فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۷

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل کننده فسفات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفره

مصطفی آرمنده[۱]، نعمت الله محمودی[۲]*، علیرضا فلاح نصرت‌آباد[۳]

تاریخ دریافت: دی ۹۶ تاریخ پذیرش: فروردین ۹۷

چکیده

قابلیت دسترسی زیستی فسفر برای تولیدکنندگان اولیه در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی عمدتا به واسطه تشکیل کمپلکس با کاتیون‌ها و مواد آلی به شدت کاهش می‌یابد. در این راستا، برای افزایش فسفات محلول در آب منطبق بر اصول کشاورزی پایدار، استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات که دارای توانایی انحلال ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفات هستند، بسیار ضروری است. با این هدف، نمونه‌برداری از رسوبات مزارع پرورش ماهیان گرمابی در نواحی مرکزی مازندران انجام شد. جداسازی باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت اختصاصی NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) انجام شد و سپس سویه‌ها با روش توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA شناسایی شدند. به علاوه، تاثیر تغییرات دما، pH و شوری (منطبق با شرایط محیطی مزارع پرورش ماهیان گرمابی) بر رشد و زنده‌مانی سویه‌ها بررسی شد. در مطالعه حاضر، ۶۴ سویه جداسازی شد که از میان آن‌ها ۱۱ سویه شامل *Pseudomonas taiwanensis* (Persian$_1$ و Persian$_2$)، *P. putida* (Persian$_3$)، *P. umsongensis* (Persian4 و Persian$_5$)، *P. kilonensis* (Persian$_6$)، *P. frederiksbergensis* (Persian$_7$، Persian$_8$ و Persian$_9$)، *P. deceptionensis* (Persian$_{10}$) و *Acinetobacter lactucae* (Persian$_{11}$) به عنوان سویه‌های موثرتر در انحلال فسفر انتخاب شدند. به طور کلی نتایج نشان داد که این سویه‌ها علاوه بر داشتن توانایی در انحلال ترکیبات نامحلول فسفر، قابلیت رشد مطلوبی در شرایط استخرهای پرورش ماهیان گرمابی داشتند.

واژگان کلیدی: *فسفر، باکتری‌های حل کننده فسفات، کود زیستی، ماهیان گرمابی.*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۲- استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۳- دانشیار گروه بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
* نویسنده مسئول: n.mahmoudi360@modares.ac.ir

مقدمه

کپورماهیان پرورشی از مهم‌ترین گونه‌های در حال پرورش دنیا محسوب می‌شوند که به علت صرفه اقتصادی و طعم مناسب در اغلب کشورها به ویژه کشورهای قاره آسیا از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (Kestemont, 1995). این ماهیان در استان‌های شمالی ایران شامل مازندران، گیلان و گلستان و برخی از استان‌های جنوبی از جمله خوزستان پرورش داده می‌شوند (FAO, 2016). به منظور افزایش سطح مواد مغذی در آب (به ویژه نیتروژن و فسفر) و افزایش تولید ماهی، انواع مختلفی از کودهای آلی و معدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Boyd et al., 2002). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فسفر عنصری ضروری برای تولیدکنندگان اولیه در اکوسیستم‌های آب شیرین به ویژه مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود (Bostrom et al., 1988; Sugunan, 2000). با توجه به این که درصد بسیار زیادی از فسفر استفاده شده در مزارع پرورش ماهی به صورت ترکیب با کلسیم و منیزیم (در شرایط قلیایی) و آلومینیوم و آهن (در شرایط اسیدی) رسوب می‌کند و از دسترس خارج می‌شود، اغلب غلظت فسفات محلول و قابل جذب در آب بسیار اندک (حدود ۱۰ درصد از فسفر کل) است (Bagyaraj et al., 2000; Hu et al., 2010; Chen et al., 2011). همچنین ماده آلی نیز منبع مهمی از فسفر محبوس می‌شود که ۲۰ تا ۸۰ درصد از فسفر کل را در بسیاری از اکوسیستم‌ها به خود اختصاص می‌دهد (Richardson, 1994). استفاده از کودهای شیمیایی فسفره (به ویژه سوپرفسفات تریپل) برای تامین فسفر مورد نیاز در مزارع پرورش ماهیان گرمابی به طور قابل ملاحظه‌ای در حال افزایش است. علاوه بر قیمت بالا و بازده بسیار پایین، این نوع کودها حاوی عناصر سمی و سنگینی مانند کادمیوم، آرسنیک و سرب هستند که ممکن است خطرات جدی را برای کیفیت خاک به دنبال داشته باشند و همچنین از طریق زنجیره غذایی به سلامت ماهیان و در نهایت انسان آسیب برسانند (Jiao et al., 2012). از طرف دیگر در سطح جهانی، منابع سنگ فسفات با خلوص بالا و میزان آلودگی کمتر برای تهیه کودهای فسفره ممکن است در طی کمتر از ۱۰۰ سال آینده به اتمام برسد که خود چالشی جدی در مسیر تولید خواهد بود (Middleton, 2003). مگر این که رویکردهای نوین تغذیه فسفری، به دور از کاربرد کودهای شیمیایی

