول دوره در همه تیمارها در این روز دیده شد. ترتیب مقدار کربن بیوماس میکروبی در این روز مانند روز ۱۵ بود. در روز ۴۵ مقدار کربن بیوماس میکروبی نسبت به روز ۲۵ و ۱۵ کمتر شده بود. بیشترین کربن بیوماس میکروبی در تیمارهای دوم، سوم و چهارم دیده شد. سایر تیمارهای کاربرد کود مرغی نیز بدون تفاوت معنی‌دار در بین آنها، در رتبه بعدی قرار داشتند.

جدول ۵: کربن بیوماس میکروبی (mg C/kg Soil) در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۵	۴۳۵±۱۴cd A	D۸۴۷±۲۳a	C۶۷۳±۲۲b	C۸۳۹±۱۱a	D۴۷۷±۱۵c	C۴۸۳±۱۰c	A۴۸۰±۱۸c
۱۵	A۴۷۸±۱۳d	B۱۲۴۶±۲۵a	B۸۷۲±۱۹b	B۱۲۶۸±۱۶a	C۶۶۶±۱۴c	B۶۷۳±۱۱c	A۶۱۱±۱۳c
۲۵	A۴۱۳±۱۶e	A۱۴۷۸±۲۲a	A۱۳۴۷±۲۷b	A۱۴۶۰±۱۴a	A۱۲۸۱±۱۱c	A۱۱۲۳±۱۴d	A۱۲۶۸±۱۹c
۴۵	A۴۴۳±۱۲c	C۹۳۳±۲۳a	B۹۳۳±۲۱a	C۹۳۶±۱۷a	B۷۲۱±۱۰b	B۷۰۷±۱۲b	A۷۱۲±۱۴b

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4-کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

بحث

در مجموع نتایج نشان داد فرایند کمپوست کردن موجب کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. در تعداد زیادی از پژوهش‌های پیشین نیز مشخص شده بود که کمپوست کردن موجب کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در کود دام و طیور می‌شود (Liu *et al*., 2018; Slana and Sollner-Dolenc, 2016; Slana *et al*., 2017) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد و نشان می‌دهد فرایند کمپوست کردن در دمای مناسب در شرایط آزمایشگاهی قادر به کاهش غلظت (۳۵٪ تا ۴۶٪) آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در کود مرغی می‌باشد.

نتایج این پژوهش در مورد جمعیت گروه‌های باکتریایی مورد مطالعه نشان داد که کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک بر جمعیت هر سه گروه میکروبی تاثیر مثبت داشت و تاثیر کود تازه (۵۱ تا ۷۴ درصد) بیشتر از کود کمپوست شده (۴۳ تا ۵۸ درصد) بود (جدول ۱ تا ۳). حضور انروفلوکساسین در کود مرغی و کاربرد آن در مزارع منجر به کاهش جمعیت این باکتری‌ها در خاک‌ها شد (۱۴ تا ۷۳ درصد) و فرایند کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه شدت تاثیرگذاری آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت (جدول ۱ تا ۳). آنتی‌بیوتیک‌های تجزیه نشده در حین فرایند کمپوست نمودن و همچنین حضور متابولیت‌های آنها در کود کمپوست شده احتمالاً همچنان به عنوان یک مهارکننده رشد باکتری‌ها عمل نموده و جمعیت آنها را کاهش داده است (Wei *et al*, 2018). تاثیر منفی آنتی‌بیوتیک بر جمعیت Pseudomonas putidaکمتر از Azotobacter و Pseudomonas fluorescens بود. گروه میکروبی Pseudomonas fluorescens بیشتر از دو گروه دیگر نسبت به انروفلوکساسین حساس بود و بیشترین کاهش معنی‌دار (۷۳ درصد) را نشان داد (جدول ۲). در مورد تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر این سه گروه باکتریایی در گذشته مطالعه زیادی صورت نگرفته است اما برخی مطالعات پراکنده نشان می‌دهد که تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر گروه‌های میکروبی خاص بسیار متنوع و متفاوت است و به عواملی مانند نوع گونه میکروبی (Hammesfahr *et al*., 2008)، نوع آنتی‌بیوتیک (Zielezny *et al*., 2006)، غلظت آن (Thiele-Bruhn and Beck, 2005) و نوع شرایط خاک (Čermák *et al*., 2008) بستگی

