جداسازی باکتری های آزاد کننده فسفر در استخر پرورش ماهی با بکارگیری منابع مختلف فسفر نامحلول

واحد ارجمند، نعمت‌الله محمودی[1] و علیرضا فلاح نصرت آباد

دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران؛ **vahed.arjmand@gmail.com**

استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران؛ **n.mahmoudi@modares.ac.ir**

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **rezafayah@yahoo.com**

ص **215 - 228**

دریافت: **1400/7/22** و **1401/8/11**

چکیده

یکی از مهمترین دلایل کارایی ضعیف کودهای زیستی فسفاته در استخرهای پرورش ماهیان، عدم توجه به نوع فسفر نامحلول غالب در محیط پرورشی و استفاده صرفاً از یک منبع (غالباً تری‌کلسیم فسفات) در فرآیند جداسازی و ارزیابی ریزجانداران آزادکننده فسفر می‌باشد. بخش بزرگی از فسفر نامحلول موجود در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی نامحلول (50 تا 90 درصد) است. بنابراین، به نظر می‌رسد ریز جانداران آزادکننده فسفر جداسازی شده صرفاً از منبع فسفر معدنی نتوانند در قالب کود زیستی در استخرهای پرورشی اثرگذار باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی با استفاده از محیط کشت NBRIP حاوی منبع فسفر آلی (فیتات کلسیم) و مقایسه عملکرد آنها با باکتری‌های حاصل از منبع فسفر معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات) در شرایط میکروکازم (ارلن حاوی رسوب: شرایط نسبتاً مشابه با استخر پرورشی) می‌باشد. توانایی جدایه‌ها (33 جدایه از منبع آلی و 19 جدایه از منبع معدنی) در انحلال فسفر در محیط کشت جامد و مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فسفر محلول در محیط‌کشت مایع حاوی فیتات کلسیم بین 141/93-57/40 میلی‌گرم در لیتر و در محیط‌کشت حاوی تری‌کلسیم فسفات بین 219/49-108/16 میلی‌گرم در لیتر بود. در مرحله نهایی، نتایج ارزیابی جدایه‌ها در میکروکازم رسوب نشان داد که سه جدایه حاصل از منبع فسفر آلی (P3، P13 و P2) بهترین جدایه‌های آزادکننده فسفر بودند (به ترتیب با آزادسازی فسفر 11/86، 12/53 و 28/18 میلی‌گرم در لیتر) و در مقایسه با جدایه‌های حاصل از منبع فسفر معدنی عملکرد بهتری داشتند. شناسایی مولکولی این جدایه‌ها مشخص کرد که این سویه‌ها متعلق به سه باکتری *Priestia aryabhattai*، *Bacillus zanthoxyli* و *Acinetobacter johnsonii* می‌باشند. با توجه به پتانسیل بیماریزایی *A. johnsonii* برای ماهی و انسان، سویه‌های خانواده Bacillaceae را می‌توان به‌عنوان کاندیدای استفاده در کودهای زیستی برای ارزیابی‌های تکمیلی آینده در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: انحلال فسفر آلی، فیتات، کود زیستی، ماهیان گرمابی، میکروکازم رسوب

[1] نویسنده مسئول، آدرس: مازندران، نور، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

تولیدات ماهیان گرمابی بیش از نیمی از محصولات آبزی‌پروری ایران را به خود اختصاص داده است و بعنوان یکی از ارکان اساسی رشد صنعت آبزی‌پروری کشور در سال‌های گذشته محسوب شده است (فائو،2020). رشد گونه‌های پرورشی ماهیان گرمابی از قبیل کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در استخرهای پرورشی وابستگی زیادی به میزان تولیدات اولیه موجود در استخرها دارد (وو و ژو، 2005؛ خان و همکاران، 2007). مقدار مطلوب و مورد نیاز فسفر در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی 0/5 تا 1 میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته می‌شود. به منظور تأمین فسفر در طول یک دوره پرورش (9 ماهه)، به طور میانگین 1200-800 کیلوگرم از انواع کودهای شیمیایی و 12-10 تن کود آلی گاوی به ازای هر هکتار از استخرها بکار می‌رود (شکوریان و همکاران، 1377؛ پورغلام و همکاران، 1392).

