محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بکارگیری باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان کود زیستی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی

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

[۱] دانشیار بخش تحقیقات بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۲] استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

[۳] دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

قابلیت دسترسی زیستی فسفر برای تولیدکنندگان اولیه (فیتوپلانکتون‌ها) در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی عمدتاً به واسطه تشکیل کمپلکس با کاتیون‌ها و مواد آلی به‌شدت کاهش می‌یابد. در این راستا، برای افزایش فسفات محلول در آب منطبق بر اصول کشاورزی پایدار، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات بسیار ضروری است. با این هدف، نمونه‌برداری از رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران انجام شد. جداسازی باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت NBRIP انجام و سپس سویه‌ها با روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. به علاوه، تاثیر تغییرات دما، pH و شوری (منطبق با شرایط محیطی استخرهای پرورشی) بر رشد سویه‌ها بررسی شد. همچنین توانایی موثرترین سویه در آزادسازی فسفات از رسوبات در شرایط آکواریوم مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر، ۶۴ سویه جداسازی شد که از میان آن سویه $Persian_{10}$ (*Pseudomonas deceptionensis*) به‌عنوان موثرترین سویه در آزادسازی فسفر انتخاب شد که قابلیت رشد مطلوبی در شرایط استخرهای پرورشی نیز دارد. به طور کلی نتایج نشان داد که با تلقیح این سویه به درون اکواریم، میزان فسفات محلول آب به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از گروه بدون تلقیح بود. بر اساس نتایج این مطالعه، از سویه $Persian_{10}$ می‌توان به‌عنوان باکتری موثر حل‌کننده فسفات به‌عنوان کودهای زیستی برای استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: فسفر، فیتوپلانکتون، رسوبات، تولیدکنندگان اولیه، آبزی پروری

مقدمه

تغذیه و تولید ماهیان گرمابی شامل ماهی فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix)، سرگنده (Hypophthalmichthys nobilis)، کپور (Cyprinus carpio) و آمور (Ctenopharyngodon idella) در استخرهای خاکی به شکل مستقیم و غیرمستقیم به تولیدات طبیعی استخر وابسته است (Boyd و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین افزایش تولیدات طبیعی (فیتوپلانکتون‌ها و سپس زئوپلانکتون‌ها) در استخرهای پرورشی خاکی برای افزایش تولید ماهی بسیار ضروری می‌باشد. فسفر از مواد مغذی ضروری در کنترل تولیدات اولیه می‌باشد. در مزارع پرورشی ماهی به‌منظور افزایش سطح مواد مغذی محلول در آب (به‌ویژه فسفر) و نهایتاً افزایش تولیدات اولیه و ثانویه از کودهای مختلف شیمیایی و آلی استفاده می‌شود. به‌طور کلی در طول یک دوره پرورش ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ کیلوگرم کودهای شیمیایی و ۱۰ تا ۱۲ تن کودهای حیوانی به ازای هر هکتار بکار می‌رود (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲)، که میزان کاربرد کود شیمیایی فسفاته (به‌ویژه سوپر فسفات تریپل)، ۲۰۰ تا ۴۰۰ کیلوگرم می‌باشد.

با توجه شرایط قلیایی محیط استخرهای ماهیان گرمابی، درصد بسیار زیادی از فسفر به‌صورت ترکیب با کلسیم و منیزیم رسوب کرده و از دسترس خارج می‌گردد. علاوه بر این، در استخرهای پرورشی به‌منظور از بین بردن ارگانیسم‌های بیماری‌زا، تنظیم pH و سیستم بافری آب، آهک‌های مختلفی ($CaCO_3$، CaO و $Ca(OH)_2$) به مقدار زیاد (تقریباً ۳ تا ۵ تن) استفاده می‌شود. همچنین مطالعات گزارش کردند که نیمی از فسفر کودهای فسفاته توسط کلسیم موجود در خود این کود از دسترس خارج می‌گردد. از این‌رو درصد بسیار زیادی از فسفر محلول در آب استخر (حدود ۷۵ تا ۹۰ درصد) از دسترس خارج می‌گردد و این شرایط سبب بازده بسیار پایین کودهای شیمیایی گردیده که موجب مصرف بی‌رویه و مخرب آن‌ها می‌گردد.