دارد. وی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین باعث کاهش جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک در خاک می‌شود. در مطالعه‌ای همسفر و همکاران (۲۰۰۸) اثرات سولفادیازین[1] را برروی گروه‌های مختلف میکروبی بررسی نمودند و گزارش دادند که تغییر در پروفیل پروتئینی Pseudomonasها و protobacterها در روش الکتروفورز کمتر از باکتری‌های دیگر بود و این احتمالاً به دلیل مقاومت ذاتی سویه‌ها در این دو گروه بود. ژو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که انروفلوکساسین در غلظت‌های پایین موجب کاهش رشد باکتری‌های بیماری‌زا در خاک می‌شود ولی به باکتری‌های مفید آسیب نمی‌رساند. اما در غلظت‌های بالا به باکتری‌های مفید نیز آسیب رسانده و موجب کاهش حاصلخیزی خاک می‌شود (Zhou *et al*., 2008). در مجموع به نظر می‌رسد در پژوهش ما، از آنجایی‌که از یک نمونه خاکی استفاده شد که قبلاً هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیکی از منابع خارجی دریافت نکرده بود و همچنین انروفلوکساسین نیز یک آنتی‌بیوتیک مصنوعی می‌باشد، احتمالاً هیچ‌گونه مقاومت میکروبی قبلی در این سه گروه باکتریایی در خاک وجود نداشته و اضافه شدن انروفلوکساسین و متابولیت‌های آن به خاک همراه با کود مرغی به این سه گروه میکروبی مفید در ابتدای دوره آسیب وارد نموده و جمعیت آنها را کاهش داده است اما پس از گذشت زمان کم‌کم مقاومت میکروبی ایجاد شد و در تیمارهای حاوی انروفلوکساسین جمعیت دوباره رو به افزایش گذاشت (جدول ۱ تا ۳)..

نتایج آزمایش تنفس میکروبی نیز مشخص نمود که کاربرد کود مرغی موجب افزایش تنفس میکروبی خاک می‌شود و از آنجا که کود مرغی حاوی کربن آلی و عناصر غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد، این موضوع منطقی به نظر می‌رسد. در این مورد بین کود مرغی تازه و کمپوست شده تفاوت چندانی دیده نشد. حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در کود مرغی مقدار تنفس را چندان تحت تاثیر قرار نداد و حتی سبب افزایش مقدار تنفس (۲۵٪ نسبت به تیمار شاهد متناظر) شد (جدول ۴). نتایج پژوهش‌گران قبلی در این مورد متضاد با یکدیگر می‌باشد (Cui *et al*., 2014, Näslund *et al*., 2008). کوی و همکاران (۲۰۱۴) غلظت‌های ۱، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به خاک اضافه و گزارش کردند مقدار تنفس خاک در روزهای اولیه تغییری نسبت به تیمار شاهد نداشت اما از روز نهم، حضور سیپروفلوکساسین مقدار تنفس را افزایش داد که حتی این افزایش تنفس در بالاترین غلظت نیز دیده شد. آنان این احتمال را دادند که میکروارگانیسم‌های مقاوم از خود آنتی‌بیوتیک و یا از میکروارگانیسم‌های مرده به عنوان منبع کربنی استفاده نموده و موجب افزایش تنفس شده‌اند (Cui *et al*., 2014). بر خلاف این، نسلاند و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند میزان تنفس در خاک محتوی پایرین تحت تاثیر سیپروفلوکساسین کاهش یافت و این کاهش با افزایش غلظت سیپروفلوکساسین شدت پیدا کرد (Näslund *et al*., 2008). تیله برون و بک (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند تنفس خاک تحت تاثیر سولفاپیریدن یا اوکسی‌تتراساسکلین تغییر نکرد (Thiele-Bruhn and Beck, 2005). کوتزرک و همکاران

[1] - sulfadiazin

(۲۰۰۸) نیز با کاربرد کود دامی آغشته به آنتی‌بیوتیک سولفادیازین، کاهش مقدار تنفس خاک را گزارش نمودند که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، شدت کاهش نیز بیشتر شد (Kotzerke *et al*., 2008). با این‌حال در پژوهشی دیگر کوتزرک و همکاران (۲۰۱۱) کود دامی آغشته به دیفلوکساسین۱ را به خاک اضافه و گزارش کردند که این عمل تنفس خاک را نسبت به شاهد افزایش داد (Kotzerke *et al*., 2011).