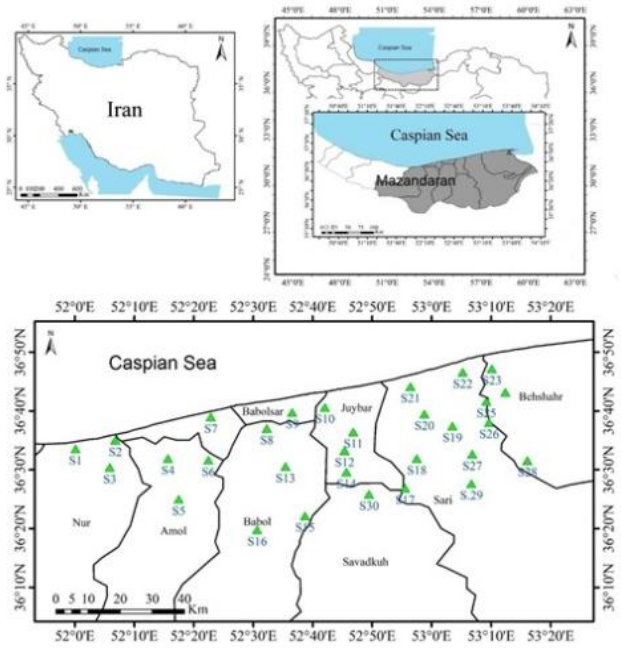
مورد توجه قرار گیرد. فسفات نامحلول تحت شرایط محیطی خاصی به درون آب آزاد می‌شود. مطالعات گسترده‌ای در مورد اثرات عوامل مختلف محیطی موثر (دما، pH، اکسیژن محلول در آب، شرایط هیدرولوژیکی و جریانات ناشی از باد) و اثر فیزیکی مانند خراشیدن رسوبات (Sediment Raking) و همچنین اثر عوامل زیستی (Bioturbation) بر آزاد شدن فسفر از رسوبات انجام شده است (Chakraborty et al., 2004; Chakrabarty and Das, 2007; Chen et al., 2011). امروزه به منظور بهبود کارایی و کاهش مصرف کودهای فسفره و همچنین افزایش فسفات قابل دسترس در سیستم‌های کشاورزی، باکتری‌های حل کننده فسفات (Phosphate Solubilizing Bacteria: PSB) بسیار مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته‌اند (فلاح نصرت‌آباد و همکاران، ۱۳۸۲؛ فلاح نصرت‌آباد و شریعتی، ۱۳۹۳؛ Bakhshandeh et al., 2015؛ Liu et al., 2015). PSB با مکانیزم‌های متنوعی از جمله آزاد کردن پروتون (H^+)، تولید اسیدهای آلی و ساخت آنزیم‌های مختلف باعث حل کردن فسفات غیرمحلول به شکل محلول و قابل دسترس می‌شوند (Bianco and Defez, 2010). وجود غلظت بالایی از ترکیبات فسفات نامحلول در رسوبات بسیاری از مزارع آبزی‌پروری خاکی موجب شده تا PSB موضوع مهمی برای مطالعه در چرخه فسفر شود (Hu et al., 2010). جمعیت PSB به طور طبیعی در محیط پرورشی برای انحلال ترکیبات نامحلول فسفات کافی نیستند (Jana, 2007). اضافه کردن PSB که می‌توانند در محیط آبی مانند استخر پرورشی به خوبی سازگار و تثبیت شوند، بسیار ضروری است (Song et al., 2007; Wu et al., 2009). از این رو، به منظور افزایش کارایی کودهای فسفره و افزایش فسفات محلول در آب، به کارگیری PSB به عنوان کود زیستی (Bio-fertilizer) بسیار ضروری است. همچنین با توجه به اهداف آبزی‌پروری اکولوژیکی، استفاده از گونه‌ها و سویه‌های بومی به منظور حفاظت از محیط زیست بسیار لازم و ضروری است. سهم تولید ماهیان گرمابی از کل آبزی‌پروری کشور ۲۰۱٫۰۹۷ تن (از ۵۰٫۸۳۵ هکتار استخر) است که سهم بالایی از تولیدات آبزی‌پروری ایران را به خود اختصاص می‌دهد (FAO, 2016). از این رو، با توجه به پتانسیل بالای تولید ماهیان گرمابی در کشور و همچنین مزایای کودهای زیستی، استفاده از این کودها می‌تواند برای رسیدن به اهداف آبزی‌پروری

پایدار در کشور بسیار مفید باشد. استفاده از PSB به عنوان کود زیستی می‌تواند جایگزین کود شیمیایی فسفره شود و یا حداقل استفاده از آن را کاهش دهد و یکی از مهم‌ترین، کم‌هزینه‌ترین و کارآمدترین رویکردهای پایدار برای حفظ ذخایر فسفر و جلوگیری از آلودگی‌های ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای فسفره باشد (Raj et al., 2005). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی PSB از مزارع پرورش ماهیان گرمابی در بخش‌های مرکزی استان مازندران به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفره تحت شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفات

برای نمونه‌برداری از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی‌متری رسوبات کف ۳۰ مزرعه پرورش ماهی در نواحی مرکزی استان مازندران در سال ۱۳۹۵ با توجه به عرض‌ها و طول‌های جغرافیایی مختلف از نمونه‌بردار گرب ون‌وین (Hydro-Bios، آلمان) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری از مزارع پرورش ماهیان گرمابی در نواحی مرکزی استان مازندران

برای تهیه یک نمونه واحد، نمونه‌برداری‌های متعددی از نقاط مختلف استخر انجام و سپس با هم مخلوط شدند. نمونه‌های رسوب در درون کیسه‌های پلاستیکی در مجاورت یخ به بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب (کرج) منتقل شد. برای جداسازی و شمارش PSB، رقت‌های ده‌دهی از رسوب تهیه و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر در سه تکرار روی محیط کشت اختصاصی NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) با pH ۷ پخش شد. ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت NBRIP

ماده شیمیایی	مقدار ($g.L^{-1}$)
$MgCl_2$	۵
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۵
KCl	۰/۲
$(NH_4)_2SO_4$	۰/۲
$Ca_3(PO_4)_2$	۵
گلوکز	۱۰
آگار	۱۵

پلیت‌های حاوی نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور (JTIL200، ژال تجهیز، ایران) نگهداری شدند. به منظور جداسازی و شمارش PSB از ویژگی تشکیل هاله در اطراف کلنی استفاده شد (Nautiyal, 1999). به این ترتیب که پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت باکتری، کلنی‌هایی که تشکیل هاله داده بودند شمارش و برای خالص‌سازی برداشت شدند. اما برای اطمینان از شمارش کامل PSB، پلیت‌ها در طول مدت یک هفته شمارش شدند. به منظور خالص‌سازی کلنی‌های تشکیل دهنده هاله، از محیط کشت نوترینت آگار (HiMedia، هند) استفاده شد.

بررسی توانایی انحلال فسفات در باکتری‌های حل کننده فسفات

به منظور ارزیابی توانایی باکتری‌های جداسازی شده در انحلال فسفات، سویه‌ها در محیط کشت جامد NBRIP حاوی منبع فسفات نامحلول تری‌کلسیم فسفات (Merck، آلمان) مورد آزمایش قرار گرفت. به این منظور، ابتدا هر یک از سویه‌های باکتریایی در محیط کشت مایع نوترینت آگار (برای یکسان‌سازی جمعیت باکتری‌ها) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس با برداشت ۱۰ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته سویه‌ها در محیط کشت جامد NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات (با سه تکرار) کشت نقطه‌ای داده شد. قطر کلنی و

هاله تشکیل شده در اطراف آن بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰-۲۸ سانتی‌گراد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Nautiyal, 1999). این آزمایش سه بار تکرار شد و میزان کارایی حل‌کنندگی از رابطه ۱ به دست آمد (Nguyen et al., 1992).

رابطه ۱:

قطر کلنی/ قطر هاله = کارایی حل‌کنندگی

به منظور اندازه‌گیری کمی فسفات حل شده توسط سویه‌های باکتریایی از محیط کشت مایع NBRIP به روش Mehta و Nautiyal (۲۰۰۱) استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی از ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP دارای ۵ گرم تری‌کلسیم فسفات منتقل شد. پس از مدت زمان ۷ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تکان دهنده رفت و برگشت (JTIL200، ژال تجهیز، ایران) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰٫۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فسفات محلول رویی با روش مولیبدن آبی اندازه‌گیری شد (Murphy and Riley, 1962).

بررسی توانایی سویه‌های باکتریایی حل کننده فسفات در انحلال سایر ترکیبات فسفات معدنی و آلی نامحلول

به منظور ارزیابی توانایی سویه‌ها در انحلال دیگر ترکیبات فسفات نامحلول، از محیط کشت NBRIP اصلاح شده حاوی ۵ گرم هیدروکسی آپاتیت (Merck، آلمان) به عنوان منبع فسفات معدنی نامحلول و ترکیب آلی فیتات کلسیم (Sigma-Aldrich، اسپانیا) به عنوان منبع فسفات آلی نامحلول استفاده شد. با این هدف هر یک از سویه‌های باکتریایی در یک پلیت حاوی محیط کشت NBRIP با سه تکرار به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند. قطر کلنی و هاله تشکیل شده در اطراف آن بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰- ۲۸ سانتی‌گراد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Nautiyal, 1999). آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج آن به صورت کارایی حل‌کنندگی (رابطه ۱) بیان شد (Nguyen et al., 1992).

تاثیر دما، pH و شوری بر جمعیت سویه‌های برتر حل کننده فسفات

با توجه به این که دما، pH و شوری در محیط استخر پرورش ماهیان گرمابی در طول روز، فصول و همچنین در مناطق مختلف متفاوت است، سویه‌های حل کننده فسفات جداسازی شده برای این که بتوانند حداکثر کارآیی را داشته باشند باید دامنه شاخص‌های محیطی دوره پرورش ماهیان گرمابی را تحمل کنند. از این رو در آزمایشگاه آزمون‌های دما، pH و شوری بر روی آن‌ها انجام شد. آزمون دما در سطوح ۴، ۱۸، ۲۶ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد، آزمون شوری در سطوح ۰، ۱/۵، ۳، ۵ و ۱۰ گرم در لیتر (کلرید سدیم) و آزمون pH در سطوح ۶/۴، ۷/۴، ۸/۴ و ۹/۴ انجام گرفت. به طور خلاصه، از کشت ۴۸ ساعته از سویه‌های مورد نظر (با نسبت ۱ درصد) به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث (Liochem، ایتالیا) تلقیح شد. جمعیت باکتری‌ها با روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) پس از ۲۴ ساعت تخمین زده شد (Koch, 1970).

شناسایی مولکولی سویه‌های برتر حل کننده فسفات با استفاده از توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA

به منظور استخراج ماده ژنتیکی (DNA) از کیت استخراج ژنوم باکتریایی (سیناپیور، سیناژن، ایران) استفاده شد. برای تکثیر ژن مورد نظر (۱۶S rRNA)، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای عمومی ۲۷F و ۱۴۹۲R (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر از هر dNTP (۱۰ میلی‌مولار) ۵ میکرولیتر منیزیم کلرید (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر DNA تک پلیمراز (۵ واحد بر میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده استفاده شد. PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد (Weisburg et al., 1991). برنامه PCR (Biorad، آمریکا) دارای ۳۰ چرخه به صورت چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت شدن ابتدایی) به مدت ۴ دقیقه، در پی آن دمای واسرشت شدن ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه به مدت ۱ دقیقه برای دمای جفت شدن و دمای طویل شدن ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در پایان یک چرخه اضافی (طویل شدن نهایی) با دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه نیز انجام شد. برای اطمینان

از تکثیر باند مورد نظر، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز (Dena Gene Tajhiz، ایران) شد. قطعه تکثیر شده برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی ارسال شد. پس از توالی‌یابی نمونه‌ها، توالی‌های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI، BLAST-n (http:// www.ncbi.lm.nih.gov/BLAST/)جستجو شدند و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد (Hu et al., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 به ترتیب برای تحلیل توصیفی و رسم نمودارها استفاده شد. برای رسم درخت فیلوژنی نیز از نرم‌افزار MEGA نسخه ۶ استفاده شد.

نتایج

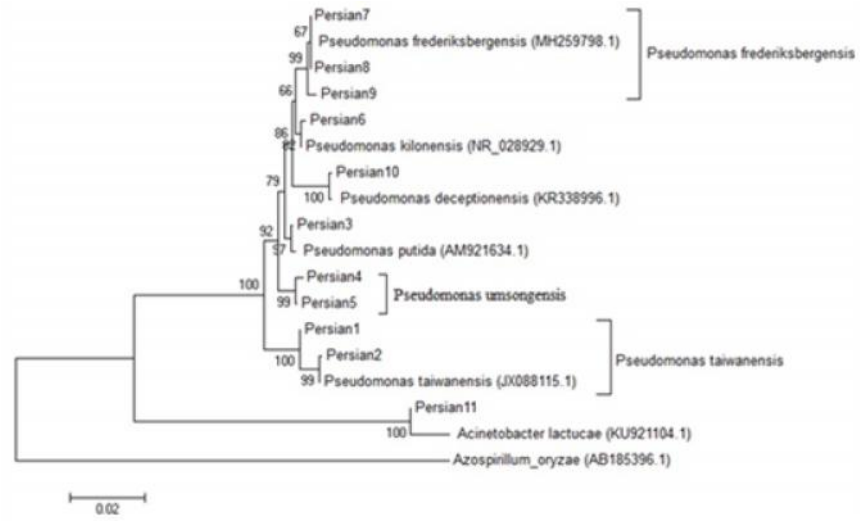
جمعیت باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB) به دست آمده از رسوبات ۳۰ مزرعه پرورش ماهیان گرمابی در نواحی مرکزی استان مازندران، از صفر تا $۳/۱\times۱۰^{۴}$ CFU/g (در هر گرم رسوب) متغیر بود. پنج نمونه از مجموع ۳۰ نمونه فاقد PSB بودند. در مجموع تعداد ۶۴ سویه حل کننده فسفات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی جداسازی و خالص‌سازی شد. از میان ۶۴ سویه جداسازی شده، ۱۱ سویه که کارایی حل‌کنندگی بالاتری داشتند به عنوان سویه برتر انتخاب شدند (جدول ۲). نتایج شناسایی مولکولی نشان داد جنس غالب سویه‌های برتر مربوط به جنس *Pseudomonas* و یک سویه از جنس *Acinetobacter* بود (شکل ۲، جدول ۳). سویه‌های شناسایی‌شده با درصد تشابه ۹۹ درصد متعلق به گونه‌های ذکر شده در جدول ۳ هستند.

سویه‌های برتر دارای هاله مشخص و بزرگی بر روی پلیت‌های NBRIP با منابع فسفات نامحلول تری‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و فیتات کلسیم بودند (شکل ۳).

آزمایش اثر شاخص‌های محیطی بر سویه‌ها نشان داد سویه‌های برتر در محدوده مورد مطالعه دامنه‌ای از دما، pH و شوری را تحمل کردند و رشد و تکثیر مطلوبی داشتند (شکل ۴، ۵، ۶). همچنین بر اساس نتایج مطالعه حاضر (جدول ۲) مشخص شد که سویه‌های برتر شناسایی شده قابلیت بالایی در انحلال فیتات کلسیم داشتند.

جدول ۲: کارایی حل‌کنندگی سویه‌های برتر جداسازی شده از مزارع پرورش ماهیان گرمابی پس از ۱۲۰ ساعات انکوباسیون (میانگین ± انحراف از معیار؛ n=۳)

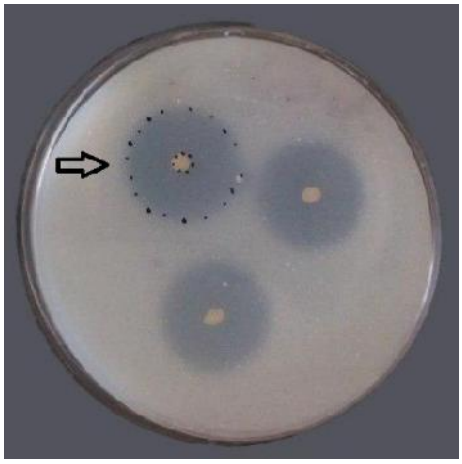
سویه‌ها	کارایی حل‌کنندگی در محیط کشت NBRIP حاوی ترکیبات مختلف فسفات نامحلول		
	تری‌کلسیم فسفات	هیدروکسی آپاتیت	فیتات کلسیم
Persian$_1$	۲/۱۰± ۰/۰۵	۲/۲۵±۰/۰۲	۳/۵۰±۰/۰۲
Persian$_2$	۱/۸۶±۰/۰۴	۲/۶۳±۰/۰۱	۴/۱۸±۰/۰۲
Persian$_3$	۱/۶۴±۰/۰۳	۲/۰۵±۰/۰۱	۷/۰۰±۰/۰۱
Persian$_4$	۲/۸۷±۰/۰۳	۲/۸۲±۰/۰۶	۴/۶۶±۰/۰۷
Persian$_5$	۳/۶۰±۰/۰۱	۳/۵۰±۰/۰۱	۵/۶۶±۰/۰۴
Persian$_6$	۲/۷۵±۰/۰۲	۲/۵۰±۰/۰۱	۴/۵۷±۰/۰۲
Persian$_7$	۲/۸۰±۰/۰۱	۲/۰۰±۰/۰۱	۶/۵۷±۰/۰۷
Persian$_8$	۴/۶۶±۰/۰۸	۲/۷۵±۰/۰۷	۶/۸۵±۰/۰۲
Persian$_9$	۴/۰۰±۰/۰۱	۳/۴۲±۰/۰۴	۸/۳۳±۰/۰۴
Persian$_{10}$	۳/۵۱±۰/۰۱	۵/۳۳±۰/۰۸	۴/۰۰±۰/۰۲
Persian$_{11}$	۲/۸۷±۰/۰۵	۳/۷۱±۰/۰۷	۵/۶۷±۰/۰۸



