14(3) 207-212, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Use of gram-positive phosphate solubilizing bacterium *Bacillus aryabhattai* in warm-water fishpond to reduce the application of phosphorus chemical fertilizer

Nemat Mahmoudi [1*], Mehdi Goli [2], Mohammad Reza Bivareh [1], Mina Jalali [1], Rana Dashtbin [1]

[1]*Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Nur, Iran*
[2]*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources Science, Khazar Institute of Higher Education, Mahmudabad, Iran*

Key Words

Phosphate solubilizing bacteria, Chemical fertilizers, Phosphorus, Warm-water fishpond, Sustainable aquaculture

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the possibility of replacing Triple superphosphate chemical fertilizer with biofertilizers as an environmentally friendly approach.
Materials & Methods: The effect of separate and combined triple superphosphate and biofertilizer application under microcosm (Erlenmeyer contains sediment) was evaluated. Gram-positive Phosphate solubilizing bacteria *Bacillus aryabhattai* strain SB.P3 was used in two levels of inoculation and non-inoculation, and phosphate fertilizer in 4 levels of 0, 30, 70 and 100%. In this experiment, soluble phosphorus, pH and density of solvent bacteria were measured at different times (on days zero (before inoculation), 2, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation).
Result: The results showed that the bacterial density during the experiment in all groups, in first had an increasing trend, then decreased, and again slightly increased. Treatment 6 (70% fertilizer + bacteria) had the highest bacterial density, which in some time periods was significantly different from other treatments. The amount of water soluble phosphate in all groups at first had an increasing trend, then decreased and then increased again. At different time intervals, no significant difference was observed in the mean of dissolved phosphorus in the treatments with the control. Changes in pH of the treatments indicate a sinusoidal trend in different intervals.
Conclusion: Although the bacteria grew well under microcosm and showed good stability in the environment, the results showed that chemical fertilizers and phosphate solubilizing bacteria didn't have a significant effect on fluctuations in soluble phosphorus.

* Corresponding Author's email: n.mahmoudi@modares.ac.ir
Received: 6 June 2021; Reviewed: 9 July 2021; Revised: 10 September 2021; Accepted: 11 October 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.297440.2591

مقاله پژوهشی

استفاده از باکتری گرم مثبت حل‌کننده فسفر *Bacillus aryabhattai* در استخر پرورش ماهیان گرمابی به‌منظور کاهش مصرف کود شیمیایی فسفره

نعمت‌الله محمودی[۱]، مهدی گلی[۲]، محمدرضا بیواره[۱]، مینا جلالی[۱]، رعنا دشت‌بین[۱]*

[۱] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

[۲] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، موسسه آموزش عالی آزاد خزر، محمودآباد، ایران

کلمات کلیدی

باکتری حل‌کننده فسفات
کودهای شیمیایی
فسفر
استخر ماهی گرمابی
آبزی پروری پایدار

چکیده

اهداف: هدف از این تحقیق، بررسی امکان جایگزینی کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل با کودهای زیستی به‌عنوان یک رویکرد دوستدار محیط‌زیست بود.

مواد و روش‌ها: اثر کاربرد جداگانه و تلفیقی کود زیستی و شیمیایی در شرایط میکروکازم (ارلن حاوی رسوب) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌منظور، باکتری گرم مثبت حل‌کننده فسفات *Bacillus aryabhattai* strain SB.P۳ در دو سطح تلقیح و عدم تلقیح و کود فسفات در ٤ سطح ۰، ۳۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد استفاده شد. در این آزمایش، فسفر محلول، pH و تراکم باکتری‌های حل‌کننده فسفر در زمان‌های مختلف (در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از تلقیح) مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که تراکم باکتری در طی آزمایش در همه گروه‌ها ابتدا دارای یک روند افزایشی سپس کاهشی و مجدداً کمی افزایشی بود. تیمار ٦ (۷۰ درصد کود+ باکتری) دارای بیش‌ترین تراکم باکتری بودکه در برخی بازه‌های زمانی اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. میزان فسفات محلول آب در همه گروه‌ها ابتدا دارای یک روند افزایشی سپس کاهشی و مجدداً افزایشی بود. در بازه‌های زمانی مختلف، تفاوت معنی‌داری در میانگین فسفر محلول در تیمارها با شاهد مشاهده نشد. تغییرات pH تیمارها حاکی از روند سینوسی در بازه‌های مختلف می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: با وجود این که باکتری‌ها در شرایط میکروکازم به‌خوبی رشد کردند و تثبیت مناسبی در محیط نشان دادند اما نتایج نشان داد که کود شیمیایی و باکتری حل‌کننده فسفر اثر معنی‌داری بر نوسانات فسفر محلول نداشتند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: n.mahmoudi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱٦ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۸ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۹ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۹ مهر ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.297440.2591