زیلنزی و همکاران (۲۰۰۶) دو آنتی بیوتیک سولفادیزین و کلروتتراسایکلین را به خاک در غلظت‌های مختلف اضافه نمودند و گزارش کردند مقدار تنفس پایه خاک در حضور سولفادیازین و کلروتتراسایکلین در یک دوره ۲۰ روزه تغییر معنی‌داری نداشت. در پژوهش آنان مقدار تنفس برانگیخته در حضور گلوکز تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک سولفادیازین کاهش یافت ولی در حضور کلروتتراسایکلین تغییری نکرد (Zielezny *et al*., 2006). آنان این عدم تغییر در مقدار تنفس را به غیرفعال شدن سریع کلروتتراسایکلین در خاک‌های لوویسول دانستند. در پژوهش دیگری وکلاویک و همکاران (۲۰۰۴) اعلام کردند که تنفس خاک در حضور آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سولفونامید و سولفاکلروپیریدازین در غلظت‌های ۶۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بین ۱/۳ تا ۱/۷ برابر بیشتر از تنفس معمولی خاک شد. این پژوهش‌گران به دلیل استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از خاک در پایان دوره و همچنین عدم وجود فاز تاخیری در رشد میکروبی، استدلال کردند که خود آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک ماده غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار نگرفته‌اند اما دلیل افزایش تنفس نیز برایشان ناشناخته باقی ماند (Vaclavik *et al*., 2004). به نظر می‌رسد نوع آنتی‌بیوتیک، نوع جامعه میکروبی خاک و شرایط تغذیه‌ای خاک بر مقدار تنفس خاک تاثیرگذار بوده است و در برخی مواقع منجر به نتایج متضاد می‌شود. در پژوهش ما این احتمال وجود دارد که آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک غیرفعال شده باشند و بر مقدار تنفس تاثیری نداشته باشند. یکی دیگر از دلایل احتمالی ممکن است این باشد که با کاربرد آنتی‌بیوتیک ضد باکتریایی، فعالیت باکتری‌ها کاهش یافته ولی فعالیت قارچ‌های تجزیه کننده مواد آلی افزایش یافته و در نهایت سبب افزایش تنفس شده باشد.

نتایج بیوماس میکروبی نیز نشان داد که کاربرد کود مرغی کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد و تاثیر کود مرغی تازه در این مورد بیشتر بود. وجود آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا در کود مرغی تاثیر منفی در روند افزایشی کربن بیوماس میکروبی به‌ویژه در ابتدای دوره داشت. اگرچه در پایان دوره مقدار کربن بیوماس میکروبی در تیماره ای کود مرغی تازه یکسان بود (جدول ۵). این موضوع نشان داد که در ابتدای دوره وجود آنتی‌بیوتیک در کود می‌تواند موجب تاخیر در رشد برخی میکروارگانیسم‌ها شده و جمعیت‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار دهد. در پژوهشی کولینز و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند اضافه کردن مخلوط اوکسی‌تتراساسکلین و آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم خاک سبب کاهش بیوماس میکروبی

[1] - difluxacin

خاک شد (Colinas *et al.*, 1994). با این‌حال کوردوبا و اسکو (۲۰۰۷) گزارش نمودند اضافه کردن سیپروفلوکساسین به خاک سبب افزایش بیوماس میکروبی شد و علت آن را استفاده از این آنتی‌بیوتیک به عنوان منبع کربن عنوان کردند (Cordova-Kreylos and Scow, 2007).