* ایمیل نویسنده مسئول: Rezafayah@yahoo.com

این کودها از معادن سنگ فسفات تولید می‌شوند که این معادن همواره دارای عناصر فلزی و سمی نظیر کادمیوم، آرسنیک و سرب به‌عنوان ناخالصی نیز می‌باشند و حذف این ناخالصی‌ها تقریباً غیرممکن است. لذا کاربرد مداوم و زیاد این کودهای فسفره اغلب منجر به تجمع عناصر سمی و آلودگی خاک و آب می‌گردد و ممکن است از طریق زنجیره غذایی به انسان برسد(McLaughlin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Raven و Loeppert، ۱۹۹۷؛ Luo و همکاران، ۲۰۰۹). برای تولید هر تن کود شیمیایی فسفاته، حدود ۵ تن فسفوژیپسوم به عنوان محصول جانبی تولید می‌گردد که خود به‌عنوان یک چالش محیط زیستی بزرگ در صنعت فسفات می‌باشد. به‌علاوه انتشار گازهای گلخانه متاثر از تولید (ناشی از مصرف سوخت فسیلی) و مصرف کودها نیز به‌عنوان یک معضل مهم جهانی مطرح می‌باشد. گزارشات جهانی نیز حاکی کاهش شدید منابع سنگ فسفات طی ۵۰ سال آینده می‌باشد که خود چالشی جدی در مسیر تولید آن‌ها خواهد بود (Nichols و Middleton، ۲۰۰۳). از طرف دیگر، گزارش‌ها نشان می‌دهد که بیش از ۹۰ درصد از کودهای شیمیایی فسفاته مصرفی در ایران، وارداتی بوده که این مساله موجب وابستگی بیشتر و خروج ارز از کشور می‌گردد.

بنابراین با توجه به شرایط محیطی خاص حاکم بر استخرها (وجود حجم زیاد رسوب و ارتفاع زیاد آب روی رسوب، نوسانات اکسیژنی، pH قلیایی و غیره) و مدیریتی ویژه آن‌ها و لزوم رعایت قوانین کشاورزی پایدار لازم است با به‌کارگیری تکنیک‌ها و روش‌های دوستدار محیط زیست، فسفر قابل دسترس در استخرها افزایش یابد.

از مهم‌ترین روش‌های افزایش فسفر قابل دسترس و استفاده بهینه از فسفر انباشته شده در رسوبات استخرها (کمپلکس‌های آلی و معدنی)، استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها با مکانیزم‌های متنوعی از جمله تولید اسیدهای آلی و سنتز آنزیم‌ها، باعث آزادشدن فسفر غیرمحلول (آلی و معدنی نامحلول) به شکل محلول و قابل دسترس می‌گردند (Bianco و Defez، ۲۰۱۰). در بین میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات، باکتری‌ها نقش بسزایی در افزایش فسفات قابل دسترس دارند (Jana، ۲۰۰۷؛ Maitra و همکاران، ۲۰۱۵).

در سال‌های اخیر، در جهان، جداسازی و استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفر به منظور بهبود رشد گیاهان زراعی و باغی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (فلاح نصرت‌آباد و همکاران، ۱۳۸۲؛ فلاح نصرت‌آباد و شریعتی، ۱۳۹۳؛ Fallah Nosratabad و همکاران، ۲۰۱۷). اما استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در حوزه آبزی‌پروری در ابتدای مسیر خود قرار دارد و بیشتر در فاز تحقیقاتی و آزمایشگاهی قرار دارد.

حضور فیتوپلانکتون در حوزه آبزی‌پروری به‌عنوان گونه هدف، با ساختار متفاوت (بدون ریشه و معلق در آب) از گیاهان باغی و زراعی و همچنین رابطه قوی‌تر بین آب و رسوب سبب شده است که این تحقیق نسبت به تحقیقات سایر حوزه‌های کشاورزی کاملاً متمایز باشد. بررسی مطالعات انجام شده نشان داده است که پژوهشی در ارتباط با استفاده از گونه‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان کود زیستی در حوزه آبزی پروری ایران انجام نشده است و از این حیث، این مطالعه به‌عنوان اولین دستآورد پژوهشی در ایران می‌باشد.

مطابق اسناد بالادستی (برنامه پنجم توسعه) باید تا پایان برنامه حداقل ۳۵ درصد از کودهای مصرفی کشاورزی تحت پوشش کودهای زیستی قرار گیرند. بر اساس گزارش اخیر فدراسیون بین المللی جنبش کشاورزی ارگانیک و موسسه تحقیقات کشاورزی ارگانیک در سال ۲۰۱۴، حدود ۴۳/۷ میلیون هکتار اراضی کشاورزی ارگانیک در جهان وجود داشته است (حدود یک درصد از کل اراضی کشاورزی جهان) که بیش‌ترین مقدار آن در اقیانوسیه و کم‌ترین آن در آفریقا می‌باشد. بر اساس گزارش این دو نهاد بین المللی، تنها حدود ۰/۰۸ درصد از کل اراضی کشاورزی ایران زیر کشت محصولات ارگانیک می‌باشد، این در حالی است که در کشورهای پیشرو ۲ تا ۳ درصد سطح زیر کشت آن‌ها به این محصولات اختصاص دارد. از این حیث، ایران در بین ۱۷۲ کشور مورد مطالعه رتبه ۸۴ را دارد. بنابراین کاربرد مکمل زیستی باکتری فسفاتی در مزارع آبزی‌پروری در تحقق اهداف برنامه بالادستی کشور نیز ضروری است.

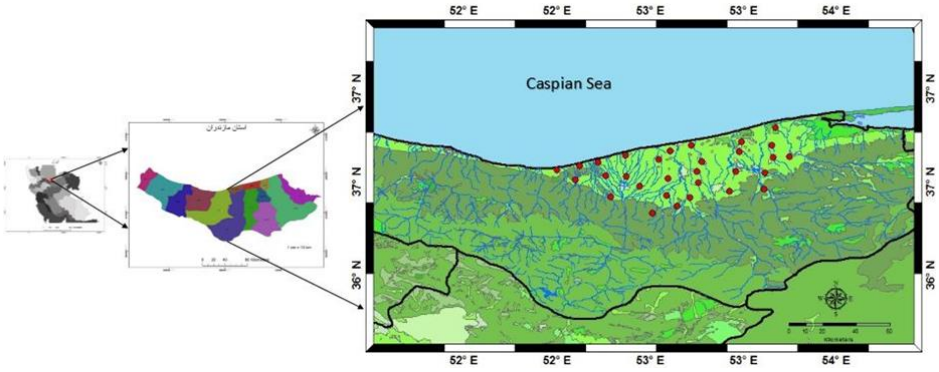
با توجه به پتانسیل بالای تولید ماهیان گرمابی در کشور (حدود ۵۰ درصد از تولیدات آبزی‌پروری کشور) و همچنین مزایای کودهای زیستی (غالباً ارزان قیمت، همگام با طبیعت و پایدار)، استفاده از این نوع کودها می‌تواند برای رسیدن به اهداف آبزی‌پروری پایدار در کشور بسیار مفید باشد. همچنین به نظر می‌رسد با توجه به مساحت بالای زیر کشت ماهیان گرمابی در کشور (تقریباً ۵۰۸۳۵ هکتار) بازار مناسبی برای تولید و فروش کودهای زیستی در حوزه آبزی پرورش وجود داشته باشد.

لذا با توجه به وجود ترکیبات نامحلول ترکیبات کلسیم فسفات (Ca-P) در استخرهای ماهیان گرمابی و شرایط قلیایی استخرها، در مطالعه حاضر تلاش شد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات موثر بر انحلال تری‌کلسیم فسفات (TCP) از رسوبات استخرهای مازندران جداسازی و شناسایی شوند. سپس توانایی این باکتری‌ها در آزادسازی فسفر از TCP در محیط کشت جامد و مایع و مقاومت به شرایط محیطی (دما، شوری و pH) ارزیابی گردد. در نهایت تأثیر موثرترین سویه (توانایی بالای انحلال فسفر و رشد در دامنه وسیعی از پارامترهای محیطی) در شرایط آکواریوم (شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی) بر سطح فسفات محلول آب بررسی 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 یکنواخت از نمونه‌بردار گرب ون‌وین (Hydro-Bios، آلمان) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. نقاط نمونه‌برداری در 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 آزمایشگاه منتقل شد. فرآیند جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفر در موسسه تحقیقات خاک و آب کشور انجام شد. با توجه به شرایط مدیریتی استخر (آهک پاشی، کوددهی آلی و معدنی و غذادهی) و شرایط قلیایی pH، ترکیبات کلسیم فسفات به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات معدنی نامحلول فسفر مطرح می‌باشد. از این‌رو، در این مطالعه برای جداسازی و انتخاب باکتری‌های حل‌کننده فسفات از محیط کشت NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات استفاده شد (Hu و همکاران، ۲۰۱۰). به‌منظور جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفر ابتدا ۱۰ گرم از نمونه رسوبات هموژن‌شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب نمک استریل ۰/۸۵ درصد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی تکان دهنده رفت و برگشت قرار داده شد. سپس رقت‌های متوالی تا ۸-۱۰ تهیه و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر در سه تکرار روی محیط کشت جامد NBRIP (pH=۷) پخش شد (جدول ۱) و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگه‌داری شدند. به‌طور کلی به‌منظور جداسازی و شمارش باکتری‌های حل‌کننده فسفات از ویژگی تشکیل هاله در اطراف کلنی استفاده شد (Nautiyal، ۱۹۹۹). همچنین با توجه به خصوصیات و تفاوت‌های مورفولوژیکی کلنی‌ها، کلنی‌های تشکیل-دهنده هاله در محیط کشت جامد NBRIP با استفاده از لوپ آزمایشگاهی استریل برداشت و در محیط کشت عمومی نوترینت آگار خالص‌سازی شدند.