فسفر یکی از مهمترین عوامل تولید اولیه در اکوسیستم‌های آبی به ویژه استخرهای پرورش ماهیان گرمابی می‌باشد اما در عین حال بدلیل عدم دسترسی تولیدکنندگان اولیه (فیتوپلانکتون‌ها) به این عنصر حیاتی، فسفر به عنوان یکی از عوامل محدودکننده تولید در اینگونه اکوسیستم‌ها در نظر گرفته می‌شود. درصد بسیار زیادی از فسفر معدنی (ناشی از کودهای شیمیایی و آلی) در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی به صورت 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 (هو و همکاران، 2010؛ چن و همکاران 2011). از طرف دیگر، بخش بزرگی از فسفر کل موجود در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی نامحلول (50 تا 90 درصد) می‌باشد (خان و همکاران، 2014). اشکال مختلفی از فسفر آلی در رسوبات اکوسیستم‌های آبی وجود دارند که بیشترین فرم آن از نوع نمک اینوزیتول هگزا فسفات (فیتات) می‌باشد و بیش از 50 درصد از فسفر آلی رسوبات را تشکیل می‌دهد. این ترکیب به‌عنوان پایدارترین و غالب‌ترین حالت فسفر آلی در اکوسیستم-های آبی شناخته می‌شود (بی و همکاران، 2009). فسفر آلی به طور مستقیم قابلیت جذب و استفاده برای اغلب جوامع فیتوپلانکتونی را دارا نمی‌باشد و تحت فرآیندهای معدنی شدن ابتدا باید به شکل محلول و قابل جذب برای ریز جانداران (HPO_4^{2-} و $H_2PO_4^-$) تبدیل شود (کیم و همکاران، 2003؛ جانا، 2007). با توجه به نوع شرایط مدیریتی حاکم بر استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از قبیل کوددهی آلی در مقیاس بالا، غذادهی، ورود انواع مواد آلی از طریق منبع آب ورودی و همچنین عدم لایروبی رسوبات کف استخرهای پرورش ماهیان گرمابی برای مدت طولانی، میزان بار آلی رسوبات کف استخرها بالا می‌باشد. بنابراین بازگردانی فسفر تثبیت شده در اجزاء آلی رسوبات به فرم محلول و قابل جذب، می‌تواند سبب افزایش میزان فسفر در دسترس تولیدکنندگان اولیه، کاهش استفاده از کودهای آلی و شیمیایی و به تبع آن کاهش آلودگی آب‌ها، افزایش سود اقتصادی پرورش‌دهندگان، استفاده بهینه از واحد سطح و تولید محصولات آبزی-پروری سالم‌تر گردد.

در این بین یکی از مهمترین روش‌های افزایش فسفر قابل دسترس و استفاده از فسفر انباشته شده در رسوبات کف استخرها (کمپلکس‌های آلی)، استفاده از باکتری‌های آزادکننده فسفر در قالب کودهای زیستی می‌باشد (جانا، 2007؛ مایترا و همکاران، 2015). تاکنون مطالعات چندانی در رابطه با کاربرد کود زیستی در حوزه آبزی‌پروری جهان انجام نشده است. بیشتر این مطالعات به بررسی نقش ریزجانداران آزادکننده فسفر در چرخه فسفر اکوسیستم رودخانه‌ها و دریاچه‌های کم‌عمق اختصاص دارد. بهرا و همکاران (2014) نیز نقش این باکتری‌ها را در اکوسیستم مانگرو مورد بررسی قرار دادند.