در مجموع این نتیجه به دست آمد که حضور انروفلوکساسین در کود مرغی و کاربرد آن در خاک‌های کشاورزی، جمعیت سه گروه باکتری مورد مطالعه را کاهش داد. کمپوست نمودن کود مرغی قبل از مصرف نیز نیز تاثیر منفی آنتی‌بیوتیک‌ها بر جمعیت سه گروه باکتری مورد مطالعه را به طور کامل حذف نکرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که کمپوست نمودن کود مرغی قبل از کاربرد آن در مزارع موجب کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در کود شده و از ورود آن به خاک‌های کشاورزی و محیط زیست تاحدی جلوگیری می‌کند. نتایج پژوهش همچنین نشان داد که کاربرد کود مرغی تازه و یا کمپوست شده بدون آنتی‌بیوتیک منجر به افزایش جمعیت هر سه گروه میکروبی شد، اما حضور آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در کود مرغی منجر به کاهش جمعیت Azotobacter، Pseudomonas fluorescens و Pseudomonas putida در خاک شد و فرایند کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه شدت تاثیرگذاری آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت. کاربرد کود مرغی همچنین موجب افزایش تنفس میکروبی خاک شد و در این مورد بین کود مرغی تازه و کمپوست شده تفاوت چندانی دیده نشد. حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در کود مرغی سبب افزایش مقدار تنفس شد. کاربرد کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد و تاثیر کود مرغی تازه در این مورد بیشتر بود. وجود آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا در کود مرغی تاثیر منفی در روند افزایشی کربن بیوماس میکروبی به‌ویژه در ابتدای دوره داشت. به طور کلی نتایج پژوهش نشان داد که رهاسازی و انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر افزودن کود مرغی به مزارع حتی اگر قبل از مصرف کمپوست شده باشد، نیز روی گروه‌های باکتریایی مفید خاک موثر است و باعث کاهش رشد آنها می‌شود و در مورد کاربرد کودهای محتوی آنتی‌بیوتیک در خاک‌ها در طولانی مدت باید بررسی‌های بیشتری انجام شود.

منابع

Anderson, J. and Domsch, K. (1978) Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. Soil Biology and Biochemistry 10:207-213.

Čermák, L., Kopecký, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková, K. and Ságová-Marečková, M. (2008) Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. Applied Soil Ecology 40:348-358.

Colinas, C., Ingham, E. and Molina, R. (1994) Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides. Soil Biology and Biochemistry 26:41-47.

Cordova-Kreylos, A.L. and Scow, K.M. (2007) Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. The ISME Journal 1:585.

Cui, H., Wang, S.P., Fu, J., Zhou, Z.Q., Zhang, N. and Guo, L. (2014) Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. Biology and Fertility of Soils 50:939-947.

Davis, K.E., Joseph, S.J. and Janssen, P.H. (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology 71:826-834.

Diao, X., Sun, Y., Sun, Z. and Shen, J. (2004). Effects of Apramycin on microbial activity in different types of soil. Ecology and Environment 13:565-568.

Ding, C. and He, J. (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Applied Microbiology and Biotechnology 87:925-941.

Ding, G.C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K. and Schloter, M. (2014) Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. PLoS One 9:e92958.

Fründ, H.C., Schlösser, A. and Westendarp, H. (2000) Effects of tetracycline on the soil microflora determined with microtiter plates and respiration measurement. Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch 93:244-247.

Grenni, P., Ancona, V. and Caracciolo, A.B. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchemical Journal 136:25-39.

Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K. and Thiele-Bruhn, S. (2008) Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry 40:1583-1591.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology, 60(4): 579-598

Hund-Rinke, K., Simon, M. and Lukow, T. (2004) Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. Journal of Soils and Sediments 4:11.

Katoh, K. and Itoh, K. (1983) New selective media for Pseudomonas strains producing fluorescent pigment. Soil Science and Plant Nutrition 29:525-532.

Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B. and Ok, Y.S. (2011) Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water, Air, & Soil Pollution 214:163-174.

King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Translational Research, 44(2): 301-307.

Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, K., Lamshöft, M., Thiele-Bruhn, S., Schloter, M. and Wilke, B.M. (2011) Influence of difloxacin-contaminated manure on microbial community structure and function in soils. Biology and Fertility of Soils 47:177-186.

Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M. and Schloter, M. (2008) Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. Environmental Pollution 153:315-322.

Kuhlmann, J., Dalhoff, A. and Zeiler, H.J. (2012) Quinolone antibacterials. Springer Science & Business Media

Lewis, K. (2013) Platforms for antibiotic discovery. Nature reviews Drug discovery 12: 371.

Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Zhao, J.L., Yang, J.F. and Zhao, L.F. (2009) Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. Environmental Pollution 157:1636-1642.