مقدمه

فسفر یکی از موادمغذی محدودکننده در کنترل تولیدات اولیه اکوسیستم‌های آبی ازجمله استخرهای ماهیان گرمابی است (۱، ۲، ۳). به‌منظور افزایش سطح مواد مغذی (به‌ویژه نیتروژن و فسفر) در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی و افزایش تولید ماهی انواع مختلفی از کودها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). فسفر اضافه شده از طریق کود پس از ورود به اکوسیستم خصوصاً مزارع پرورش ماهی اغلب به صورت ترکیب با فلزات مختلف ازجمله کلسیم، آلومینیوم و آهن رسوب کرده و از دسترس خارج می‌گردد (تا ۹۰درصد). بنابراین، سطوح محلول و قابل‌دسترس فسفات ممکن‌است در برخی از مزارع پرورش ماهی باعث محدود شدن تولیدات اولیه گردد (۵). پایین بودن سطح فسفرمحلول درمزارع پرورش ماهیان گرمابی منجربه کاهش تولیدات اولیه می‌گردد. این امر موجب مصرف روزافزون کودهای شیمیایی به‌منظور دستیابی به سطح مطلوب فسفر شده است. مصرف بی‌رویه این کودها موجب به‌هم زدن توازن عناصر غذایی خاک، نابودی میکروارگانیسم‌ها و مخاطرات زیست محیطی به‌ویژه آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی می‌شود (۵). از مهم‌ترین روش‌های افزایش فسفات قابل دسترس و استفاده بهینه از فسفر انباشته شده در رسوبات استخرها (کمپلکس‌های آلی و معدنی)، استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفر در قالب کود زیستی به‌عنوان یک رویکرد دوستدار محیط‌زیست می‌باشد (۶، ۷). کودهای زیستی فاقد مواد سمی بوده و باعث بهبود تولیدمحصولات کشاورزی و ویژگی‌های زیستی، فیزیکی و شیمیایی خاک می‌شوند (۸، ۹). در این راستا، باکتری‌ها مهم‌ترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که موردبررسی قرار می‌گیرند. باکتری‌های حل‌کننده فسفر از طریق تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم و هم‌چنین ترشح آنزیم‌های مختلف ازجمله فسفاتاز و فیتاز باعث آزاد شدن فسفر از ترکیبات دارای این عنصر می‌شوند (۱۰، ۱۱). در این راستا، استفاده از باکتری‌های گرم‌مثبت به‌دلیل قابلیت‌های مختلف آن‌ها از جمله توانایی تشکیل اندوسپور که سبب زنده‌مانی بالاتر در فرآیند تولید، ذخیره‌سازی، نوسانات شرایط محیطی و فشار چرای شکارچی می‌شود، بیش‌تر مورد توجه می‌باشند (۱۲، ۱۳). با توجه به اثربخشی سریع کودهای شیمیایی و زمان‌بر بودن فرایند تثبیت و آغاز فعالیت میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در محیط، جهت افزایش تولید و هم‌چنین کاهش آثار منفی کودهای شیمیایی، تأثیر تلفیق این دو نوع کود بر محصولات مختلف توسط محققان حوزه کشاورزی پیشنهاد شده است. مطابق قانون برنامه پنج‌ساله پنجم توسعه ایران، کاهش ۳۵ درصدی کودهای شیمیایی تا پایان برنامه از طریق ترویج استفاده از کودهای آلی و زیستی مورد نظر می‌باشد. تحقیقات انجام‌شده در حوزه کشاورزی حاکی از تأثیر مثبت تلفیق کود شیمیایی و زیستی فسفات در کاهش مصرف کود شیمیایی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تحقیقات Yousefipor و همکاران (۱۴)، Mukhongo و همکاران (۱۵)، Chittapun و همکاران (۱۶) اشاره نمود. با وجود کسب نتایج مطلوب در گیاهان باغی و زراعی مختلف، مطالعات اندک در حوزه شیلات و آبزی‌پروری ازجمله تحقیقات Sahu و Jana (۱۷)، Hu و همکاران (۱۸) و Maitra و همکاران (۷) نیز به نقش باکتری‌های حل‌کننده فسفات در افزایش فسفر محلول آب و کاهش مصرف کود شیمیایی اشاره کرده‌اند. در مطالعه پیش‌رو، تأثیر کاربرد جداگانه و تلفیقی درصدهای مختلف کودشیمیایی و زیستی فسفات حاوی باکتری گرم‌مثبت حل‌کننده فسفر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و زیستی رسوب و آب استخرهای پرورش ماهیان گرمابی موردارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: این آزمایش به‌مدت یک‌ماه در آزمایشگاه هیدروبیولوژی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. آزمایش با دو عامل کودشیمیایی فسفاته در چهار سطح ۰، ۳۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد میزان توصیه‌شده سازمان شیلات (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و کود زیستی حاوی باکتری حل‌کننده فسفات (MT۷۵۷۹۳۳) *Bacillus* SB.P۳ *aryabhattai* strain در دو سطح تلقیح و عدم تلقیح انجام شد. باکتری مورد نظر، طی تحقیقات پایان‌نامه دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس درسال‌های اخیر از رسوب استخرماهیان گرمابی مناطق میانی استان مازندران جداسازی و شناسایی شده بود (۱۹). فسفات محلول، pH و اکسیژن در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از تلقیح مورد سنجش قرار گرفت. تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق به شرح زیر بود: گروه شاهد: بدون تلقیح کود شیمیایی و باکتری، تیمار۱: ۱۰۰ درصدمیزان توصیه‌شده کود شیمیایی، تیمار ۲: ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۳: ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۴: باکتری (بدون کود شیمیایی)، تیمار۵: باکتری+ ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار ۶: باکتری+ ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۷: باکتری+ ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی آب، رسوبات استخر و آزمایشگاه: از رسوبات سطحی (۱۰-۰ سانتی‌متری) یکی از آب‌بندان‌های شهرستان محمودآباد مازندران با موقعیت جغرافیایی "۱۲'۶۰°۳۶ درجه شمالی و "۷۱ '۲۱ °۵۲ درجه شرقی نمونه‌برداری با استفاده از دستگاه نمونه‌بردار ون‌وین گرب انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون زیپ کیپ قرار گرفت و در مجاورت یخ به آزمایشگاه هیدروبیولوژی

دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. نمونه‌های رسوب و آب، پس از انتقال به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی با نسبت ۱:۱۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه اتوکلاو و استریل شد. برای هر ارلن حدود ۱۰ گرم رسوب و ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر در نظر گرفته شد (۱۹). سپس ارلن‌ها بر حسب نوع تیمار، با کود سوپرفسفات تریپل (با درصدهای مختلف) و باکتری SB.P۳ تلقیح شد.

معرفی سویه SB.P۳ و اعمال کود سوپرفسفات تریپل به دورن ارلن‌ها: جهت ارزیابی عملکرد سویه SB.P۳ در این محیط، ابتدا این سویه در محیط کشت نوترینت براث به‌مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور شیکردار (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. جمعیت باکتری‌ها براساس روش کلنی کانت (تعداد کلنی‌های شمارش شده× عکس رقت×۱۰)(۲۰) به‌دست آمد. به‌منظور ایجاد محیط میکروکازم، ۱۰ گرم رسوب تازه به‌همراه ۹۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با یکدیگر ترکیب و درون اتوکلاو استریل شد (۱۹). سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت نوترینت براث حاوی جدایه‌های باکتریایی (با جمعیت $۲-۴\times۱۰^{۶}$) برداشت و به محیط میکروکازم تلقیح شد. کود سوپرفسفات تریپل نیز پس از حل کردن در آب مقطر و استریل نمودن، در سه سطح ۳۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده به تیمارهای مورد نظر اضافه گردید (۲۱). از گروه بدون تلقیح نیز به‌عنوان گروه شاهد استفاده شد.

سنجش میزان فسفر محلول در آب: نمونه آب ارلن‌ها در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از تلقیح باکتری و کود، برداشته شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها، میزان فسفر محلول به‌روش Murphy و Riley مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). در این روش، یون ارتوفسفات با آمونیوم مولیبدات در محلول اسیدی واکنش می‌دهد و اسید فسفومولیبدیک را ایجاد می‌کند. این ترکیب پس از کاهش با اسیداسکوربیک، یک کمپلکس آبی‌رنگ ایجاد می‌کند. میزان جذب نوری این کمپلکس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۶۳۰۵، شرکت jenway) درطول موج ۸۸۰ نانومتر قرائت شد.

سنجش pH آب: پس از سانتریفیوژ نمونه‌های آب جمع‌آوری شده از ارلن (به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت چرخش ۵۰۰۰ دور در دقیقه) و حذف ذرات معلق آن، میزان pH (با استفاده از دستگاه pH سنج JENWAY مدل ۳۵۱۰ ساخت انگلستان) در سوپرناتانت اندازه‌گیری و ثبت شد.

شمارش جمعیت سویه SB.P۳: شمارش جمعیت سویه SB.P۳ در بازه‌های زمانی مختلف با استفاده از روش شمارش پلیت انجام شد. بر این اساس، نمونه رسوب، پس از تهیه رقت‌های متوالی در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها شمارش و جمعیت باکتری‌ها از طریق تقسیم تعداد کلنی شمارش شده بر رقت مورد استفاده محاسبه شد (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: جهت مقایسه مقدار فسفر محلول آب در بازه‌های زمانی مختلف در بین تیمارها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA)، جهت مقایسه میانگین‌ها آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) نیز برای تحلیل آماری و آنالیز توصیفی استفاده شد.

نتایج

جمعیت باکتریایی: در تیمارهایی که باکتری حل‌کننده فسفر تلقیح نشد (شاهد، ۱، ۲ و ۳)، آلودگی باکتریایی و قارچی خاصی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که تراکم باکتری در طی زمان در همه گروه‌ها ابتدا دارای یک روند افزایشی سپس کاهشی و مجددا کمی افزایشی بود. تیمار ۶ (۷۰ درصد کود+ باکتری) دارای بیش‌ترین تراکم باکتری بود که در برخی بازه‌های زمانی اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (شکل ۱ و جدول ۱).

میزان فسفر محلول: نتایج نشان داد که میزان فسفات محلول آب در همه گروه‌ها ابتدا دارای یک روند افزایشی سپس کاهشی و مجدداً افزایشی بود. مقایسه میانگین فسفر محلول تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد (شکل ۲ و جدول ۲).