نتایج تحقیقات یانگ و همکاران (2017) نشان داد که باکتری‌های آزادکننده فسفر نقش بسیار مهمی در ایجاد پدیده شکوفایی جلبکی در اکوسیستم‌های آبی را دارند. در حوزه آبزی پروری نیز هو و همکاران (2010) اقدام به شناسایی باکتری *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6 از رسوبات مزرعه کشت توام ماهی و برنج کردند و در ادامه گزارش دادند این باکتری توانایی زیادی در آزادسازی فسفر در محیط کشت مایع NBRIP[1] را دارد. در مطالعه آرمنده و همکاران (1397) مشخص شد که باکتری‌های آزادکننده فسفر (اکثراً از جنس *Pseudomonas*) جداسازی شده از رسوبات مزارع پرورش ماهیان گرمابی در محیط کشت NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات، توانایی مطلوبی در انحلال ترکیبات فسفر نامحلول در شرایط آزمایشگاهی دارند.

در همین راستا، در سال‌های اخیر محققین به بررسی مشکلات عملکرد کودهای زیستی و ابعاد مختلف این موضوع نیز پرداخته‌اند. در مطالعه مروری باشان و همکاران (2013) و لیو و همکاران (2015) اشاره شده است که اغلب محققین حوزه باکتری‌های آزادکننده فسفر، صرفا از ترکیب معدنی تری‌کلسیم فسفات در فرآیند جداسازی استفاده کرده‌اند در صورتی که این ترکیب، یک منبع نسبتاً ضعیف و غیر قابل اعتماد برای جداسازی و بررسی عملکرد این باکتری‌ها است. در ادامه این مطالعه، بیان شده است که بدلیل تنوع در ویژگی‌های شیمیایی خاک‌های مختلف به نظر می‌رسد هیچ ترکیبی را نمی‌توان به عنوان یک منبع جهانی در فرآیند جداسازی در نظر گرفت. این محققین پیشنهاد دادند که بهتر است از چندین منبع فسفر نامحلول (فیتات کلسیم، فسفات آهن و فسفات آلومینیوم و غیره) علاوه بر تری‌کلسیم فسفات برای جداسازی این باکتری‌ها استفاده شود.

با در نظر گرفتن موارد ذکر شده و توجه به این نکته که بخش بزرگی از فسفر موجود در اکوسیستم‌های آبی نظیر استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از نوع فسفر آلی می‌باشد، انتخاب ترکیبات معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، به منظور جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر منطقی به نظر نمی‌رسد و جایگزینی آن با یک ترکیب نامحلول آلی می‌تواند به عملکرد بهتر باکتری-های جداسازی شده در شرایط واقعی کمک شایانی نماید. بنابراین در این مطالعه هدف گذاری شده است که از فیتات کلسیم به عنوان غالب‌ترین منبع فسفر آلی نامحلول در اکوسیستم‌های آبی در فرآیند جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر استفاده شود و سپس توانایی آنها با باکتری‌های جدا شده از ترکیب تری‌کلسیم فسفات در محیط میکروکازم رسوب مقایسه شود. محیط میکروکازم رسوب شامل ارلن حاوی رسوبات استخرها می‌باشد که شرایط تقریبا مشابه با اکوسیستم پرورش ماهیان گرمابی ایجاد می‌کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی

نمونه‌برداری از عمق 0-10 سانتی‌متری رسوبات 10 استخر پرورش ماهیان گرمابی در نواحی مختلف استان مازندران (در وسعتی به طول و عرض جغرافیایی E '11°52 - '60°53 تا N '75°36 - '58°36) انجام شد. برای تهیه یک نمونه واحد، نمونه‌برداری‌های متعددی از رسوب نقاط مختلف یک استخر توسط نمونه‌بردار وَن‌وِن گراب[2] (Hydro-Bios, Germany) انجام و سپس نمونه‌ها با یکدیگر مخلوط و همگن شدند. نمونه رسوبات در درون ظروف شیشه‌ای استریل در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

[1] National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

[2] Van Veen Grab

شمارش و جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر در محیط کشت جامد

در این مطالعه برای جداسازی و انتخاب باکتری‌های آزادکننده فسفر از محیط کشت جامد NBRIP (شامل 5 گرم $MgCl_2$، 0/25 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/2 گرم KCl، 0/1 گرم $(NH_4)_2SO_4$ و 10 گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر با pH نهایی 7) استفاده شد.