Liu, H., Pu, C., Yu, X., Sun, Y. and Chen J. (2018) Removal of tetracyclines, sulfonamides, and quinolones by industrial-scale composting and anaerobic digestion processes. Environmental Science and Pollution Research:1-10.

Näslund, J., Hedman, J.E. and Agestrand, C. (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. Aquatic Toxicology 90:223-227.

Poulsen, P.H., Al-Soud, W.A., Bergmark, L., Magid, J., Hansen, L.H. and Sørensen, S.J. (2013) Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial–Prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. Soil Biology and Biochemistry 57:784-793.

Slana, M., Pahor, V., Cvitkovič Maričič, L. and Sollner-Dolenc, M. (2014) Excretion pattern of enrofloxacin after oral treatment of chicken broilers. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 37:611-614.

Slana, M. and Sollner-Dolenc, M. (2016) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under various laboratory conditions. Environmental Science and Pollution Research 23:4422-4429.

Slana, M., Žigon, D. and Sollner-Dolenc, M. (2017) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under field conditions and its residuals effects to the environment. Environmental Science and Pollution Research 24:1-10.

Thiele-Bruhn, S. and Beck, I.C. (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. Chemosphere 59:457-465.

Thiele-Bruhn, S. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils–a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 166:145-167.

Vaclavik, E., Halling-Sørensen, B. and Ingerslev, F. (2004) Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. Chemosphere 56:667-676.

Vance, E.D., Brookes, P.C. and Jenkinson, D.S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry 19:703-707.

Wei, Z., Wang, J., Zhu, L., Wang, J., and Zhu, G. (2018) Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. Scientific reports, 8(1); 5828

Westergaard, K., Müller, A., Christensen, S., Bloem, J and, Sørensen, S. (2001) Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. Soil Biology and Biochemistry 33:2061-2071.

Zarfl, C., Klasmeier, J. and Matthies, M. (2009) A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. Chemosphere 77:720-726.

Zhou, X., Chen, C., Yue, L., Sun, Y., Ding, H. and Liu, Y. (2008) Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. Environmental Toxicology and Pharmacology 26:272-277.

Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H. and Tappe, W. (2006). Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. Soil Biology and Biochemistry 38:2372-2380.

Effect of chicken manure containing Enrofloxacin on soil respiration, microbial biomass, and population of some beneficial bacteria

M. Mohammadzadeh[1], F. Ghasemian Roudsari[2], A. Hassani[2]*,A. Zamani[4]

Received:2018.6.11
Accepted:2019.4.20

Abstract

The concentration of antibiotics in the soil increases with the addition of fresh or composed chicken manure containing antibiotics and may affect the microbial community of the soil. The purpose of this study is to evaluate the effect of adding chicken manure containing Enrofloxacin to soil on the population of *Azotobacter* spp, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as microbial biomass and respiration of soil. An experiment was conducted in a laboratory for 45 days with 7 treatments and three replications including fresh and composted chicken manure containing Enrofloxacin in two levels of high (26.2 mg kg^{-1}) and low (4.23 mg kg^{-1}) concentrations and manure without any antibiotic based on a completely randomized design. The results showed that the use of chicken manure containing Enrofloxacin reduced the population of *Azotobacter* spp (28%), *Pseudomonas fluorescens* (73%) and *Pseudomonas putida* (14.6%) in the examined soils. However, the composting of chicken manure, reduces its negative effect, but still leads to a decline in bacteria population. The use of fresh chicken manure led to a 127 percent increase in microbial respiration of the soil compared to the control but between other treatments there was no meaningful difference. The use of chicken manure without antibiotic significantly increased the microbial biomass (95%). The presence of Enrofloxacin in poultry manure had a negative effect on the microbial biomass. In general, the release of antibiotics in the soil due to the use of chicken manure on the farm, even if composted prior to the use of it, reduces growth of soil beneficial bacteria.

Keywords: *Azotobacter*, Compost, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*

1- M.Sc. Student, Environmental Science. Dept., Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran

2 – Assist. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran

3- Assist. Prof., Soil Sci. Dept., Faculty of Agriculture, Univ. of Zanjan, Iran

* (Corresponding author: Akbar.Hassani@znu.ac.ir)

4- Assist. Prof., Environmental Science, Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran