

## کاهش مصرف کود شیمیایی فسفات در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از طریق کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در قالب کود زیستی

مینا جلالی<sup>۱</sup>، نعمت الله محمودی<sup>۱\*</sup>، علیرضا فلاح نصرت‌آباد<sup>۲</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران.

۲- گروه بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

### چکیده

هدف تحقیق پیش رو، بررسی امکان جایگزینی کود شیمیایی فسفر (سوپرفسفات تریپل) با کودهای زیستی به‌عنوان یک رویکرد دوستدار محیط‌زیست بود. در این تحقیق، امکان جایگزینی کود سوپرفسفات تریپل با باکتری حل‌کننده فسفات *Pseudomonas deceptionensis* سویه Persian10، در ۱۰ تیمار با دو فاکتور باکتری (در دو سطح تلقیح و عدم تلقیح) و کود شیمیایی (در پنج سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ میزان توصیه شده کود در استخر) در شرایط آکواریوم مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل: ۱: ۱۰۰٪ کود+ باکتری، ۲: باکتری، ۳: ۲۵٪ کود+ باکتری، ۴: ۵۰٪ کود+ باکتری، ۵: ۷۵٪ کود+ باکتری، ۶: ۱۰۰٪ کود، ۷: ۷۵٪ کود، ۸: ۵۰٪ کود، ۹: ۲۵٪ کود، ۱۰: شاهد (بدون کود و باکتری) بود. در روزهای ۰، ۲، ۷، ۱۲ و ۱۷ تراکم باکتری، فسفر محلول، آنزیم فسفاتاز و pH اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد فسفر همه تیمارها در روزهای مختلف روند افزایشی داشت و همزمان با آن، در مقدار pH روند افزایشی و در جمعیت باکتری و میزان آنزیم فسفاتاز روند کاهشی مشاهده شد. بیشترین مقدار فسفر محلول آب در تیمار ۴ و ۵ مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، کاربرد ۵۰٪ کودشیمیایی فسفات+ باکتری حل‌کننده فسفات را می‌توان به‌عنوان نسبت مناسب برای باروری استخرهای پرورش ماهی و کاهش مصرف کودهای شیمیایی توصیه نمود.

**کلید واژه‌ها:** باکتری‌های حل‌کننده فسفات، کودهای شیمیایی، کاربرد تلقیحی، فسفاتاز قلیایی، آبی‌پروری پایدار

### مقدمه

کمبود فسفر از متداول‌ترین محدودیت‌های غذایی در رشد فیتوپلانکتون‌ها در اکوسیستم‌های آبی می‌باشد<sup>[۱]</sup>. این عنصر نقش تعیین‌کننده‌ای در ساختار دیواره سلولی، آنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک، تقسیم سلولی، انتقال مواد مغذی فتوسنتز، انتقال اطلاعات ژنتیکی و تنظیم مسیرهای متابولیکی دارد<sup>[۲]</sup>.

به‌منظور افزایش مقدار فسفر در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی، انواع مختلفی از کودهای آلی و شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما درصد بسیار زیادی از فسفر (ناشی از کودهای شیمیایی و آلی) به‌صورت ترکیب با کاتیون‌های فلزی مختلف نظیر کلسیم (در رسوبات با pH قلیایی)، آهن و آلومینیوم (در رسوبات با pH اسیدی) رسوب کرده و از دسترس خارج می‌شود و به همین دلیل غلظت فسفر قابل جذب در آب عمدتاً بسیار کم (حدود ۱۰ درصد از فسفر کل) می‌باشد<sup>[۳]</sup>. سطح پایین فسفر محلول در برخی از مزارع پرورش ماهیان گرمابی، ممکن است

### نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

\*نویسنده مسول:

n.mahmoudi@modares.ac.ir

منجر به محدود شدن تولیدات اولیه گردد. این موضوع سبب مصرف روزافزون این کودها در استخرهای پرورش ماهی برای تأمین فسفر مورد نیاز می‌شود.

با وجود اثرات مثبت کودهای شیمیایی فسفات در تأمین نیازهای غذایی موجودات آبی، امروزه ثابت شده است که استفاده بی‌رویه از این کودها خطرات زیست‌محیطی زیادی به دنبال دارد. فلزات سنگین و رادیونوکلیدهای موجود در این کودها می‌تواند اثرات نامطلوبی بر محیط‌زیست و سلامت انسان و حیوانات داشته باشد<sup>[۴]</sup>. به عنوان آثار منفی همه کودهای شیمیایی، کودهای فسفات نیز با تغییر pH خاک موجب کاهش فعالیت متابولیسی میکروبی خاک، کاهش قابل توجه تنوع و زیست‌توده میکروبی و فعال‌سازی یون‌های فلزات سنگین در خاک می‌شوند<sup>[۵]</sup>. از دیگر آثار مخرب این کودها می‌توان به تغییر دسترسی عناصر غذایی و تولید محصول، تغییر کیفیت خاک و آب، تغییر ساختار و عملکرد جوامع میکروبی خاک، افزایش تراکم خاک، کاهش مواد آلی خاک و از بین رفتن کربن خاک اشاره نمود<sup>[۶، ۷، ۸]</sup>. از سوی دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که ممکن است ذخایر جهانی فسفر تا سال ۲۳۰۰ به اتمام برسد<sup>[۹]</sup>. هزینه‌های اقتصادی و مسائل زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی فسفات، اندیشه کاهش مصرف کود شیمیایی را در کنار بهبود کمیت و کیفیت محصول در ذهن محققان قوت بخشیده است. یکی از مهم‌ترین روش‌های پیشنهادی محققان در این زمینه، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات به عنوان کود زیستی می‌باشد. این کودهای زنده از طریق فرآیندهای زیستی از جمله حل کردن فسفر موجب افزایش عملکرد محصول و کاهش مصرف کودهای شیمیایی می‌شوند.

مطابق ماده ۱۴۳ قانون برنامه پنج‌ساله پنجم توسعه جمهوری اسلامی ایران، کاهش ۳۵ درصدی کودهای شیمیایی تا پایان برنامه از طریق ترویج استفاده از کودهای آلی و زیستی مورد نظر می‌باشد. از آنجایی که بروز اثرات مفید کودهای زیستی بر کیفیت خاک و محصول به زمان طولانی‌تری نسبت به کودهای شیمیایی نیاز دارد. لذا کاربرد تلفیقی این دو نوع کود در ترویج هر چه بهتر مصرف کودهای زیستی بسیار حائز اهمیت است. به طور کلی، کودهای زیستی فسفات موجب انحلال فسفر انباشته شده در رسوبات استخرها (کمپلکس‌های آلی و معدنی فسفر) و تحقق اهداف آبی‌پروری پایدار می‌شوند.

باکتری‌های حل‌کننده فسفر از طریق آزاد کردن پروتون و تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم از جمله اسید اگزالیک، اسید سیتریک و غیره باعث انحلال فسفر انباشته شده در رسوبات استخرها (کمپلکس‌های آلی و معدنی فسفر) به‌ویژه ترکیبات فسفات کلسیم به شکل محلول و قابل دسترس می‌گردند<sup>[۱۰، ۱۱]</sup>. اسیدهای آلی ترشح شده توسط این باکتری‌ها در اثر واکنش با کمپلکس‌های معدنی همچون کلسیم، آهن و آلومینیوم باعث آزاد شدن فسفر محلول در آب می‌شوند. آنزیم‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها نیز باعث آزاد کردن فسفر از کمپلکس‌های آلی فسفر می‌شود<sup>[۱۲]</sup>.

مطالعات زیادی اثر کاربرد تلفیقی انواع مختلف کود شیمیایی و زیستی بر عملکرد محصولات زراعی و باغی را مورد بررسی قرار داده‌اند<sup>[۱۳، ۱۴]</sup>.<sup>[۱۵]</sup> اما به‌جز چند مطالعه که به استخراج و شناسایی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفر می‌پردازد، تقریباً هیچ مطالعه‌ای در این زمینه در حوزه آبی‌پروری صورت نگرفته است. لذا آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیر کاربرد جداگانه و تلفیقی درصدهای مختلف کود شیمیایی و زیستی فسفات بر برخی خصوصیات زیستی و فیزیولوژیکی آب و رسوب استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از جمله آنزیم، فسفر محلول، pH و جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات و همچنین تعیین بهترین نسبت تلفیق انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### طراحی آزمایش

با استفاده از نمونه‌برداری وین‌گرب از رسوبات سطحی (۱۰-۰ سانتی‌متری) یکی از آب‌بندان‌های شهرستان محمودآباد استان مازندران (موقعیت جغرافیایی ۳۶،۶۰۱۲ درجه شمالی و ۵۲،۲۱۷۱ درجه شرقی) در سال ۱۳۹۹ نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها به سردخانه آزمایشگاه مرکزی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد.

نمونه‌های آب و رسوب، پس از استریل کردن با اتوکلاو و انتقال به آزمایشگاه آبیان دانشگاه تربیت مدرس، به آکواریوم‌هایی با حجم تقریبی ۲۰ لیتر منتقل شد. برای هر آکواریوم حدود ۳ کیلوگرم رسوب و ۵ لیتر آب در نظر گرفته شد. سپس آکواریوم‌ها بر حسب نوع تیمار، با کود سوپرفسفات تریپل با درصدهای مختلف (پنج سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ میزان توصیه‌شده سازمان شیلات به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و باکتری *Pseudomonas deceptionensis* (Persian<sub>10</sub>) (در دو سطح تلقیح و عدم تلقیح) تلقیح شد. تیمارهای آزمایش شامل موارد زیر بود:

تیمار ۱: ۱۰۰٪ میزان توصیه شده کود شیمیایی دراستخر + سویه باکتری Persian<sub>10</sub> / تیمار ۲: باکتری / تیمار ۳: ۲۵٪ کود شیمیایی + باکتری / تیمار ۴: ۵۰٪ کود شیمیایی + باکتری / تیمار ۵: ۷۵٪ کود شیمیایی + باکتری / تیمار ۶: ۱۰۰٪ کود شیمیایی / تیمار ۷: ۷۵٪ کود شیمیایی / تیمار ۸: ۵۰٪ کود شیمیایی / تیمار ۹: ۲۵٪ کود شیمیایی / شاهد: بدون تلقیح کود شیمیایی و باکتری.

### تلقیح کود سوپرفسفات تریپل و باکتری Persian<sub>10</sub> به درون آکواریوم‌ها

جهت معرفی باکتری حل‌کننده فسفات به آکواریوم، ابتدا باکتری Persian<sub>10</sub> (جدا شده از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران) در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۹ درجه سانتیگراد کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، شمارش جمعیت باکتری به روش شمارش پلیت انجام شد. برای دستیابی به تراکم نزدیک به جمعیت باکتری در استخر (۱۰<sup>۷</sup>-۱۰<sup>۸</sup> CFU/ml)، ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت به هر آکواریوم بر حسب نوع تیمار منتقل شد. کود سوپرفسفات تریپل نیز پس از حل کردن در آب مقطر و استریل نمودن، در چهار سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ میزان توصیه‌شده سازمان شیلات به تیمارهای مورد نظر اضافه گردید<sup>[۱۶]</sup>. نمونه‌های آب و رسوب آکواریوم در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۷، ۱۲ و ۱۷ روز پس از تلقیح باکتری و کود، در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد و پارامترهای pH (با استفاده از دستگاه pH سنج JENWAY مدل ۳۵۱۰ ساخت انگلستان)، فسفر محلول (به روش مولیدات آبی)، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (به وسیله کیت آلکالین فسفاتاز شرکت پارس آزمون) و جمعیت باکتری (به روش استاندارد پلیت کانت) مورد بررسی قرار گرفت.

### شمارش جمعیت سویه Persian<sub>10</sub>

شمارش جمعیت سویه Persian<sub>10</sub> با 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 فرمول زیر محاسبه شد.

$$CFU/ml \text{ (جمعیت باکتری)} = \frac{10 \times \text{تعداد کلنی شمارش شده}}{\text{رقت مورد استفاده}}$$

جهت اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی و قارچی تیمارها، در طول انجام آزمایش، دو بار به صورت تصادفی رسوب چند آکواریوم فاقد کود زیستی کشت داده شد.

### سنجش میزان فسفر محلول آب

نمونه‌های آب به دست آمده از آکواریوم‌ها در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۷، ۱۲ و ۱۷ روز پس از تلقیح باکتری و کود، در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از ساتریفیوژ نمونه‌ها، میزان فسفر محلول به روش Murphy و Riley (۱۹۶۲)<sup>[۱۷]</sup> مورد سنجش قرار گرفت. در

این روش، یون ارتوفسفات با آمونیوم مولیبدات در محلول اسیدی واکنش می‌دهد و اسید فسفومولیبیدیک را ایجاد می‌کند. این ترکیب پس از کاهش با اسید اسکوربیک، یک کمپلکس آبی‌رنگ ایجاد می‌کند که میزان جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت می‌شود.

### سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز شرکت پارس آزمون انجام شد. فعالیت آنزیم فسفاتاز موجب تجزیه سوبسترا (دی‌سدیم پارانیتروفنول فسفات تتراهیدرات) به فسفات و پارانیتروفنول می‌شود. محلول‌های کلرید کلسیم و هیدروکسید سدیم موجب توقف فعالیت آنزیم فسفاتاز و همچنین افزایش شدت رنگ زرد ایجاد شده حاصل از آزاد شدن پارانیتروفنول می‌شود. شدت رنگ زرد حاصل از آزاد شدن پارانیتروفنل برای ارزیابی فعالیت آنزیم، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد.

### سنجش pH آب

پس از سانتیفریوژ نمونه‌های آب آکواریوم (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm) و حذف ذرات معلق، pH در سوپرناتانت اندازه‌گیری و ثبت شد.

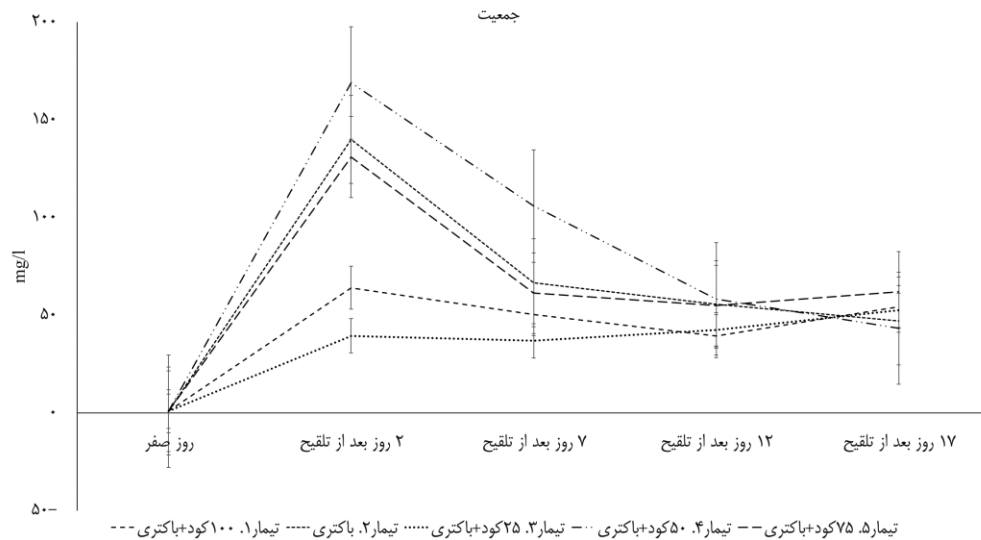
### محاسبات آماری

برای مقایسه سطح فسفات محلول آب در روزهای مختلف بین تیمارها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) به ترتیب برای تحلیل آماری و آنالیز توصیفی استفاده شد.

## نتایج

### جمعیت باکتری

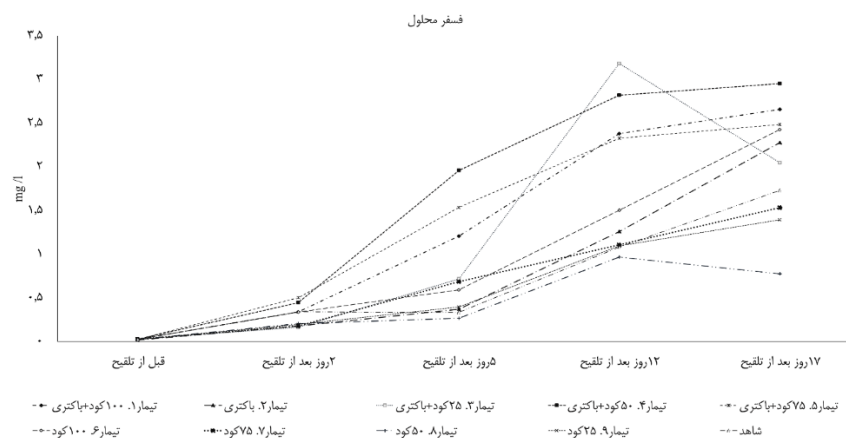
در تیمارهایی که باکتری حل‌کننده فسفر تلقیح نشد (۶، ۷، ۸، ۹) و شاهد، آلودگی باکتریایی و قارچی خاصی مشاهده نشد. در بین تیمارهای تلقیح شده با باکتری، طبق شکل ۱، بیشترین تراکم باکتری مربوط به تیمار ۴ (۵۰٪ کود+ باکتری) در روز ۲ بعد از تلقیح بود (با تراکم  $1.68/93 \times 10^7$  CFU/ml). کمترین جمعیت باکتری نیز در تیمار ۱ (۱۰۰٪ کود+ باکتری) در روز ۱۲ بعد از تلقیح با تراکم CFU/ml  $39/4 \times 10^7$  مشاهده شد. به جز دو تیمار ۲ (۱۰۰٪ کود+ باکتری) و ۴ (۵۰٪ کود+ باکتری) که در طول زمان آزمایش، جمعیت آنها روند کاهشی داشت، سایر تیمارها پس از یک کاهش، مجدداً افزایش جمعیت را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱. جمعیت سویه Persian10 در تیمارهای مختلف

### میزان فسفر محلول تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف

بررسی نتایج نشان داد فسفر محلول همه تیمارها در بازه‌های مختلف روند افزایشی داشت (شکل ۲). تیمارهای ۴، ۵ و ۱ بالاترین توانایی را در افزایش میزان فسفر محلول آب در طول دوره آزمایش داشتند. مقایسه میانگین فسفر محلول تیمارها ۷ روز بعد از تلقیح نشان داد فسفر در تیمارهای ۴ و ۵ (۵۰ کود+ باکتری و ۷۵ کود+ باکتری) تفاوت معناداری با شاهد داشته است. بین این دو تیمار با برخی تیمارهای حاوی صرفاً کود شیمیایی (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰٪) و تیمار حاوی صرفاً باکتری نیز اختلاف معنادار وجود داشت (جدول ۱). بر اساس همین جدول، تیمار ۳ و ۴ نیز در روز ۱۲ بعد از تلقیح بیشترین تأثیر معناداری را در فسفر محلول آب داشت.



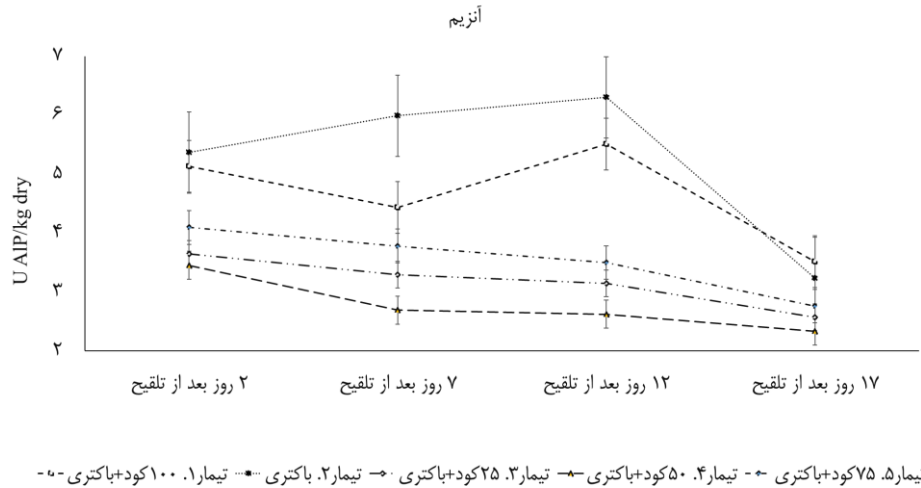
شکل ۲. میزان فسفر محلول تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف

جدول ۱. مقایسه میانگین فسفر محلول تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف. داده‌ها به صورت "میانگین  $\pm$  انحراف معیار" برای سه تکرار می‌باشند. میانگین‌های دارای یک حرف مشترک، براساس آزمون دانکن (در سطح احتمال ۵٪) فاقد تفاوت معنادار هستند. میانگین‌های فاقد حروف لاتین، براساس آزمون دانکن (در سطح احتمال ۵٪) فاقد تفاوت معنادار هستند.

بازه زمانی تیمار	(قبل از تلقیح)	(۲ روز بعد از تلقیح)	(۷ روز بعد از تلقیح)	(۱۲ روز بعد از تلقیح)	(۱۷ روز بعد از تلقیح)
تیمار ۱	$0.0253 \pm 0.005$	$0.3386 \pm 0.1819$	$1.2077 \text{ abc} \pm 0.7448$	$2.3803 \text{ abc} \pm 1.1266$	$2.6581 \pm 1.043$
تیمار ۲	$0.0173 \pm 0.005$	$0.1779 \pm 0.1819$	$0.3704 \text{ c} \pm 0.7448$	$0.7523 \text{ c} \pm 1.1266$	$2.2771 \pm 1.043$
تیمار ۳	$0.0256 \pm 0.005$	$0.1640 \pm 0.1819$	$0.7156 \text{ bc} \pm 0.7448$	$3.1839 \text{ a} \pm 1.1266$	$2.0470 \pm 1.043$
تیمار ۴	$0.0278 \pm 0.005$	$0.4438 \pm 0.1819$	$1.9597 \text{ a} \pm 0.7448$	$2.8208 \text{ ab} \pm 1.1266$	$2.9517 \pm 1.043$
تیمار ۵	$0.0262 \pm 0.005$	$0.5013 \pm 0.1819$	$1.5351 \text{ ab} \pm 0.7448$	$2.3267 \text{ abc} \pm 1.1266$	$2.4835 \pm 1.043$
تیمار ۶	$0.0255 \pm 0.005$	$0.3386 \pm 0.1819$	$0.2970 \text{ c} \pm 0.7448$	$1.5033 \text{ abc} \pm 1.1266$	$2.4259 \pm 1.043$
تیمار ۷	$0.0279 \pm 0.005$	$0.1779 \pm 0.1819$	$0.6839 \text{ c} \pm 0.7448$	$1.1085 \text{ bc} \pm 1.1266$	$1.5311 \pm 1.043$
تیمار ۸	$0.0248 \pm 0.005$	$0.2037 \pm 0.1819$	$0.2652 \text{ c} \pm 0.7448$	$1.2583 \text{ bc} \pm 1.1266$	$0.7732 \pm 1.043$
تیمار ۹	$0.0217 \pm 0.005$	$0.1978 \pm 0.1819$	$0.3962 \text{ c} \pm 0.7448$	$1.0946 \text{ bc} \pm 1.1266$	$1.3922 \pm 1.043$
شاهد	$0.0267 \pm 0.005$	$0.3406 \pm 0.1819$	$0.3327 \text{ c} \pm 0.7448$	$1.0807 \text{ bc} \pm 1.1266$	$1.7315 \pm 1.043$

### فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

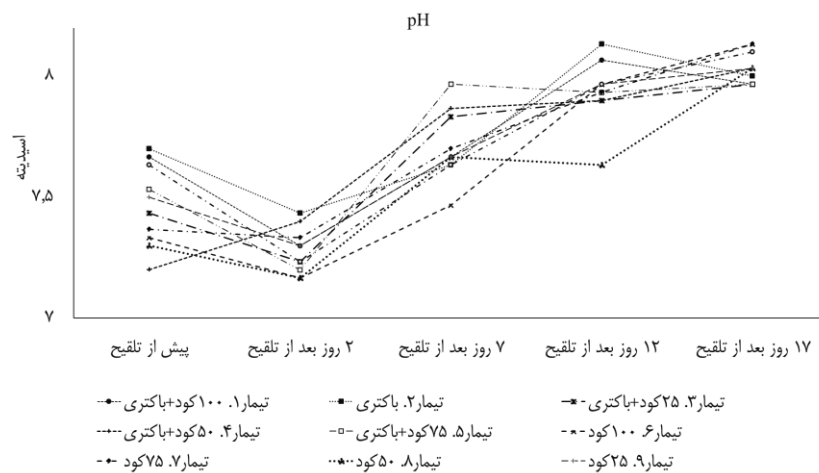
مقدار آنزیم در طول دوره آزمایش در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ روند کاهشی نشان داد. در تیمار ۲ میزان آنزیم تا روز ۱۲ بعد از تلقیح افزایش و در روز ۱۷ بعد از تلقیح کاهش یافت. تیمار ۱ نیز روند ثابتی در تغییر آنزیم نشان نداد. بیشترین مقدار آنزیم در این تیمار، در روز ۱۲ بعد از تلقیح مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. تغییرات آنزیم فسفاتاز قلیایی در بازه‌های زمانی مختلف

## pH آب

بررسی pH تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف، حاکی از روند افزایشی آن در طول دوره آزمایش، همزمان با افزایش غلظت فسفر محلول بود (شکل ۴). بین میزان فسفر با جمعیت باکتری و مقدار آنزیم رابطه عکس وجود داشت به طوری که با افزایش غلظت فسفر، جمعیت باکتری و میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی کاهش یافت (شکل ۱، ۲ و ۳).



شکل ۴. بررسی pH تیمارها در بازه‌های زمانی مختلف

## بحث

در این آزمایش، به طور کلی تیمارهای تلفیقی حاوی مقادیر مختلف کود فسفات+ باکتری حل کننده فسفات، موجب افزایش بیشتری در میزان فسفر محلول آب نسبت به تیمارهای دریافت کننده همان مقادیر کود (بدون باکتری) و همچنین شاهد شدند. این موضوع می‌تواند به دلیل

تثبیت بالای فسفر در رسوب و عدم انحلال آن توسط باکتری (در تیمارهای فاقد باکتری) باشد. هم‌راستا با این نتیجه، محققان زیادی از جمله Shafiee Adib و همکاران (۲۰۱۵)؛ Garg و همکاران (۱۹۹۸)؛ Singh و همکاران (۲۰۱۷) و Ribaudو همکاران (۲۰۲۰) [۱۳، ۱۸، ۱۹] اثر مطلوب کود زیستی و شیمیایی فسفات را بر عملکرد محصول (که ناشی از افزایش فسفر قابل دسترس است) گزارش کردند. در پژوهش‌های انجام شده توسط این محققان مشخص شد تلفیق کودهای زیستی و شیمیایی فسفات می‌تواند موجب افزایش عملکرد گیاه و کاهش مصرف کود شیمیایی شود. در تحقیقات Galavi و همکاران (۲۰۱۱) [۲۱] نیز افزایش مقدار فسفر دانه در اثر کاربرد تلفیقی کود زیستی فسفات و شیمیایی را مورد تایید قرار گرفت.

روز ۲ بعد از تلقیح، هم‌زمان با افزایش فسفر در تیمارهای تلقیح شده با Persian<sub>10</sub>، جمعیت باکتری نیز رشد چشمگیری داشت. در این صورت می‌توان افزایش فسفر در این تیمارها را (در کنار سایر عوامل مؤثر بر غلظت فسفر) تا حد زیادی ناشی از فعالیت باکتری‌ها در انحلال ترکیبات نامحلول فسفر برای تأمین نیازهای غذایی خود دانست. Moradi و Sarikhani (۲۰۱۷) و Yagil (۱۹۷۵) [۲۳، ۲۲] و بیان کردند در شرایط کمبود فسفر، باکتری‌ها برای تأمین فسفر مورد نیاز خود، از طریق مکانیسم‌های مختلف اقدام به انحلال ترکیبات نامحلول فسفر می‌کنند. کاهش pH در این روز را می‌توان به ترشح اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها نسبت داد که یکی از راهکارهای اصلی میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در انحلال ترکیبات نامحلول این عنصر می‌باشد [۳۴].

به‌جز روز ۲ بعد از تلقیح، روند کلی تغییرات pH در سایر بازه‌ها (در کنار افزایش فسفر) افزایشی بود. بر خلاف این نتایج، بررسی‌های Bakhshandeh و همکاران (۲۰۱۴) و Mokwunye (۱۹۷۵) [۲۵، ۱۴] حاکی از کاهش pH به‌موازات افزایش فسفر محلول بود. هم‌راستا با نتایج این آزمایش، گزارش‌های دیگری نیز از جمله Muljadi و همکاران (۱۹۶۶) و Syers و همکاران (۱۹۷۳) [۲۷، ۲۶] مبنی بر وجود رابطه مستقیم بین pH و غلظت فسفر ارائه شده است. یافته‌های Li و همکاران (۲۰۱۳) [۲۸] نیز مشابه با نتایج این تحقیق بود. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که ترشح اسیدهای آلی همیشه موجب کاهش pH نمی‌شود. دلیل این امر را می‌توان در کلات کردن یون‌های فلزی در کمپلکس‌های کاتیون-فسفر توسط اسیدهای ترشح شده جستجو کرد که مانع از تشکیل ترکیبات نامحلول فسفر می‌شود [۲۹]. علاوه بر این، مصرف یون‌های H<sup>+</sup> توسط بیومس میکروبی در طی پدیده آمونیفیکاسیون (تبدیل ترکیبات آلی نیتروژن به آمونیاک یا آمونیوم) نیز ممکن است از دلایل افزایش pH در طول دوره آزمایش باشد [۳۰]. از آنجایی که توانایی میکروارگانیسم‌های مختلف در انحلال ترکیبات مختلف فسفر و همچنین نوع و میزان اسیدهای ترشح شده (که می‌تواند بر میزان تغییر pH توسط این میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار باشد) متفاوت است، بنابراین نمی‌توان انحلال فسفر در اثر کاهش pH را یک رابطه ثابت و تغییرناپذیر دانست؛ و توانایی بیشتر در انحلال فسفر را به توانایی میکروارگانیسم در کاهش pH نسبت داد. در تأیید این بحث، Armandeh و همکاران (۲۰۱۸) [۳۱] گزارش کردند سوبه (*Acinetobacter*) Persian<sub>11</sub> (*lactuca*) با وجود این که بیشترین قابلیت را در آزادسازی فسفر نشان داد، نسبت به سایر سویه‌ها از جمله Persian<sub>10</sub> توانایی کمتری در کاهش pH داشت. مطالعات Asea و همکاران (۱۹۸۸) و Bianco و Defez (۲۰۱۰) [۳۳، ۳۲] نیز حاکی از وجود یک رابطه ضعیف بین انحلال فسفر و کاهش pH بود. توجه به این نکته ضروری است که در رسوب استخرهای پرورش ماهی، کمپلکس‌های آلی، بیشترین میزان ترکیبات فسفر را تشکیل می‌دهند. بنابر این به‌نظر می‌رسد نقش آنزیم‌های باکتریایی در انحلال ترکیبات فسفر در استخر، موثرتر از اسیدهای آلی و معدنی تولید شده توسط باکتری‌ها باشد.

در این آزمایش هم‌زمان با کاهش جمعیت باکتری، میزان آنزیم نیز کاهش یافت. بنابر این کاهش میزان آنزیم، می‌تواند ناشی از کاهش جمعیت باکتری باشد. مواد غذایی از جمله کربن از عواملی هستند که می‌توانند بر جمعیت باکتری و فعالیت فسفاتاز قلیایی اثرگذار باشند. در این راستا، Mahsefat و همکاران (۲۰۱۹) [۳۴] بیان کردند به‌دنبال افزایش جمعیت میکروبی که از فراهمی مواد غذایی ناشی می‌شود، ترشح آنزیم فسفاتاز افزایش می‌یابد و با کاهش این مواد، جمعیت میکروبی و به‌تبع آن ترشح آنزیم کاهش می‌یابد. افزایش فسفر نیز می‌تواند از دیگر عوامل کاهش آنزیم فسفاتاز در طول آزمایش باشد. از آنجایی که این آنزیم در شرایط کمبود فسفر موجب انحلال ترکیبات نامحلول



فسفر می‌شود، می‌توان انتظار داشت با افزایش غلظت فسفر در محیط، میزان تولید و فعالیت آن کاهش یابد. نتایج مطالعه Spohn و Kuzuyakov (۲۰۱۳) و Spohn و همکاران (۲۰۱۵) [۳۶، ۳۵] نیز حاکی از کاهش فعالیت فسفاتاز قلیایی پس از تلقیح فسفات (افزایش غلظت فسفر) است. تحقیقات Olander و Vitousek (۲۰۰۰) و Sinsabaugh و همکاران (۲۰۰۸) [۳۸، ۳۷] نیز وجود رابطه معکوس بین فعالیت فسفاتاز خارج سلولی و دسترسی فسفر را نشان داد. در تحقیق Armandeh و همکاران (۲۰۱۸) [۳۱] نیز افزایش غلظت فسفر و کاهش سوبسترا در محیط از عوامل مؤثر در کاهش فسفاتاز ذکر شد.

افزایش فسفر محلول پس از روز دوم، می‌تواند حاصل فعالیت حل‌کنندگی باکتری‌های زنده، کاهش مصرف فسفر آزاد شده توسط جمعیت میکروبی (به دلیل کاهش جمعیت میکروبی) و همچنین تجزیه بیومس میکروب‌های مرده و آزاد شدن فسفر ذخیره شده در آن باشد. زیست‌توده میکروبی قادر به ذخیره‌سازی و تجمع فسفر می‌باشد [۳۵]! در تأیید این موضوع، مطالعات Rodríguez و Fraga (۱۹۹۹) [۳۹] حاکی از افزایش مجدد سطح فسفر در محیط، پس از کاهش رشد جمعیت میکروبی یا ورود به فاز ثابت و به تبع آن کاهش میزان جذب فسفر می‌باشد. کاهش جمعیت باکتری‌ها در طول آزمایش می‌تواند ناشی از تولید متابولیت‌های سمی توسط همین باکتری‌های باشد که تا حد زیادی بر رشد و تکثیر آن مؤثر بوده است. تیمارهایی که رشد اولیه بیشتری داشتند کاهش جمعیت بیشتری نشان دادند. در تأیید این موضوع، Wilbanks و Trinh (۲۰۱۷) [۴۰] ذکر کردند که دسته متنوعی از میکروب‌ها در برخی شرایط قادر به تولید متابولیت‌هایی هستند که نقش عملکردی در تنظیم متابولیسم سلولی و میکروبیوم‌ها و حتی مهار آنها دارند. از آنجایی که در طول زمان انجام آزمایش، دما نوسان چندانی نداشت (۳۰ درجه سانتیگراد) می‌توان از اثر آن بر جمعیت باکتری چشم‌پوشی کرد. به نظر می‌رسد در زمینه عوامل مؤثر بر انحلال فسفر در استخرهای پرورش ماهی نیاز به تحقیقات گسترده‌تری باشد تا بتوان به طور قطعی در مورد نقش این عوامل و رابطه آنها با هم اظهار نظر کرد.

## نتیجه‌گیری

به‌طور کلی می‌توان از این مطالعه نتیجه گرفت که کاربرد تلفیقی کود+ باکتری Persian<sub>10</sub> منجر به افزایش کارایی کود شیمیایی فسفات و کاهش مصرف آن می‌شود. از بین تیمارهای مختلف، تیمار ۴ (۵۰٪ کود شیمیایی فسفات+ باکتری حل‌کننده فسفات) در تثبیت جمعیت میکروبی و افزایش فسفر محلول مؤثرتر عمل کرده و به‌عنوان نسبت کودی مطلوب در باروری استخرهای حاکی مناطق میانی استان مازندران به‌منظور کاهش مصرف کودهای شیمیایی در پرورش ماهیان گرمابی قابل توصیه است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس (بور، نائیجی، کمالی، حسینی، نورانی، حقدوست و رحمتی) برای همکاری در اجرای این مطالعه، تشکر و قدردانی نمایند.

## منابع

- 1- Boyd CE. pH, carbon dioxide, and alkalinity. In Water Quality 2015 (pp. 153-178). Springer, Cham.
- 2- Rathi M, Gaur N. Phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer and its applications. Journal of Pharmacy Research. 2016 Mar;10(3):146-8.

- 3- Jana BB. 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 2007 (pp. 229-238). Springer, Dordrecht.
- 4- Vovk NI, Bazaeva AV, Didenko AV. Use of the phosphate-solubilizing bacterial preparation polymyxobacterin in pond aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2013 Mar 1;13(1):1-9.
- 5- Lin W, Lin M, Zhou H, Wu H, Li Z, Lin W. The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards. *PloS one*. 2019 May 28;14(5):e0217018.
- 6- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*. 2003 Dec 1;68(1):167-82.
- 7- Savci S. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*. 2012 Feb 1;3(1):73.
- 8- Qin H, Lu K, Strong PJ, Xu Q, Wu Q, Xu Z, Xu J, Wang H. Long-term fertilizer application effects on the soil, root arbuscular mycorrhizal fungi and community composition in rotation agriculture. *Applied Soil Ecology*. 2015 May 1;89:35-43.
- 9- Daneshgar S, Callegari A, Capodaglio AG, Vaccari D. The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. *Resources*. 2018 Jun;7(2):37.
- 10- Gerke J, Hermann R. Adsorption of orthophosphate to humic-Fe-complexes and to amorphous Fe-oxide. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 1992;155(3):233-6.
- 11- Khan MS, Ahmad E, Zaidi A, Oves M. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity 2013* (pp. 237-263). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 12- Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014 Apr 1;3(2):97-110.
- 13- Shafiee Adib Sh, Amini Dehaghi M, Modares Sanavi SAM. The effect of solid waste of olive oil mill and *Pseudomonas* bacteria on phosphorus availability and some biological characteristics of a calcareous soil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2015; 31(1): 1-15. (in Persian)
- 14- Bakhshandeh E, Rahimian H, Pirdashti H, Nematzadeh GA. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014 Sep;30(9):2437-47.
- 15- Manzoor M, Abbasi MK, Sultan T. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*. 2017 Jan 2;34(1):81-95.
- 16- Horváth L, Tamás G, Seagrave C. *Carp and pond fish culture including Chinese herbivorous species, pike, tench, zander, wels catfish and goldfish*. Fishing News Books Ltd; 1992.

- 17- Murphy JA, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*. 1962 Jan 1;27:31-6.
- 18- Garg SK, Bhatnagar A, Narula N. Application of Azotobacter enhances pond productivity and fish biomass in still water ponds. *Aquaculture International*. 1998 May;6(3):219-31.
- 19- Singh MK, Srivastava N, Singh RK. Integrated effect of bio fertilizers and inorganic fertilizers on growth, yield and quality of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017;6(5):841-1844.
- 20- Ribaud C, Zaballa JI, Golluscio R. Effect of the phosphorus-solubilizing bacterium *Enterobacter Ludwigii* on barley growth promotion. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*. 2020 Jan 26;63(1):144-57.
- 21- Galavi M, Yosefi K, Ramrodi M, Mousavi SR. 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*. 2011 Dec 1;3(4):22.
- 22- Moradi S, Sarikhani MR. Interaction effects of different sources of phosphorus and potassium on phosphate and potassium solubilizing behavior of some bacterial isolates. 2017; 5(1): 25-34. (in Persian)
- 23- Yagil E. Derepression of polyphosphatase in *Escherichia coli* by starvation for inorganic phosphate. *FEBS letters*. 1975 Jul 15;55(1-2):124-7.
- 24- Hu XJ, Li ZJ, Cao YC, Zhang J, Gong YX, Yang YF. 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*. 2010 Oct;18(6):1079-91.
- 25- Mokwunye U. The influence of pH on the adsorption of phosphate by soils from the Guinea and Sudan savannah zones of Nigeria. *Soil Science Society of America Journal*. 1975 Nov;39(6):1100-2.
- 26- Muljadi D, Posner AM, Quirk JP. The mechanism of phosphate adsorption by kaolinite, gibbsite, and Pseudoboehmite: Part I. The isotherms and the effect of pH on adsorption. *Journal of Soil Science*. 1966 Sep;17(2):212-28.
- 27- Syers JK, Browman MG, Smillie GW, Corey RB. Phosphate sorption by soils evaluated by the Langmuir adsorption equation. *Soil Science Society of America Journal*. 1973 May;37(3):358-63.
- 28- Li H, Liu L, Li M, Zhang X. Effects of pH, temperature, dissolved oxygen, and flow rate on phosphorus release processes at the sediment and water interface in storm sewer. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2013 Jan 1;2013.
- 29- Antoun H. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*. 2012 Jan 1;46:62-7.

- 30- Marschner P, Crowley D, Rengel Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011 May 1;43(5):883-94.
- 31- Armandeh M, Mahmoudi M, Fallah AR. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from warm-water fish farms as phosphate biofertilizer candidates. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2018; 6 (4): 122-140. (in Persian (
- 32- Asea PE, Kucey RM, Stewart JW. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 1988 Jan 1;20(4):459-64.
- 33- Bianco C, Defez R. Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and environmental microbiology*. 2010 Jul 15;76(14):4626-32.
- 34- Mahsefat M, Ghorbanzadeh N, Farhangi MB, Khalili Rad M. The effect of solid waste of olive oil mill and *Pseudomonas* bacteria on phosphorus availability and some biological characteristics of a calcareous soil. *Journal of Water and Soil Conservation*. 2019; 26(2): 157-175. (in Persian)
- 35- Spohn M, Kuzyakov Y. Distribution of microbial-and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation—Coupling soil zymography with <sup>14</sup>C imaging. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013 Dec 1;67:106-13.
- 36- Spohn M, Treichel NS, Cormann M, Schloter M, Fischer D. Distribution of phosphatase activity and various bacterial phyla in the rhizosphere of *Hordeum vulgare* L. depending on P availability. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015 Oct 1;89:44-51.
- 37- Olander LP, Vitousek PM. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*. 2000 May;49(2):175-91.
- 38- Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology letters*. 2008 Nov;11(11):1252-64.
- 39- Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 1999 Oct 1;17(4-5):319-39.
- 40- Wilbanks B, Trinh CT. Comprehensive characterization of toxicity of fermentative metabolites on microbial growth. *Biotechnology for biofuels*. 2017 Dec;10(1):1-1.

## Reduction of Phosphorus fertilizer application in Warm-water fish ponds by using Phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer

Mina Jalali<sup>1</sup>, Nemat Mahmoudi<sup>1\*</sup>, Alireza Fallah Nosratabad<sup>2</sup>

1- Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat modares University, Iran.

2- Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

### ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the possibility of replacing phosphorus chemical fertilizer (triple superphosphate) with biofertilizers as an environmentally friendly approach. In this study, Possibility of replacing Triple superphosphate fertilizer with phosphate solubilizing bacteria "Pseudomonas deceptionensis Persian10 strain" in 10 treatments with two bacterial factors (in two levels of inoculation and non-inoculation) and chemical fertilizer (in five levels 0, 25, 50, 75 and 100% of the recommended amount of fertilizer in the pond) was examined in aquarium conditions. Treatments included: 1: 100% fertilizer + bacteria, 2: bacteria, 3: 25% fertilizer + bacteria, 4: 50% fertilizer + bacteria, 5: 75% fertilizer + bacteria, 6: 100% fertilizer, 7: 75% fertilizer, 8: 50% fertilizer, 9: 25% fertilizer, 10: control (without fertilizer and bacteria). Bacterial densities, soluble phosphorus, phosphatase and pH were measured on days 0, 2, 7, 12 and 17. The results showed that the phosphorus of all treatments had an increasing trend on different days and at the same time, an increase in the pH value and a decreasing trend was observed in the bacterial population and the amount of phosphatase enzyme. The highest amount of soluble phosphorus was observed in treatments 4 and 5. According to the obtained results, the application of 50% phosphate fertilizer + phosphate solubilizing bacteria can be recommended as a suitable ratio for the fertility of fish ponds and reducing the use of chemical fertilizers.

**KEYWORDS:** Phosphate solubilizing bacteria, Chemical fertilizers, Combined application, Alkaline phosphatase, Sustainable aquaculture

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 6 August 2021

Accepted: 11 December 2021

ePublished: 21 December 2021

\* Corresponding Author:

Email address: n.mahmoudi@modares.ac.ir

Tel: +(98) 1144998000

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513