همچنین از 3/7 گرم در لیتر فیتات کلسیم[1] برای جداسازی جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی و 5 گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات[2] برای جداسازی جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی در ترکیب محیط کشت (به صورت جداگانه) استفاده شد. به همین منظور از نمونه رسوبات رقت‌های متوالی تا 10^{-8} تهیه و از هر رقت 100 میکرولیتر در سه تکرار روی محیط کشت جامد NBRIP گسترش داده شد. پلیت‌ها در دمای 30-28 درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگه‌داری شدند و پس از گذشت 48 ساعت، کلنی‌های هاله‌دار شمارش و جداسازی شدند (ناتیال، 1999).

ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در محیط کشت جامد (شاخص قطر هاله به قطر کلنی)

به منظور مقایسه توانایی جدایه‌ها در آزادسازی فسفر از شاخص هاله (Halo Index) در محیط کشت جامد NBRIP حاوی کلسیم فیتات (منبع فسفر آلی نامحلول) و تری‌کلسیم فسفات (منبع فسفر معدنی نامحلول) استفاده شد. برای این منظور 10 میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث (با تراکم 10^6×2-4 CFU/ml) بروی محیط کشت جامد NBRIP به صورت نقطه‌ای کشت داده شد (سه تکرار) و برای مدت 48 ساعت در دمای 30-28 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. در نهایت قوی‌ترین جدایه‌ها در این مرحله بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی شناسایی شدند (پرمونو و همکاران، 1996).

ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در محیط‌کشت مایع

100 میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث (با تراکم 10^6×2-4 CFU/ml) درون ارلن‌های حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP حاوی تری‌کلسیم فسفات و فیتات کلسیم (به صورت جداگانه) تلقیح شد (مهتا و ناتیال، 2001). ارلن‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30-28 سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار (120 دور در دقیقه) نگهداری و سپس میزان فسفر آزاد شده بر اساس روش اسید آسکوربیک اصلاح شده توسط دستگاه Plate Reader اندازه‌گیری شد (اویلا سگورا و همکاران، 2004؛ رایس و همکاران، 2012). pH هر یک از محیط کشت‌ها نیز با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال (Jenway 3510, USA) مورد سنجش قرار گرفت. به‌منظور شمارش جمعیت جدایه‌ها، از نمونه محلول محیط کشت مایع، رقت‌های متوالی تهیه و در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. پس از 48 ساعت انکوباسیون (دمای 30-28 درجه سانتیگراد)، جمعیت جدایه‌ها با روش پلیت استاندارد و بر حسب CFU/ml گزارش گردید.

ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در محیط میکروکازم رسوب

جهت ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده محیط طبیعی، از محیط میکروکازم[3] (ارلن حاوی رسوب) استفاده شد. به منظور ایجاد محیط میکروکازم، 25 گرم رسوب تازه به همراه 100 میلی‌لیتر آب استخر درون ارلن‌های 250 میلی‌لیتری با یکدیگر ترکیب و درون اتوکلاو استریل شد. سپس 100 میکرولیتر از محیط‌کشت نوترینت براث حاوی جدایه‌های باکتریایی (با تراکم 10^6×2-4 CFU/ml) برداشت و به محیط میکروکازم تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30-28 درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکر دار نگهداری شدند و سپس اقدام به سنجش فسفر محلول و pH محیط شد (رایس و همکاران، 2012).