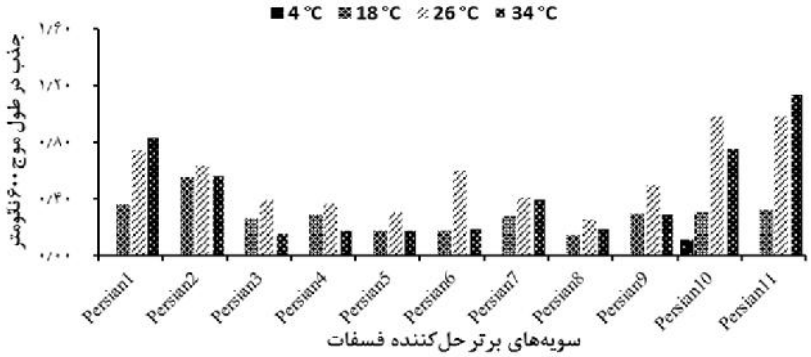
شکل ۲: درخت فیلوژنی سویه‌های مورد مطالعه. گونه *Azospirillum oryzae* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

جدول ۳: نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های برتر بر اساس بالاترین درصد تشابه در بانک جهانی ژن (NCBI)

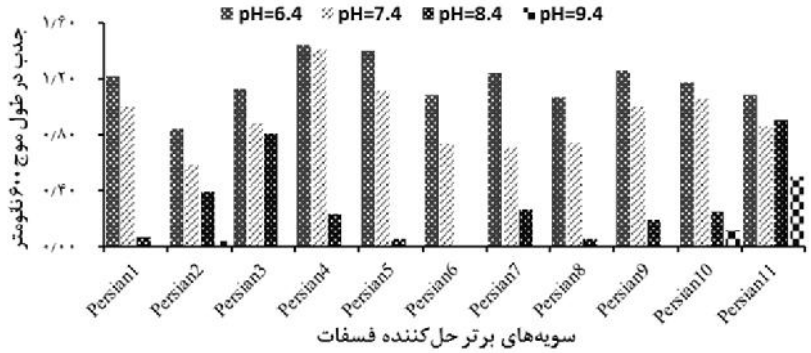
ردیف	نام سویه	گونه مشابه	Accession Number	درصد تشابه ژنتیکی
۱	$Persian_1$	*Pseudomonas taiwanensis*	MH259800	۹۹
۲	$Persian_2$	*Pseudomonas taiwanensis*	MH254940	۹۹
۳	$Persian_3$	*Pseudomonas putida*	MH259803	۹۹
۴	$Persian_4$	*Pseudomonas umsongensis*	MH259798	۹۹
۵	$Persian_5$	*Pseudomonas umsongensis*	MH259802	۹۹
۶	$Persian_6$	*Pseudomonas kilonensis*	MH213343	۹۹
۷	$Persian_7$	*Pseudomonas frederiksbergensis*	MH259806	۹۹
۸	$Persian_8$	*Pseudomonas frederiksbergensis*	MH259805	۹۹
۹	$Persian_9$	*Pseudomonas frederiksbergensis*	MH259799	۹۹
۱۰	$Persian_{10}$	*Pseudomonas deceptionensis*	MH259801	۹۹
۱۱	$Persian_{11}$	*Acinetobacter lactucae*	MH259804	۹۹



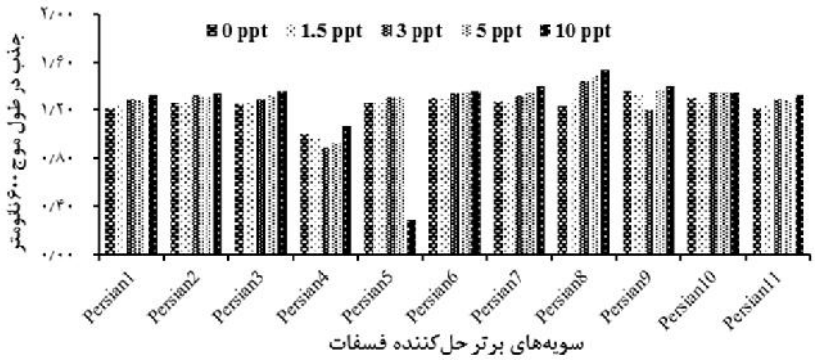
شکل ۳: تولید هاله شفاف در سویه باکتری حل کننده فسفات در محیط کشت NBRIP اصلاح شده (فیتات به عنوان منبع فسفات نامحلول)



شکل ۴: میزان رشد سویه‌ها در دماهای مختلف در محیط کشت نوترینت براث



شکل ۵: میزان رشد سویه‌ها در pH های مختلف در محیط کشت نوترینت براث



شکل ۶: میزان رشد سویه‌ها در شوری‌های مختلف در محیط کشت نوترینت براث

دامنه فسفر آزاد شده در محیط کشت NBRIP مایع حاوی تری‌کلسیم فسفات در مدت زمان یک هفته ۲۱/۹۴ تا ۱۴۲/۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود. کمترین و بیشترین میزان فسفات محلول و pH در محیط به ترتیب ۲۱/۹۴ و ۱۴۲/۲۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳/۸۴ و ۴/۳۷ بود که به ترتیب در سویه‌های $Persian_7$ و $Persian_{11}$ به دست آمد. میانگین pH محیط در سویه‌های شناسایی شده ۴/۰۷ بود. بیشترین و کمترین جمعیت پس از یک هفته انکوباسیون به ترتیب در سویه‌های $Persian_{11}$ و $Persian_7$ به دست آمد (جدول ۴).

جدول ۴: توانایی سویه‌ها در انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط کشت NBRIP مایع

سویه‌ها	فسفات محلول در محیط NBRIP مایع* (mg/L)	جمعیت تلقیح شده	جمعیت پس از یک هفته	pH محیط (بدون تلقیح)*	pH محیط تلقیح شده (پس از یک هفته انکوباسیون)*
$Persian_1$	۲۱/۹۸±۲/۲۵	۱-۲×۱۰^۷	۶×۱۰^۶	۶/۸۳± ۰/۰۲	۴/۰۵±۰/۰۵
$Persian_2$	۸۶/۷۹±۱/۷۹	۱-۲×۱۰^۷	۱/۳۵×۱۰^۷	۶/۷۷±۰/۰۵	۴/۲۸±۰/۰۷
$Persian_3$	۸۱/۷۵±۰/۹۴	۱-۲×۱۰^۷	-	۶/۸۳±۰/۰۲	۴/۰۱±۰/۰۲
$Persian_4$	۲۲/۰۷±۱/۰۴	۱-۲×۱۰^۷	۱/۳۵×۱۰^۳	۶/۶۸±۰/۰۶	۳/۹۴±۰/۰۳
$Persian_5$	۹۲/۱۱±۰/۹۲	۱-۲×۱۰^۷	۱×۱۰^۵	۶/۷۷±۰/۰۵	۴/۲۳±۰/۰۱
$Persian_6$	۷۹/۲۶±۱/۳۱	۱-۲×۱۰^۷	۱/۷×۱۰^۵	۶/۸۳±۰/۰۲	۴/۰۵±۰/۰۶
$Persian_7$	۹۰/۲۷±۴/۰۸	۱-۲×۱۰^۷	-	۶/۷۷±۰/۰۵	۴/۱۴±۰/۰۳
$Persian_8$	۲۵/۸۷±۴/۶۸	۱-۲×۱۰^۷	۱/۵×۱۰^۴	۶/۸۳±۰/۰۲	۳/۹۱±۰/۰۳
$Persian_9$	۲۱/۹۴±۲/۲۲	۱-۲×۱۰^۷	۱/۲×۱۰^۳	۶/۶۸±۰/۰۶	۳/۸۴±۰/۰۱
$Persian_{10}$	۸۰/۵۲±۰/۹۳	۱-۲×۱۰^۷	۲/۱×۱۰۶	۶/۷۷±۰/۰۵	۴/۰۲±۰/۱۷
$Persian_{11}$	۱۴۲/۲۰±۲/۳۲	۱-۲×۱۰^۷	۲/۸۵×۱۰^۷	۶/۶۸±۰/۰۶	۴/۳۷±۰/۰۸

*: داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار هستند.

بحث

بررسی بسیاری از مقالات منتشر شده در حوزه کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB) در کشاورزی و آبزی‌پروری نشان می‌دهد که انتخاب این باکتری‌ها صرفا بر اساس ارزیابی میزان انحلال فسفات آن‌ها در محیط کشت حاوی تری‌کلسیم فسفات (TCP) بوده است (Hu et al., 2010; Xiang et al., 2011; Maitra et al., 2015). بسیاری از سویه‌های انتخاب شده با این رویکرد معمولا در محیط طبیعی کارایی مطلوبی نداشته‌اند (Gyaneshwar et al., 2002; Rengel and Marschner, 2005). بنابراین جداسازی PSB با این فرآیند برای افزایش تولیدکنندگان اولیه در مزارع پرورش ماهی نسبتا ضعیف و غیرقابل اعتماد است. در حالی که نوع ترکیبات نامحلول فسفات موجود در محیط بسیار متنوع هستند (Jiang and Gu, 1989). از این رو، در مطالعه حاضر برای انتخاب قوی‌ترین سویه‌ها پس از استفاده از محیط کشت NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات از منابع دیگر فسفر مانند ترکیبات نامحلول هیدروکسی آپاتیت و فیتات کلسیم (منبع فسفات آلی) نیز استفاده شد. نتایج نشان داد سویه‌های شناسایی‌شده توانایی بالایی در انحلال ترکیبات مختلف فسفات نامحلول داشتند. جمعیت PSB در رسوبات مزارع پرورش ماهیان گرمابی مورد بررسی از صفر تا $۳/۱\times۱۰^{۴}$ CFU/g (در هر گرم رسوب) متغیر بود. پژوهشگران مختلف گزارش کردند که جمعیت PSB به شدت با نوع و میزان کوددهی (آلی و معدنی) و نسبت کربن به نیتروژن در مزارع پرورش ماهی در ارتباط است (Jana et al., 2001). در این راستا Zheng و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند استفاده طولانی مدت از کودهای نیتروژنی در بعضی از مزارع پرورش ماهی موجب کاهش pH رسوبات، انحلال فسفات معدنی و همچنین کاهش جمعیت PSB می‌شود. همچنین استفاده بیش از حد از کودهای آلی باعث ایجاد شرایط بی‌هوازی در رسوبات می‌شود که این امر در بعضی مزارع پرورش ماهی موجب شده است تا PSB که اکثرا هوازی هستند حذف و یا بسیار کاهش یابند. نتایج مطالعه Jana و همکاران (۲۰۰۱) نیز نشان داد افزایش نسبت کربن به نیتروژن موجب کاهش فراوانی PSB می‌شود. نتایج ارزیابی سویه‌های جداسازی شده در انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط کشت مایع NBRIP نشان داد دامنه فسفات آزاد شده در مدت زمان یک هفته در سویه‌ها ۲۰/۰۹ تا ۱۴۰/۳۸ میلی‌گرم در لیتر (میانگین

۶۷/۳۱ میلی‌گرم در لیتر) بود که تقریبا مشابه با نتایج Maitra و همکاران (۲۰۱۵) و دیگر نتایج گزارش شده از محیط دریایی و آب شیرین بود (De Souza et al., 2000; Qian et al., 2010; Ramkumar and Kannapiran, 2011). کاهش بسیار محسوس pH محیط NBRIP مایع نشان می‌دهد سویه‌ها قابلیت بالایی در ترشح اسیدهای آلی دارند. با این وجود میزان فسفات محلول در محیط نسبتا کم بود. بنابراین، احتمالا PSB جداسازی شده از محیط‌های آبی کارایی کمی در انحلال ترکیبات معدنی نامحلول تری‌کلسیم فسفات دارند. با این وجود استثناهایی نیز وجود دارد. برای مثال، گونه باکتری *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* جداسازی شده از مزارع پرورش ماهی توانایی بالایی را در انحلال تری‌کلسیم فسفات (۵۴۳ میلی‌گرم در لیتر) داشت (Hu et al., 2010) و توانایی انحلال فسفات در سویه جداسازی شده در مطالعه Seshadri و همکاران (۲۰۰۲) ۱۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. همچنین میزان فسفات قابل دسترس در محیط بر میزان بیان ژن و فعالیت حل‌کنندگی میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات بسیار تاثیر دارد (Goldstein and Liu, 1987; Mikanova and Novakova, 2002). افزایش سطح فسفات قابل دسترس باعث کاهش فعالیت حل‌کنندگی بعضی PSB می‌شود. بنابراین میزان اندک فسفات محلول محیط نشان می‌دهد میزان فسفات محلول در محیط احتمالا باعث کاهش فعالیت حل‌کنندگی سویه‌ها شده است (Feedback Regulation). با این وجود، فعالیت حل‌کنندگی سویه $Persian_2$ نسبت به $Persian_1$ و $Persian_5$ نسبت به $Persian_4$ که متعلق به یک گونه هستند در سطوح بالاتری از فسفات محلول و قابل دسترس کاهش یافت (جدول ۴). PSB با ترشح اسیدهای آلی مختلف مانند گلوکونیک اسید، مالیک اسید، سیتریک اسید، اگزالیک اسید و غیره باعث انحلال ترکیبات معدنی فسفات نامحلول می‌شوند (Bianco and Defez, 2010). بیشترین میزان فسفات محلول و pH در سویه $Persian_{11}$ به دست آمد که نشان می‌دهد این سویه اسیدهای آلی موثرتری برای انحلال ترکیبات معدنی فسفات داشت. نتایج شمارش جمعیت سویه‌ها در محیط NBRIP مایع پس از یک هفته نشان داد سویه‌های شناسایی شده توانایی رشد و انحلال ترکیبات معدنی فسفات را حتی در pHهای کم نیز دارند. همان طور که در جدول ۲ مشخص است، سویه‌های

شناسایی شده توانایی بالایی در انحلال فیتات داشتند که نشان می‌دهد احتمالا فسفات آلی منبع مهمی از فسفر محبوس شده در مزارع پرورش ماهی است. بنابراین سویه‌هایی در اکوسیستم‌های پرورش ماهی غالب شده‌اند که علاوه بر ترشح اسیدهای آلی برای انحلال ترکیبات معدنی، توانایی بالایی نیز در تولید آنزیم‌های خارج سلولی مانند فسفاتازها و فیتازها (Bianco and Defez, 2010) برای انحلال ترکیبات آلی دارای فسفر دارند.

امروزه برای دستیابی به تولید محصولات آبزی‌پروری سالم، استفاده بهینه از واحد سطح، کاهش تخریب محیط زیست و افزایش سود اقتصادی، مصرف کمتر کودهای شیمیایی در دستور کار قرار دارد (Crab et al., 2012). به کارگیری میکروارگانیسم‌هایی مانند PSB به عنوان کود زیستی در مزارع پرورش ماهی می‌تواند جایگزین شود و یا تا حد زیادی استفاده از کودهای شیمیایی فسفره را کاهش دهد که دارای عناصر سمی و سنگین هستند که می‌تواند از طریق زنجیره غذایی به سلامتی انسان آسیب برساند. از سوی دیگر، برای کاهش خطرات اکولوژیکی در استفاده از این میکروارگانیسم‌ها، سویه‌های حل کننده فسفات جداسازی شده از محیط‌های آبی که می‌توانند خود را به خوبی در همان محیط انطباق دهند، بسیار ضروری است. از این رو، PSBهای شناسایی شده از مزارع پرورش ماهیان گرمابی به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفره، می‌تواند برای دستیابی به اهداف آبزی‌پروری پایدار در کشور مفید باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از ریاست محترم موسسه تحقیقات خاک و آب کشور جناب آقای دکتر هادی اسدی رحمانی، کارشناسان محترم بخش بیولوژی خاک موسسه خاک و آب سرکار خانم مهندس علیزاده، اربابی و شمشیری‌پور و پرنسل محترم آزمایشگاه علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس جناب آقایان دکتر کمالی، مهندس نورانی و حسینی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

منابع

فلاح نصرت‌آباد ع.ر.، رحیمیان ح.، صالح راستین ن. و ملکوتی م.ج. ۱۳۸۲. بررسی پراکنش ریزجانداران حل کننده فسفات در تعدادی از خاک‌های استان گیلان. نشریه خاک و آب، ۱۷(۲): ۱۷۶-۱۶۲.

فلاح نصرت‌آباد ع.ر. و شریعتی ش. ۱۳۹۳. بررسی تاثیر باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس در عملکرد گندم و جذب عناصر غذایی و مقایسه آن با کودشیمیایی و آلی. نشریه آب و خاک، ۲۸(۵): ۹۸۶-۹۷۶.

Bagyaraj D.J., Krishnaraj P.U. and Khanuja S.P.S. 2000. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molecular genetics. Proceedings of the Indian National Science Academy, 66(2/3): 69–82.

Bakhshandeh E., Rahimian H., Pirdashti H. and Nematzadeh G.A. 2015. Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. Journal of Applied Microbiology, 119(5): 1371–1382.

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.

Bostrom B., Andersen J.M., Fleischer S. and Jansson M. 1988. Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. Hydrobiologia, 170(1): 229–244.

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 Press, USA. 41P.

Chakrabarty D. and Das S.K. 2007. Bioturbation-induced phosphorous release from an insoluble phosphate source. Biosystems, 90(2): 309–313.

Chakraborty P., Biswas J.K. and Jana B.B. 2004. Sediment raking as a tool for enhancement of phosphate and productivity of water in pond system. Hydrobiologia, 524(1): 157–165.