تغییرات pH: نتایج تغییرات pH تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف حاکی از روند سینوسی در بازه‌های مختلف می‌باشد. یک روند کاهشی در روز ۱۵ برای همه تیمارها مشاهده شد که مجدداً در روز آخر روند افزایشی بود (شکل ۳ و جدول ۳).

جدول ۱: مقایسه میانگین تراکم باکتریایی (تعداد کلنی در میلی لیتر) بین تیمارهای آزمایشی (میانگین± انحراف معیار)

روز / تیمار	۲	۵	۱۰	۱۵	۲۰
تیمار ۴	۱۸۳/۱۶۵±۸۸/۰۳^{b}	۲۹۴/۱۵۰±۵۵/۴۵	۵۳۸/۳۱۲±۸۸/۰۷^{b}	۵۵۰/۳۱۵±۵۵/۹۴	۸۲۴/۸۷۶±۲۲/۴۷
تیمار ۵	۱۹۱/۱۶۷±۰۰/۳۵^{b}	۲۴۲/۱۶۵±۱۱/۷۳	۶۰۶/۴۰۵±۷۷/۸۲^{b}	۶۲۴/۳۲۱±۸۸/۸۲	۵۵۱/۳۳۱±۰۰/۲۱
تیمار ۶	۴۱۷/۲۴۳±۱۱/۵۴^{a}	۳۸۸/۳۵۳±۲۲/۰۱	۱۱۱۴/۸۵۰±۰۰/۷۸^{a}	۶۸۲/۵۴۸±۲۲/۴۷	۱۰۵۰/۷۳۱±۱۱/۵۱
تیمار ۷	۱۰۷/۱۶۲±۳۳/۸۸^{b}	۳۳۲/۳۴۶±۸۸/۸۱	۳۸۶/۲۵۹±۸۸/۴۵^{b}	۳۸۵/۲۶۰±۱۱/۴۰	۴۲۵/۲۷۶±۲۲/۵۹

* حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین میانگین داده‌ها در روزهای مختلف در گروه تیمار می‌باشد($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: مقایسه میانگین فسفر محلول در آب (میلی‌گرم بر لیتر) بین تیمارهای آزمایشی در روزهای مختلف (میانگین± انحراف معیار)

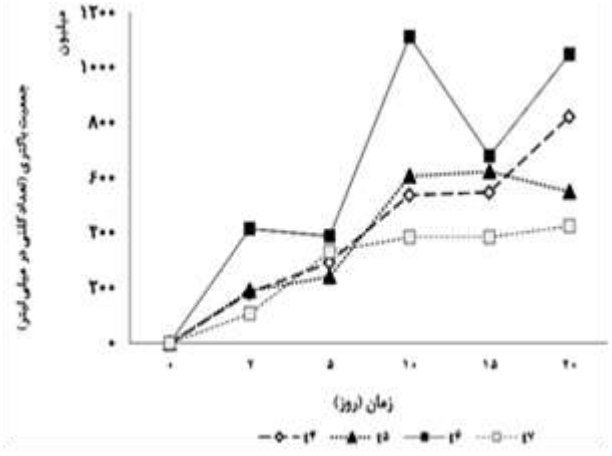
روز / تیمار	صفر	۲	۵	۱۰	۱۵	۲۰
گروه شاهد	۰/۰۰۵۸±۰/۰۰	۰/۰۲۸۵±۰/۰۲	۰/۰۲۴۱±۰/۰۰	۰/۰۲۱۴±۰/۰۰	۰/۰۲۷۶±۰/۰۰^{ab}	۰/۰۴۲۳±۰/۰۰
تیمار ۱	۰/۰۰۶۸±۰/۰۰	۰/۰۱۷۲±۰/۰۰	۰/۰۲۳۸±۰/۰۰	۰/۰۱۸۰±۰/۰۰	۰/۰۳۱۶±۰/۰۰^{a}	۰/۰۴۳۱±۰/۰۱
تیمار ۲	۰/۰۰۵۷±۰/۰۰	۰/۰۲۰۸±۰/۰۰	۰/۰۲۷۹±۰۰	۰/۰۱۸۹±۰/۰۰	۰/۰۲۸۴±۰/۰۰^{ab}	۰/۰۳۵۱±۰/۰۰
تیمار ۳	۰/۰۱۵۳±۰/۰۱	۰/۰۱۵۲±۰/۰۰	۰/۰۲۳۸±۰/۰۰	۰/۰۱۸۵±۰/۰۰	۰/۰۲۲۹±۰/۰۰^{bc}	۰/۰۳۸۰±۰/۰۱
تیمار ۴	۰/۰۰۹۱±۰/۰۰	۰/۰۲۳۸±۰/۰۰	۰/۰۲۵۰±۰/۰۰	۰/۰۲۴۱±۰/۰۰	۰/۰۲۱۴±۰/۰۰^{bc}	۰/۰۳۸۳±۰/۰۰
تیمار ۵	۰/۰۰۹۴±۰/۰۰	۰/۰۲۴۱±۰/۰۰	۰/۰۲۸۱±۰/۰۰	۰/۰۲۳۳±۰/۰۱	۰/۰۱۷۷±۰/۰۰^{c}	۰/۰۳۹۰±۰/۰۰
تیمار ۶	۰/۰۰۸۱±۰/۰۰	۰/۰۲۰۷±۰/۰۰	۰/۰۲۱۰±۰/۰۰	۰/۰۲۱۲±۰/۰۰	۰/۰۲۱۲±۰/۰۰^{bc}	۰/۰۴۴۱±۰/۰۱
تیمار ۷	۰/۰۱۷۹±۰/۰۱	۰/۰۲۱۷±۰/۰۰	۰/۰۳۶۶±۰/۰۱	۰/۰۲۴۱±۰/۰۰	۰/۰۱۶۵±۰/۰۰^{c}	۰/۰۳۹۰±۰/۰۰

* حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین میانگین داده‌ها در روزهای مختلف در گروه تیمار می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۳: مقایسه میزان pH بین تیمارهای آزمایشی در روزهای مختلف (میانگین± انحراف معیار)

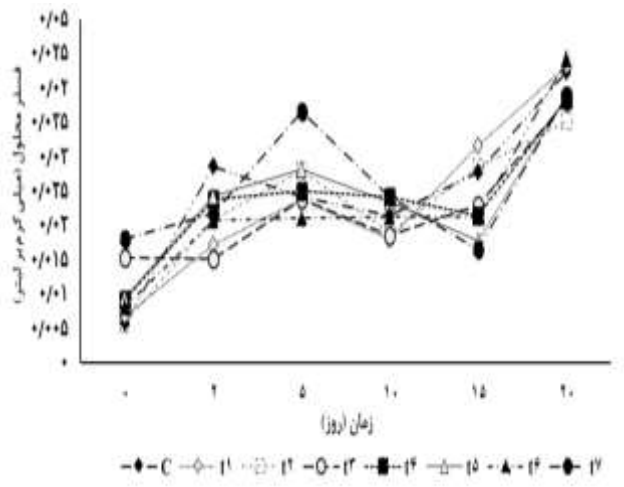
روز / تیمار	صفر	۲	۵	۱۰	۱۵	۲۰
گروه شاهد	۷/۰±۸۰/۱۰	۶/۰±۹۳/۰۵	۷/۰±۴۳/۰۵	۷/۰±۲۰/۱۰^{b}	۶/۰±۵۰/۳۶^{ab}	۷/۰±۰۰/۲۰^{c}
تیمار ۱	۷/۰±۹۰/۱۰	۶/۰±۸۳/۱۱	۷/۰±۵۰/۱۰	۷/۰±۷۳/۰۵^{a}	۵/۱±۴۰/۵۷^{b}	۷/۰±۳۰/۱۰^{b}
تیمار ۲	۷/۰±۸۷/۰۵	۶/۰±۹۷/۲۵	۷/۰±۲۷/۱۵	۷/۰±۵۰/۲۰^{ab}	۶/۰±۳۷/۴۱^{ab}	۷/۰±۴۷/۰۵^{ab}
تیمار ۳	۷/۰±۸۷/۰۵	۶/۰±۸۰/۱۷	۷/۰±۲۷/۱۵	۷/۰±۷۰/۱۰^{ab}	۶/۰±۲۷/۵۱^{ab}	۷/۰±۵۳/۱۱^{ab}
تیمار ۴	۷/۰±۹۰/۰۰	۶/۰±۷۰/۰۰	۷/۰±۲۷/۱۵	۷/۰±۶۷/۲۳^{ab}	۶/۰±۱۷/۳۷^{ab}	۷/۰±۵۳/۰۵^{ab}
تیمار ۵	۷/۰±۹۷/۱۱	۶/۰±۶۳/۳۲	۷/۰±۲۳/۲۰	۷/۰±۲۰/۲۰^{b}	۶/۰±۰۰/۴۳^{ab}	۷/۰±۵۳/۰۵^{ab}
تیمار ۶	۷/۰±۷۷/۰۵	۶/۰±۶۳/۰۵	۷/۰±۵۰/۱۰	۶/۰±۶۷/۵۵^{c}	۶/۰±۵۷/۱۱^{ab}	۷/۰±۶۷/۰۵^{a}
تیمار ۷	۷/۰±۹۷/۱۱	۶/۰±۸۳/۱۵	۷/۰±۴۷/۱۱	۷/۳۰±۲۳^{ab}	۶/۰±۸۰/۲۶^{a}	۷/۰±۵۰/۲۶^{ab}

* حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین میانگین داده‌ها در روزهای مختلف در گروه تیمار می‌باشد (p<۰/۰۵).



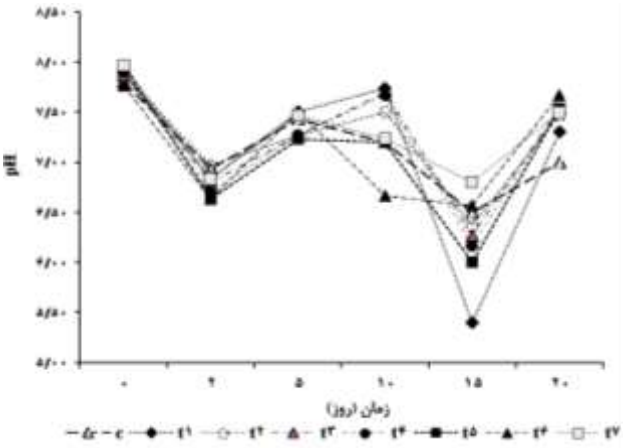
شکل ۱: مقایسه جمعیت سویه SB.P۳ بین تیمارهای مختلف

تیمار۴ (t4): باکتری (بدون کود شیمیایی)، تیمار۵ (t5): باکتری+ ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۶ (t6): باکتری + ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۷ (t7): باکتری + ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی



شکل ۲: سطح فسفات محلول آب در تیمار های مختلف طی روزهای مختلف

گروه شاهد(C): بدون تلقیح کود شیمیایی و باکتری، تیمار۱(t1): ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۲ (t2): ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۳ (t3): ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۴ (t4): باکتری (بدون کود شیمیایی)، تیمار۵ (t5): باکتری + ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۶ (t6): باکتری + ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۷ (t7): باکتری + ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی.



شکل ۳: تغییرات pH تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف

گروه شاهد(C): بدون تلقیح کود شیمیایی و باکتری، تیمار۱(t1): ۱۰۰ درصد میزان توصیه‌شده کود شیمیایی، تیمار۲ (t2): ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۳ (t3): ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۴ (t4): باکتری (بدون کود شیمیایی)، تیمار۵ (t5): باکتری + ۱۰۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۶ (t6): باکتری + ۷۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی، تیمار۷ (t7): باکتری + ۳۰ درصد میزان توصیه شده کود شیمیایی

بحث

در این تحقیق، به‌طور کلی نتایج نشان داد که کود شیمیایی و باکتری حل‌کننده فسفر تأثیر معنی‌داری بر نوسانات میزان فسفر محلول در شرایط میکروکازم نداشته است. این موضوع می‌تواند به‌دلیل نرخ بالای تثبیت فسفر در رسوب در مقابل انحلال و آزادسازی آن توسط باکتری‌باشد. باند شدن فسفر با کاتیون‌ها مخصوصاً در شرایط قلیایی (شرایط غالب استخر پرورشی) و اکسیژنی پدیده بسیار غالبی است (۷) در این مطالعه، حتی در برخی تیمارهای حاوی باکتری میزان فسفر کم‌تربود (روز ۱۵) که شاید نشان‌دهنده مصرف یا ذخیره‌فسفر توسط باکتری‌ها برای رشد و متابولیسم خودشان باشد (۲۳). این مطالعه بر خلاف نتایج Arjmand و همکاران بوده است که تاثیر معنی‌دار این سویه را در شرایط میکروکازم گزارش کرده‌اند (۱۹). نتایج تحقیقات Armandeh و همکاران نیز حاکی از افزایش معنی‌دار غلظت فسفر در اثر کاربرد کود زیستی در شرایط مزوکازم بود (۵). این اختلاف می‌تواند به‌دلیل تفاوت در ترکیب و بافت رسوب مورد استفاده، فصل نمونه‌برداری، منبع آب ورودی، میزان و نوع کود مورد استفاده، بافت خاک منطقه، نوع باکتری مورد استفاده، تفاوت محیط آزمایش و غیره باشد. به‌علاوه، محققان زیادی اثر مطلوب کود زیستی فسفاته به‌صورت جداگانه و تلفیق آن‌ها با کود شیمیایی را بر عملکرد محصول (که ناشی از افزایش فسفر قابل دسترس است) گزارش نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به Shafiee Adib و همکاران برای گل راعی (*Hypericum perforatum L.*)(۲۴)، Ribaudo و همکاران برای گیاه جو(۲۵) و تحقیقات Galavi و همکاران برای افزایش مقدار فسفر دانه ذرت (۲۶) اشاره کرد. هم‌راستا با این تحقیق برخی محققین نیز گزارش کردند که باکتری حل‌کننده فسفر اثرگذار در محیط کشت آزمایشگاهی مایع، اثری برافزایش فسفر محلول در میکروکازم حاوی رسوب و خاک ندارد (۲۷، ۲۸، ۲۹). این محققین اظهار داشتند که میکروکازم رسوب به‌علت مشابهت بیش‌تر با شرایط واقعی برحسب موادمغذی نیتروژن و فسفر به‌عنوان مرحله مهم‌تری برای اطمینان از حل‌کنندگی فسفر توسط باکتری باید در نظر گرفته شود. دراین تحقیق، در تیمارهای تلقیح شده با SB.P۳، جمعیت باکتری رشد خوبی داشت که این نیز حاکی از تثبیت مناسب این سویه در شرایط میکروکازم بوده است. کاهش نرخ افزایش جمعیت باکتری‌ها در طول آزمایش می‌تواند ناشی از تولید متابولیت‌های سمی توسط همین باکتری‌های باشد که تا حدزیادی بر رشد و تکثیر آن مؤثر بوده است. دسته متنوعی از میکروب‌ها در برخی شرایط قادر به تولید متابولیت‌هایی هستند که نقش عملکردی در تنظیم متابولیسم سلولی، میکروبیوم‌ها و حتی مهار آن‌ها دارند (۳۰). با وجود این‌که محققین زیادی گزارش کردند که کاهش pH توسط باکتری‌ها با ترشح اسیدهای آلی یکی از راهکارهای اصلی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات در انحلال ترکیبات نامحلول این عنصر می‌باشد (۱۸، ۱۱)، اما در این مطالعه روند نوسانات pH نشان می‌دهد که باکتری‌ها به‌عنوان عامل مهم اثرگذار بر روند تغییرات آن نیستند. عامل اصلی این تغییرات می‌تواند ناشی از کنش‌های شیمیایی بین آب و رسوب باشد. این روند با روند تغییرات pH در مطالعه Arjmand و همکاران (۱۹) مطابقت دارد. محققان دیگری از جمله Asea و همکاران (۳۱) و Bianco و Defez (۳۲) نیز وجود یک رابطه ضعیف بین انحلال فسفر و کاهش pH را گزارش کردند. با توجه به نتایج این مطالعه و عدم اثرات مثبت این سویه برخلاف نتایج قبلی گزارش شده از این سویه توسط تیم تحقیقاتی Arjmand و همکاران (۱۹) به‌نظر می‌رسد در زمینه عوامل مؤثر بر انحلال فسفر در استخرهای پرورش ماهی نیاز به تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد. با وجود این‌که باکتری‌ها در شرایط میکروکازم به‌خوبی رشد کردند و تثبیت مناسبی در محیط نشان دادند اما بررسی نتایج حاکی از عدم اثرگذاری معنی‌دار کود شیمیایی و باکتری حل‌کننده فسفر بر نوسانات میزان فسفر محلول در شرایط میکروکازم می‌باشد. این مطالعه نشان داد که اطمینان از اثرگذاری پایدار کود زیستی در همه شرایط محیطی در حوزه کشاورزی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. چرا که در مطالعات قبلی این سویه اثرات مثبت قوی روی انحلال فسفر نشان داده است اما در شرایط جدید این مطالعه اثرات مثبت قبلی تکرار نشد. در زمینه روابط متقابل باکتری حل‌کننده فسفر با شرایط فیزیکی، شیمیایی و زیستی جدید و کشف عوامل محدودکننده کود زیستی انجام مطالعات دقیق‌تر و گسترده‌تر پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از کارشناسان محترم آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس

(آقایان کمالی، حسینی و نورانی) برای همکاری در اجرای این مطالعه، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. **Mahmoudi, N., Ahmadi, M.R., Babanezhad, M. and Seyfabadi, J., 2014.** Environmental variables and their interaction effects on chlorophyll-a in coastal waters of the southern Caspian Sea: assessment by multiple regression grey models. Aquatic Ecology. 48: 351-365.
2. **Eslamizadeh, E., Javaheri Baboli, M. and Dehghan Madiseh, S., 2017.** Study on Species Composition of Zooplankton Communities in Warm Water Fish Ponds in Dezful. J of Animal Environment. 9(2):251-258. (In Persian)
3. **Azarm, L., Javadzadeh, N. and Jalilzadeh, R., 2020.** Investigation of Chlorella vulgaris capacity in absorption of Nitrate and Phosphate from wastewater of fish farming pool in Khuzestan Province. Journal of Animal Environment. 12(2): 291-298. (In Persian)
4. **Boyd, C.E., Wood, C.W. and Thunjai, T., 2002.** Aquaculture pond bottom soil quality management. Pond Dynamics /Aquaculture Collaborative Research Support Program, Oregon State University. 363-377.
5. **Armandeh, M., Mahmoudi, N. and Fallah Nosratabad, A.R., 2019.** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from warm-water fish farms as phosphate biofertilizer candidates. Aquatic Physiology and Biotechnology. 6(4): 121-140. (In Persian)
6. **Jana, B.B., 2007.** Distribution pattern and role of phosphate solubilizing bacteria in the enhancement of fertilizer value of rock phosphate in aquaculture ponds: state-of-the-art. In First international meeting on microbial phosphate solubilization. Springer, Dordrecht. 229-238.
7. **Maitra, N., Manna, S.K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C. and Sharma A.P., 2015.** Ecological Significance and Phosphorus Release Potential of Phosphate Solubilizing Bacteria in Freshwater Ecosystems. Hydrobiologia. 745(1): 69-83.
8. **El-Habbasha, S.F., Hozayn, M. and Khalafallah, M.A., 2007.** Integration effect between phosphorus levels and bio fertilizers on quality and quantity yield of faba bean (*Vicia faba L.*) in newly cultivated sandy soils. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 3(6): 966-971.
9. **Yosefi, K., Galavi, M., Ramrodi, M. and Mousavi, S.R., 2011.** Effect of bio-phosphate and chemical phosphorus fertilizer accompanied with micronutrient foliar application on growth, yield and yield components of maize (Single Cross 704). Australian J of Crop Science. 5(2): 175-180.
10. **Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H.N., 2014.** Diversity, Mechanism and Biotechnology of Phosphate Solubilising Microorganism in Mangrove, a Review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 3(2): 97-110.
11. **Khan, M.S., Ahmad, E., Zaidi, A. and Oves, M., 2013.** Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In Bacteria in agrobiology: Crop productivity. Springer, Berlin, Heidelberg. 237-263.
12. **Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd Allah, E.F., 2017.** *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. Frontiers in Physiology. 8: 1-14.
13. **Ramlucken, U., Lalloo, R., Roets, Y., Moonsamy, G., van Rensburg, C.J. and Thantsha, M.S., 2020.** Advantages of *bacillus* based probiotics in poultry production. Livestock Science. 241: 1-15.
14. **Yousefipor, M., Lack, Sh. and Pavandeh, Kh., 2019.** Evaluation of the Combined Effect of Biological and Chemical Phosphorous Fertilizers and Micronutrient on Seed and Protein Yield of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Crop Ecophysiology. 13(1): 103-120. (In Persian)
15. **Mukhongo, R.W., Tumuhairwe, J.B., Ebanyat, P., AbdelGadir, A.H., Thuita, M. and Masso, C., 2017.** Combined application of biofertilizers and inorganic nutrients improves sweet potato yields. Frontiers in Plant Science. 8: 1-17.
16. **Chittapun, S., Limbipichai, S., Amnuaysin, N., Boonkerd, R. and Charoensook, M., 2018.** Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment. Journal of Applied Phycology. 30(1): 79-85.
17. **Sahu, S.N. and Jana, B.B., 2000.** Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. Ecological Engineering. 15: 27-39.
18. **Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang, J., Gong, Y.X. and Yang, Y.F., 2010.** Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. Aquaculture International. 18(6): 1079-1091.
19. **Arimand, V., Mahmoudi, N. and Fallah Nusratabad, A., 2019.** Isolation, identification and function of bacteria capable of liberating phosphorus from organic compounds of sediments of hydrothermal fish breeding ponds in Mazandaran province. Tarbiat Modares master's thesis. 80 p.
20. **Mpatswenumugabo, J.P.M., Bebora, L.C., Gitao, G.C., Mobegi, V.A., Iraguha, B. and Shumbusho, B., 2019.** Assessment of bacterial contamination and milk handling practices along the raw milk market chain in the north western region of Rwanda. African Journal of Microbiology Research. 13(29): 640-648.
21. **Horvith, L., Tamas, G. and Seagrave, C., 2008.** Carp and Pond Fish Culture: Including Chinese Herbivorous Species, Pike, Tench, Zander, Wels Catfish, Goldfish, African Catfish and Sterlet. 185 p.
22. **Murphy, J. and Riley, J.P., 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica chimica acta. 27: 31-36.
23. **Chen, J., Lu, S., Zhao, Y., Wang, W. and Huang, M., 2011.** Effects of overlying water aeration on phosphorus fractions and alkaline phosphatase activity in surface sediment. J of Environmental Sciences. 23(2): 206-211.
24. **Shafiee Adib, Sh., Amini Dehaghi, M. and Modares Sanavi, S.A.M., 2015.** The effects of Bio fertilizers and chemical phosphorus fertilizers on quantity and quality yield of John, s wort (*Hypericum perforatum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 31(1): 1-15. (In Persian)
25. **Ribaudo, C., Zaballa, J.I. and Golluscio, R., 2020.** Effect of the phosphorus-solubilizing bacterium *Enterobacter Ludwigii* on barley growth promotion. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology and Sciences. 63(1): 144-157.
26. **Galavi, M., Yosefi, K., Ramrodi, M. and Mousavi, S.R., 2011.** Effect of bio-phosphate and chemical phosphorus fertilizer accompanied with foliar application of micronutrients on yield, quality and phosphorus and zinc concentration of maize. Journal of Agricultural Science. 3(4): 22-29.
27. **Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. and Aguilar, O.M., 2010.** Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biology and Fertility of Soils. 46: 727-738.
28. **Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S. and Zhang, M., 2015.** Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Appleid Soil Ecology. 96: 217-224.
29. **Li, H.Z., Bi, Q.F., Yang, K., Zheng, B.X., Pu, Q. and Cui, L., 2019.** D2O-isotope-labeling approach to probing phosphate-solubilizing bacteria in complex soil communities by single-cell Raman spectroscopy. Analytical Chemistry. 91(3): 2239-2246.
30. **Wilbanks, B. and Trinh, C.T., 2017.** Comprehensive characterization of toxicity of fermentative metabolites on microbial growth. Biotechnology for Biofuels. 10(1): 1-11.
31. **Asea, P.E.A., Kucey, R.M.N. and Stewart, J.W.B., 1988.** Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. Soil Biology and Biochemistry. 20(4): 459-464.
32. **Bianco, C. and Defez, R., 2010.** Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. Applied and Environmental Microbiology. 76(14): 4626-4632.