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

پس از خالص‌سازی سویه‌ها برای مقایسه توانایی انحلال فسفر سویه‌های جداشده از شاخص حل‌کنندگی در محیط کشت NBRIP جامد حاوی تری-کلسیم فسفات (منبع فسفات معدنی نامحلول) و همچنین میزان رهاسازی فسفات در محیط کشت محیط کشت NBRIP مایع استفاده شد. در این راستا برای مقایسه توانایی حل‌کنندگی سویه‌ها در محیط کشت جامد ابتدا به‌منظور یکسان‌سازی جمعیت سویه‌ها هر یک از سویه‌های باکتریایی در محیط کشت نوترینت براث (مایع) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط کشت (مایع) در محیط کشت جامد به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ تا ۳۰ سانتی‌گراد به‌صورت نقطه‌ای کشت داده شد (سه تکرار). در نهایت موثرترین سویه‌ها بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی به عنوان شاخص حل‌کنندگی (رابطه ۱) شناسایی شد (Nautiyal, 1999). بر اساس این شاخص جدایه‌ای که نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیشتری داشته باشد، قدرت حل‌کنندگی بالاتری خواهد داشت.

رابطه ۱ قطر کلنی/ قطر هاله = شاخص حل‌کنندگی

به‌منظور اندازه‌گیری کمی فسفات حل‌شده توسط سویه‌های باکتریایی از محیط کشت مایع NBRIP به روش Mehta و Nautiyal (۲۰۰۱) استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی (جمعیت ۱۰۸×۲-۱) از ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت NBRIP منتقل شد. ارلن‌ها (حاوی محیط کشت) به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور تکان-دهنده رفت و برگشت (انکوباتور شیکردار) نگه‌داری شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و فسفات محلول‌رویی با روش مولیبدات آبی اندازه‌گیری گردید (Mehta and Nautiyal, 2001). جمعیت باکتری‌ها با استفاده از روش شمارش درون پلیت شمارش شد. به‌منظور بررسی اثر اتوکلاو بر مقادیر فسفات‌های محلول در محیط‌های کشت، مقدار فسفات محلول در محیط کشت بدون باکتری (گروه کنترل) اندازه‌گیری شد.

شناسایی مولکولی موثرترین سویه حل‌کننده فسفات

به‌منظور شناسایی مولکولی سویه‌های موثر با استفاده از روش توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA ابتدا برای استخراج ماده ژنتیکی (DNA) از کیت استخراج ژنوم باکتریایی (سیناپیور، سیناژن، ایران) استفاده شد. به‌منظور تکثیر ژن مورد نظر از آغازگرهای عمومی رفت ۲۷F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و برگشت ۱۴۹۲R (GGTTACCTTGTTACGACTT)، دئوکسی ریبونوکلئوتیدهای سه فسفاته (DNTPs)، منیزیم کلراید (MgCl2)، DNA تک پلیمراز و DNA استخراج شده استفاده گردید (جدول ۳-۴). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد (Weisburg و همکاران، ۱۹۹۱). برنامه PCR دارای ۳۰ چرخه به‌صورت چرخه نخستین با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت‌شدن ابتدایی) به مدت ۴ دقیقه، در پی آن دمای واسرشت‌شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (دمای جفت‌شدن) و دمای طویل‌شدن ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در پایان نیز یک چرخه اضافی (طویل‌شدن

نهایی) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد SimplySafe (جایگزین اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی اسیدهای نوکلئیک) منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعه تکثیر شده جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر[1]کره جنوبی ارسال شد. تعلق توالی‌های بدست آمده با استفاده از ابزار بلاست[2](مقایسه توالی مورد نظر با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر دارد) انجام و به بررسی یافته‌های آن‌ها پرداخته شد. به‌منظور انجام عمل بلاست از کانتیگ[3](توالی پیوسته‌ای از DNA که از کنار هم‌گذاری توالی‌های رفت[4]و برگشت[5]ساخته می‌شود) ساخته‌شده توسط نرم‌افزار ContigExpress 11.5.3 استفاده شد. توالی سویه شناسایی‌شده در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت و شماره دسترسی سویه‌ها دریافت شد و از طریق پایگاه الکترونیک این بانک قابل دستیابی می‌باشند.

انتخاب موثرترین سویه (از بین ۱۱ سویه‌ی شناسایی‌شده) بر اساس توانایی انحلال در محیط کشت مایع و توانایی رشد و تکثیر در شرایط محیطی مختلف (دما، pH و شوری)

به‌منظور انتخاب موثرترین سویه (بین سویه‌های شناسایی‌شده به روش مولکولی) از معیار میزان فسفات محلول در محیط کشت مایع و توانایی رشد و تکثیر در شرایط محیطی مختلف از جمله تغییرات دما، pH و شوری استفاده شد.

با توجه به اینکه دما، pH و همچنین شوری در مزارع پرورش ماهیان گرمابی در طول روز، فصول و همچنین در مناطق مختلف متفاوت است، سویه‌های جداسازی‌شده برای اینکه بتوانند حداکثر کارآیی را داشته باشند، باید در دامنه‌ی وسیعی از پارامترهای محیطی قابلیت رشد و تکثیر داشته باشند. از این‌رو، در آزمایشگاه تاثیر سطوح مختلف دما، pH و شوری (متناسب با دوره پرورش ماهیان گرمابی در استان مازندران) بر توانایی رشد و تکثیر و زنده-مانی سویه‌های مختلف ارزیابی شد. ارزیابی اثر دما در سطوح ۴، ۱۸، ۲۶ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

با توجه به اینکه شوری آب در استخرها طی نمونه‌برداری در مناطق مختلف بین ۰ تا ۶ گرم بر لیتر متغیر بود (سنجش‌شده توسط شوری‌سنج چشمی). از این‌رو، تست شوری در سطوح ۰، ۱/۵، ۳، ۵ و ۱۰ گرم در لیتر (کلرید سدیم) بر رشد و زنده‌مانی سویه‌ها انجام شد.

به‌علاوه به‌دلیل فعالیت‌های عمده بیولوژیکی موجود در استخر (فتوسنتز و تنفس) تغییرات pH محسوسی در طول شبانه روز وجود دارد. بنابراین تست pH در سطوح ۶/۴، ۷/۴، ۸/۴ و ۹/۴ انجام گرفت. برای ارزیابی اثر پارامترهای محیطی ذکر شده، از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های مورد نظر (با نسبت ۱ درصد) (جمعیت ۱۰۷×۲-۱) به ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث استفاده شد. سپس جمعیت باکتری‌ها با روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) پس از ۲۴ ساعت تخمین زده شد (Koch، ۱۹۷۰). به‌طور کلی، در روش کدورت‌سنجی، رشد و تراکم باکتری‌ها با استفاده از کدورت محیط (OD) تعیین می‌گردد. در واقع هر چه کدورت محیط بیشتر باشد، رشد و تکثیر و در نتیجه تراکم بیشتر است.

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر در شرایط آکواریوم

پرتودهی رسوبات و تعیین دوز بهینه استریل

برای بررسی اثر باکتری در آزادسازی فسفات در شرایط آکواریوم ابتدا رسوبات استریل شد. در این مطالعه برای استریلاسیون رسوبات از پرتو گاما به دلیل اثرات قوی‌تر بر حذف میکروارگانیسم‌های خاک و همچنین اثرات کمتر بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک نسبت به سایر روش‌ها (اتوکلاو، گرمادهی خشک، مواد و گازهای شیمیایی و غیره) استفاده شد (McNamara و همکاران، ۲۰۰۳).

[1] Bioneer
[2] Blast
[3] Contig
[4] Forward
[5] Reverse

برای تعیین دز بهینه استریل پرتو گاما، نمونه‌هایی از رسوبات بستر استخر پرورش ماهیان گرمابی جمع‌آوری و در مخزنی به‌صورت فیزیکی مخلوط شدند. به‌منظور جلوگیری از آلوده شدن رسوبات پس از پرتودهی، نمونه‌های رسوبات قبل از پرتودهی، به‌طور کامل بسته‌بندی[1] و سپس درون دستگاه گاما سل کبالت۶۰[2] تحت پرتو گاما با دوزهای ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۹۰ کیلوگری[3] (یک گری عبارت است از مقدار انرژی جذب شده بر حسب ژول در یک کیلوگرم ماده) قرار داده شد. پس از پرتودهی، نمونه‌ها به بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک ایران منتقل و سپس جمعیت میکروارگانیسم‌ها در طول ۲ هفته انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفت.

پس از شمارش میکروارگانیسم‌ها در رسوبات پرتودهی‌شده با دوزهای مختلف، دوز بهینه استریل رسوبات تعیین شد. در نهایت، حجم رسوبات مورد نیاز برای انجام آزمایش در شرایط آکواریوم به مرکز تحقیقات پرتو گاما سازمان انرژی اتمی ایران منتقل و فرآیند استریلاسیون انجام شد.

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفات در آزادسازی فسفات از رسوبات

ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر در بخش آبزی‌پروری دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس انجام گردید. در شروع آزمایش ابتدا رسوبات به مرکز تحقیقات پرتو گاما سازمان انرژی اتمی ایران منتقل شد تا تحت دوز ۵۵ کیلوگری پرتو گاما استریل شود. برای اطمینان از عدم آلودگی احتمالی رسوبات طی انتقال آن‌ها به بخش آبزی‌پروری مجدداً رسوبات مورد ارزیابی میکروبی در محیط کشت‌های مختلف قرار گرفت. رسوبات استریل‌شده به ارتفاع ۳ سانتی‌متر در کف مخازن و نمونه‌های آب نیز به ارتفاع تقریبی ۱۴ سانتی‌متر (۱۰ لیتر) به آکواریوم-هایی به ابعاد ۲۵×۳۰×۳۰ سانتی‌متر در سه تکرار اضافه شد.

به‌منظور ارزیابی عملکرد موثرترین سویه حل‌کننده فسفر، سویه مذکور در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28 تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور تکان‌دهنده رفت و برگشت (شیکر انکوباتور) کشت داده شد و سپس برای ایجاد تراکم ۱۰۲ در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (استریل‌شده تحت پرتو گاما) طی ۵ روز متوالی (یکبار در روز در ساعتی مشخص) در سه تکرار به درون آکواریوم‌ها تلقیح شد. از آنجایی‌که انحلال فسفر تحت تاثیر همزمان عوامل زیستی و فیزیکو-شیمیایی می‌باشد. به‌منظور جداکردن اثر عوامل فیزیکو-شیمیایی از عامل زیستی (باکتری) از گروه بدون تلقیح به‌عنوان گروه کنترل (بررسی اثر عوامل فیزیکو-شیمیایی) استفاده شد. این آزمایش به مدت ۴ هفته انجام شد و تراکم باکتری، فسفات محلول، آنزیم فسفاتاز و غلظت فرم‌های مختلف فسفر در روزهای صفر (قبل از تلقیح)، ۲، ۹، ۱۶، ۲۳ روز بعد از آخرین تلقیح سنجش شدند. در این تحقیق با توجه به میزان بالای فسفر انباشته شده در رسوبات، تنها اثر باکتری بر آزادسازی فسفات از منابع فسفات ذخیره شده در رسوبات بررسی شد و مواد دیگری نظیر کود و غیره افزوده نشد. دما در طول دوره آزمایش ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد حفظ شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور مقایسه اثر موثرترین سویه حل‌کننده فسفر بر میزان فسفات محلول آب در روزهای مختلف از تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measure ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه سطح فسفات محلول آب در روزهای مختلف در دو گروه تیمار و شاهد از آزمون t غیرجفتی (Independent sample t-TEST) استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) به‌ترتیب برای تحلیل آماری و آنالیز توصیفی استفاده شد.

[1] Sealed
[2] Gamma cell Co60
[3] Kilo gray

نتایج و بحث

در مجموع، ۶۴ سویه باکتری حل‌کننده فسفر با استفاده از محیط کشت اختصاصی جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات (TCP) جداسازی گردید. در مطالعه حاضر بر اساس شاخص حل‌کنندگی (نسبت قطر هاله به قطر کلنی) در محیط کشت جامد، ۱۱ سویه موثر حل‌کننده فسفر انتخاب و سپس با روش توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA شناسایی مولکولی شدند. به‌منظور انتخاب موثرترین سویه از بین ۱۱ سویه، توانایی آن‌ها در انحلال TCP در محیط کشت مایع و همچنین قابلیت رشد و تکثیر آن‌ها در دامنه‌ی پارامترهای محیطی شامل دما، pH و شوری استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه Persian10 علاوه بر داشتن توانایی بالا در انحلال TCP با کارایی انحلال ۳/۵۱ در محیط کشت جامد و ۸۰/۵۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط مایع، دارای توانایی رشد و تکثیر مطلوبی در شرایط محیطی (دما، pH و شوری) استخرهای پرورشی استان مازندران نیز می‌باشد.

به‌علاوه توانایی سویه Persian10 در آزادسازی فسفات از رسوبات در شرایط آکواریوم نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فسفات محلول در آب مربوط به روزهای ۹، ۱۶ و ۲۳ بود. نتایج تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که در گروه تیمار میزان فسفات محلول آب در روزهای بعد از تلقیح به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از زمان قبل از تلقیح بود. اما در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری در بین روزها مشاهده نشد (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲. نتایج مقایسه سطح فسفات محلول آب در روزهای مختلف در گروه تیمار (تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر)

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	آزمون F	*P* value
گروه تیمار	۱/۵۰۷	۱/۹۱۷	۱۱۶۸۱/۸۴	<۰/۰۵
گروه شاهد	۱/۸۵۹	۰/۰۰۷	۶/۸۲۴	>۰/۰۵

شکل ۲. مقایسه سطح فسفات محلول آب در دو گروه تیمار و کنترل در روزهای مختلف (حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین میانگین داده‌ها در روزهای مختلف در گروه تیمار می‌باشد (سویه‌ی $Persian_{10}$ در ۵ روز متوالی به اکواریوم‌ها اضافه شد).

به‌علاوه نتایج آزمون t غیرجفتی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار و کنترل در میزان فسفات محلول در آب در روزهای بعد از تلقیح وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین فسفات محلول آب بین گروه تیمار و کنترل در روزهای مختلف با استفاده از آزمون t غیرجفتی

متغیر	زمان	تیمار	کنترل	*P* value
		$\bar{x}$ ±SD	$\bar{x}$ ±SD	
فسفر محلول	روز ۰	۰/۰۱۹۳±۰/۰۰۵	۰/۰۲۶±۰/۰۱۲	*۰/۴۳
	روز ۲	۰/۱۰۴±۰/۰۰۹	۰/۰۵۶±۰/۰۱۷	**۰/۰۱
	روز ۹	۰/۱۷۶±۰/۰۰۹	۰/۰۸۸±۰/۰۰۹	**۰/۰۰
	روز ۱۶	۰/۱۷۱±۰/۰۱	۰/۰۷۵±۰/۰۱۲	**۰/۰۰
	روز ۲۳	۰/۱۹۷±۰/۰۱۲	۰/۰۵۲±۰/۰۱۹	**۰/۰۰

* عدم تفاوت معنی‌دار بین دو گروه، ** تفاوت معنی‌دار بین دو گروه

بحث

در میان شاخصه‌های مختلف کیفیت آب، درجه حرارت، pH و شوری از جمله مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر رشد و تکثیر باکتری در محیط می‌باشند. بسیاری از محققان در بخش کشاورزی توجه بسیار زیادی به این موضوع داشته‌اند. در این راستا، مطالعه Johri و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که از میان ۸۵۷ جدایه حل‌کننده فسفر صرفاً ۱۸ مورد از آن‌ها توانایی رشد و تکثیر و انحلال مطلوب فسفر در محدوده وسیعی از درجه حرارت، pH و شوری داشتند. به‌علاوه مطالعات دیگری از جمله Son و همکاران (۲۰۰۶) و Malboobi و همکاران (۲۰۰۹) نیز این موضوع را بسیار حائز اهمیت دانستند. بر این اساس نتایج این مطالعه نشان داد که شرایط محیطی نظیر درجه حرارت، pH و شوری در مزارع پرورش ماهیان گرمابی مازندران طی دوره پرورش به‌ترتیب ۳۴-۱۸ درجه سانتی‌گراد، ۸/۷-۷/۲ و ۶-۰ گرم بر لیتر در نوسان بود. از این‌رو در مطالعه حاضر پس از ارزیابی قدرت حل‌کنندگی فسفر در محیط مایع، برای انتخاب موثرترین سویه، اثر پارامترهای محیطی (دما، pH و شوری) روی آن‌ها نیز بررسی شد.

در مطالعه حاضر با در نظرگرفتن برآیند معیارهای مختلف از جمله قدرت انحلال فسفر و توانایی رشد در شرایط محیطی مختلف، سویه Persian10 (P. deceptionenesis) به‌عنوان موثرترین سویه حل‌کننده فسفر از بین ۱۱ سویه موثر انتخاب شد. عواملی از قبیل توانایی مطلوب در انحلال فسفر، رشد و تکثیر بهینه در دماهای مختلف به‌ویژه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رشد و تکثیر مطلوب در pH های مختلف به‌ویژه در pH های بالاتر از ۸، در انتخاب این سویه به‌عنوان موثرترین سویه تاثیرگذار بود. زنده‌مانی و رشد این سویه در دمای پایین‌تر از ۱۸ تا ۴ درجه سانتی‌گراد می‌تواند در توانایی تثبیت این سویه در رسوبات استخرهای ماهیان گرمابی مفید باشد. این خصوصیت موجب بالابردن اطمینان از عملکرد مطلوب این سویه در استخرهای نزدیک مناطق کوهستانی می‌گردد. به‌علاوه استفاده از این سویه ماندگاری و اثر بخشی کود زیستی را در استخر در طول سال نیز تضمین می‌کند.

عملکرد سویه Persian10 در شرایط آکواریوم

به‌طور کلی تلقیح سویه Persian10 (P.deceptionensis) موجب افزایش معنی‌داری در میزان فسفات محلول آب در زمان‌های بعد از تلقیح (۲، ۹، ۱۶ و ۲۳) شده است. به‌علاوه میزان فسفات محلول در آب بین گروه تیمار (تغییرات بر اساس واکنش‌های زیستی-شیمیایی) و گروه کنترل (تغییرات بر اساس واکنش‌های شیمیایی) در زمان‌های مختلف (۲، ۹، ۱۶ و ۲۳ روز بعد از تلقیح) نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با توجه به نتایج این تحقیق در شرایط آکواریوم به‌نظر می‌رسد بخش زیادی از تغییرات میزان فسفات محلول در روزهای مختلف ناشی از اثر باکتری‌ها بر روی کمپلکس-های معدنی و آلی فسفر باشد.