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. Journal of Environmental Sciences, 23(2): 206–211.

Crab R., Defoirdt T., Bossier P. and Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future

challenges. Aquaculture, 356(1): 351–356.

De Souza B.D., Nair S. and Chandramohan D. 2000. Phosphate solubilizing bacteria around Indian peninsula. Indian Journal of Marine Science, 29: 48–51.

FAO. 2016. The Status of the World Fisheris and Aquaculture. FAO, Italy. 190P.

Goldstein A.H. and Liu S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. Nature Biotechnology, 5(1): 72–74.

Gyaneshwar P., Kumar G.N., Parekh L.J. and Poole P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Journal of Plant and Soil, 245(1): 83–93.

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.

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. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Springer, Netherland. P: 229–238.

Jana B.B., Chatterjee J., Ganguly S. and Jana T. 2001. Responses of phosphate solubilizing bacteria to qualitatively different fertilization in simulated and natural fish ponds. Aquaculture International, 9(1): 17–34.

Jiang B. and Gu Y. 1989. A suggested fractionation scheme of inorganic phosphorus in calcareous soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 20(3): 159–165.

Jiao W., Chen W., Chang A.C. and Page A.L. 2012. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. Environmental Pollution, 168: 44–53.

Kestemont P. 1995. Different systems of carp production and their impacts on the environment. Journal of Aquaculture, 129: 347–372.

Koch A.L. 1970. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. Analytical Biochemistry, 38(1): 252–259.

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. Applied Soil Ecology, 96: 217–224.

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.

Mehta S. and Nautiyal C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology, 43(1): 51–56.

Middleton V.G. 2003. Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks. Encyclopedia of earth sciences series. Kluwer, Dordrecht. 928P.

Mikanova O. and Novakova J. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. Rostlinna Vyroba, 48(9): 397–400.

Murphy J.A.M.E.S. and Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, 27: 31–36.

Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1): 265–270.

Nguyen C., Yan W. and Le T.F. 1992. Genetic variability phosphate-solubilizing activity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. Plant Soil, 143: 193–199.

Qian Y., Shi J., Chen Y., Lou L., Cui X., Cao R. and Tang J. 2010. Characterization of phosphate solubilizing bacteria in sediments from a shallow eutrophic lake and a wetland: Isolation, molecular identification and phosphorus release ability determination. Molecules, 15(11): 8518–8533.

Raj S.N., Shetty H.S. and Reddy M.S. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity. P: 197–216. In: Siddiqui Z.A. (Ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands.

Ramkumar V.S. and Kannapiran E. 2011. Isolation of total heterotrophic bacteria and phosphate solubilizing bacteria and in vitro study of phosphatase activity and production of phytohormones by PSB. Archives of Applied Science Research, 3(5): 581–586.

Rengel Z. and Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. New Phytologist, 168(2): 305–312.

Richardson A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. Soil Biota, 50: 35–39.

Seshadri S., Ignacimuthu S. and Lakshminarsimhan C. 2002. Variations in heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai, southeast coast of India. Indian Journal of Marine Sciences, 31: 69–72.

Song W., Yuan L.N., Xiao L.L., Zhan Z., Yang L.Y. and Jiang L.J. 2007. Alkaline phosphatase activity and the distribution of phosphate solubilizing bacteria and the relationship between them in sediments of Lake Taihu. Journal of Environmental Sciences, 28(10): 2355–236.

Sugunan V.V. 2000. Ecology and fishery management of reservoirs in India. Hydrobiologia, 430(1-3): 121–147.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697–703.

Wu G.F., Hu J. and Wu J. 2009. Distribution of cultivable bacterial communities in two eutrophic aquatic ecosystems, eastern China. Hydrobiologia, 618(1): 65–76.

Xiang W.L., Liang H.Z., Liu S., Luo F., Tang J., Li M.Y. and Che Z.M. 2011. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(11): 2629–2637.

Zheng B.X., Hao X.L., Ding K., Zhou G.W., Chen Q.L., Zhang J.B. and Zhu Y.G. 2017. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil. Scientific Reports, 7: 1–10 (42284).

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 6, No. 4, Winter 2019

Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from warm-water fish farms as phosphate biofertilizer candidates

Mostafa Armandeh[1], Nemat Mahmoudi[2]*, Ali Reza Fallah Nosratabad[3]

Received: January 2018 Accepted: April 2018

Abstract

The bio-availability of phosphorus for primary producers is reduced mainly due to the formation of complex with cations and organic matter in warm-water fish ponds. Therefore, the most important new approaches for increasing water-soluble phosphate that are consistent with the principles of sustainable agriculture are the use of phosphate solubilizing and mineralizing bacteria (PSB). For this purpose, sampling of the sediment of warm-water fish ponds in central regions of Mazandaran province was carried out. Isolation and identification of bacteria were performed using by National Botanical Research Institute (NBRIP) medium and 16s rRNA gene sequence. The ability of strains to grow in the range of environmental parameters of warm-water fish ponds was also evaluated. In the present study, a total of 64 PSB strains were isolated, among these, 11 stronger PSBs were including *Pseudomonas taiwanensis* ($Persian_1$ and $Persian_2$), *P. putida* ($Persian_3$), *P. umsongensis* ($Persian_4$ and $Persian_5$), *P. kilonensis* ($Persian_6$), *P. frederiksbergensis* ($Persian_7$, $Persian_8$ and $Persian_9$), *P. deceptionensis* ($Persian_{10}$) and *Acinetobacter lactucae* ($Persian_{11}$) had the best performance in solubilizing insoluble phosphates. The results showed that these strains have a high ability to dissolve insoluble phosphate compounds and grow well under the environmental parameter of warm-water fish ponds.

Key words: *Phosphorus, Phosphate Solubilizing Bacteria, Biofertilizer, Warm-water Fishes*.

1- M.Sc. Student in Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3- Associate Professor in Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
*Corresponding Author: n.mahmoudi360@modares.ac.ir