افزایش میزان فسفات محلول آب ۲ روز بعد از آخرین تلقیح می‌تواند ناشی از اثر اسیدهای آلی ترشح شده توسط باکتری‌ها و به تبع آن آزادشدن فسفات از ترکیباتی Ca-P نظیر کلسیم فسفات آمورفوس (جسم جامد غیرکریستالی که بدون شکل و فرم است) (Ca9(PO4)6.nH2O) و مونوکلسیم فسفات (CaHPO4) که دارای حلالیت بالاتری نسبت به سایر ترکیبات Ca-P می‌باشند (Alvarez و همکاران، ۲۰۰۴).

در مجموع در زمینه عوامل موثر بر نوع و میزان اسیدهای آلی آزادشده در سویه‌های مختلف و همچنین در شرایط مختلف (منابع مختلف کربن و ازت) نیاز به مطالعات گسترده‌تری می‌باشد. همچنین در نظرگرفتن پویایی و نرخ اثر باکتری‌ها، نرخ تولید اسیدهای آلی و نرخ تولید کمپلکس‌ها و آنزیم‌ها و همچنین نرخ اثر واکنش‌های شیمیایی در یک محیط پرورشی برای تحلیل هر چه بهتر فرآیند رسوب و انحلال فسفات محلول بسیار حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی بر اساس نتایج این مطالعه، سویه Persian10 می‌تواند به‌عنوان باکتری موثر حل‌کننده فسفات در قالب کود زیستی فسفره در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

پورغلام، ر.، نصراله‌زاده‌ساروی، ح.، سعیدی، ع.ا.، مخلوق، آ.، واحدی، ف.، رستمیان، م.ت.، (۱۳۹۲). بررسی فاکتورهای زیستی و غیر زیستی استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی غنی شده با کود شیمیایی و شیرابه کود گاوی در استان مازندران. مجله توسعه آبزی پروری، ۷ (۳): ۱۱-۲۲.

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

فلاح نصرت‌آباد ع.ر.، رحیمیان ح.، صالح‌راستین ن.، ملکوتی م.ج.، (۱۳۸۲). بررسی پراکنش ریزجانداران حل‌کننده فسفر در خاک‌های استان گیلان، نشریه خاک و آب، ۱۷ (۲): ۱۶۲-۱۷۶.

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.

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.

Fallah Nosratabad, A, R., Etesami, H., Shariati, Sh., (2017). Intergated use of organic fertilizer and bacterial inoculants improves phosphorus use efficiency in wheat fertilized with triple superphosphate. Rhizosphere, 3 (2017): 109-111.

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 Pantoeastewartii 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. In First international meeting on microbial phosphate solubilization (pp. 229-238). Springer Netherlands.

Johri, J. K., Surange, S., and Nautiyal, C. S., (1999). Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. Current Microbiology, 39 (2): 89-93.

Luo, L., Ma, Y., Zhang, S., Wei, D., and Zhu, Y. G., (2009). An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. Journal of Environmental Management, 90 (8): 2524-2530.

Maitra, N., Manna, S. K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C., Sharma A.P., (2015). Ecological Significance and Phosphorus Release Potential of Phosphate Solubilizing Bacteria in Freshwater Ecosystems. Hydrobiologia, 745(1): 69-83.

Mclaughlin, M. J., Tiller, K. G., Naidu, R., and Stevens, D. P., (1996). The behaviour and environmental impact of contaminants in fertilizers. Soil Research, 34 (1): 1-54.

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

Nichols, G., Middleton, G. V., (2003). Encyclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks. Geological Magazine, 141 (6): 742-743

Raven, K. P., and Loeppert, R. H., (1997). Trace element composition of fertilizers and soil amendments. Journal of Environmental Quality, 26 (2): 551-557.

Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., and Heo, M. S., (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant Pantoea agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource technology, 97 (2): 204-210.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Application of phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer in warm-water fish ponds

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

[1] Associate Professor in Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

[2] Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

[3] Ph.D Student in Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

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 bacteria (PSB). For this purpose, sampling of the sediment of warm-water fish ponds in 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, one strongest PSB was including *Pseudomonas deceptionensis* (Persian10) 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. The results showed that the amount of water soluble phosphate was significantly (P <0.05) higher than that of the non-inoculated group. Based on the results of this study, Persian10 strain can be used as an effective phosphate solubilizing bacterium as a biofertilizer for warm-water fish ponds.

Keywords: Phosphorus, Phytoplankton, Sediments, Primary producers, Aquaculture