1. Phytic Acid Calcium
2. Tricalcium phosphate
3. Microcosm

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر با استفاده از توالی-یابی ژن 16S rRNA

در این تحقیق به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های با کارایی بهتر از توالی‌یابی ژن 16S rRNA استفاده شد. پس از ایجاد توده زیستی از هر یک از جدایه‌ها، استخراج ماده ژنتیکی (DNA) جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج ژنوم باکتریایی شرکت سیناژن انجام شد. تکثیر ژن مورد نظر با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Biorad، ساخت آمریکا) و با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R انجام و جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR به ژل آگاروز 1 درصد منتقل و الکتروفورز گردید (ویسبرگ و همکاران، 1991). در نهایت قطعه تکثیر شده جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر[1] کره جنوبی ارسال گردید. پس از فرآیند توالی‌یابی، توالی ژنی سویه‌ها، به کمک نرم افزار BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، درخت فیلوژنی سویه‌های جداسازی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 و روش Neighbor-joining ترسیم شد (تامورا و همکاران، 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور آنالیز توصیفی و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزارهای Excel (نسخه 2016) و SPSS (نسخه 23) استفاده گردید. همچنین به‌منظور مقایسه عملکرد هر یک جدایه‌ها نسبت به گروه شاهد و انتخاب برترین جدایه‌ها در مراحل مختلف، از آزمون-های کروسکال-والیس (Kruscal-wallis) و آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way Anova) در سطح اطمینان 95 درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌های آزادکننده فسفر آلی و معدنی

به‌طور کلی در این مطالعه، 52 جدایه باکتریایی آزادکننده فسفر معدنی و آلی از نمونه رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی جداسازی گردید که 33 جدایه از محیط کشت حاوی ماده فیتات کلسیم (منبع فسفر آلی نامحلول) و 19 جدایه نیز از محیط کشت حاوی ماده تریکلسیم فسفات (منبع فسفر معدنی نامحلول) جداسازی شد.

نتایج عملکرد جدایه‌ها در محیط کشت جامد و مایع NBRIP

در بین جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی (جدایه-های دارای کد P) جدایه‌های P15، P10، P31، P33، P5،P12، P26، P27 و P2، به‌ترتیب با میانگین شاخص هاله به کلنی 2/6، 2/2، 1/8، 1/8، 1/8، 1/8، 1/8، 1/8 و 1/8 دارای بهترین عملکرد بودند. دامنه نوسانات میزان فسفر محلول در محیط‌کشت مایع حاوی ترکیب فیتات کلسیم نیز پس از گذشت 48 ساعت بین 141/93-57/40 میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و جدایه‌های P22، P18، P33، P31، P26، P28، P27، P24 و P32، بهترین عملکرد را در آزادسازی فسفر از ترکیب آلی فیتات کلسیم دارا بودند (جدول 1).

[1] Bioneer

جدول 1- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌ها در محیط کشت مایع حاوی فیتات کلسیم

جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)	جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)
P1	61/54 ± 0/75	5/31	$1/3\times10^5$	**P18**	125/16 ± 0/99*	5/05	$2/4\times10^6$
P2	82/46 ± 0/75	5/23	2×10^5	**P19**	96/84 ± 1/3*	5/08	$2/5\times10^6$
P3	68/95 ± 1/32	5/15	$1/2\times10^5$	**P21**	82/24 ± 0/37	5/41	$2/5\times10^6$
P4	102/28 ± 1/13*	5/22	$1/2\times10^6$	**P22**	141/93 ± 1/36*	4/91	$1/3\times10^6$
P5	66/99 ± 1/3	4/97	$1/8\times10^6$	**P23**	83/76 ± 0/37*	5/46	$2/5\times10^6$
P6	74/61 ± 0/99	5/27	$2/2\times10^5$	**P24**	107/29 ± 0/75*	5/24	$2/5\times10^6$
P7	78/1 ± 1/3	4/98	$1/9\times10^6$	**P26**	114/27 ± 0/37*	5/18	$1/5\times10^6$
P8	72 ± 1/36	5/28	$1/8\times10^5$	**P27**	113/73 ± 0/75*	5/21	$2/3\times10^6$
P9	72 ± 0/99	5/08	$1/2\times10^6$	**P28**	113/83 ± 2/1*	5/29	$2/1\times10^6$
P10	79/62 ± 1/64	3/91	$2/2\times10^5$	**P29**	76/79 ± 0/65	6/00	$2/5\times10^5$
P11	57/40 ± 1/65	5/21	$1/7\times10^4$	**P30**	112/96 ± 2/6*	5/25	$3/1\times10^6$
P12	71/56 ± 1/13	5/16	$2/1\times10^4$	**P31**	118/19 ± 2/29*	5/34	$3/5\times10^6$
P13	90/52 ± 1/96*	5/4	$2/6\times10^6$	**P32**	107/08 ± 0/99*	5/22	$2/9\times10^6$
P14	61/76 ± 0/65	5/36	$2/8\times10^5$	**P33**	124/72 ± 0/37*	5/2	$3/5\times10^6$
P15	78/10 ± 1/72	4/04	2×10^5	**P34**	90/95 ± 0/35*	5/26	$1/8\times10^5$
P16	99/01 ± 1/96*	5/24	$2/5\times10^6$	**P35**	88/12 ± 0/35*	5/28	3×10^6
P17	90/30 ± 1/36*	5/11	$2/5\times10^6$	**شاهد**	41/93 ± 0/3	6/22	---

* نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

در بین جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی (جدایه‌های دارای کد T) نیز جدایه‌های T8، T20 و T10 به‌ترتیب با میانگین شاخص هاله به کلنی 2/25، 2 و 1/8 بهترین عملکرد را از خود نشان دادند. همچنین دامنه نوسانات میزان فسفر محلول در محیط‌کشت مایع حاوی ترکیب تری‌کلسیم فسفات بین 219/49-108/16 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود و بهترین عملکرد در جدایه‌های T13، T17، T18، T9 و T10 مشاهده شد (جدول 2).

بطورکلی، مشخص شده است که تکیه مطلق بر شاخص هاله به کلنی در محیط کشت جامد به منظور تعیین میزان کارایی سویه‌ها در آزادسازی فسفر چندان قابل اعتماد نیست. در تحقیقات زیادی (باشان و همکاران، 2013، لیو و همکاران 2015، سائو و همکاران، 2018) نشان داده شده است که جدایه‌هایی که هیچ گونه هاله‌ای در محیط جامد تشکیل نداده‌اند، رهاسازی فسفر بالایی در محیط کشت مایع داشتند و بالعکس. از جمله دلایل این عدم انطباق را می‌توان به نرخ متفاوت انتشار اسیدهای آلی مختلف (ترشح شده توسط سویه) در محیط کشت جامد نسبت داد (بهرا و همکاران، 2014؛ لی و همکاران، 2019). نتایج بدست آمده از این مطالعه نیز موید این موضوع بود که برخی جدایه‌ها نظیر P1، P21 و P29 علی‌رغم اینکه هیچگونه هاله‌ای در محیط کشت جامد تشکیل نداده بودند اما در محیط کشت مایع قادر به آزادسازی فسفر شدند و یا در برخی موارد جدایه‌هایی که عملکرد قوی‌تری در محیط کشت جامد (شاخص هاله به کلنی بزرگتر) از خود نشان داده بودند در محیط کشت مایع عملکرد ضعیفی نشان دادند (نظیر P15، P10 و T8). بنابراین استفاده از محیط کشت مایع به عنوان آزمون

مکمل برای بررسی دقیق‌تر عملکرد اینگونه باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

در محیط‌کشت مایع تمامی جدایه‌های باکتریایی قادر به آزادسازی فسفر از منابع فسفر نامحلول بودند، همچنین دامنه توانایی جدایه‌ها در کاهش pH بین 0/22 تا 2/31 واحد متغیر بود و اکثر جدایه‌ها (آلی و معدنی) قادر به کاهش معنادار pH نسبت به تیمار کنترل شدند. اسیدی کردن محیط از طریق ترشح اسیدهای آلی و تولید پروتون یکی از سازوکارهای عمده باکتری‌ها برای آزادسازی فسفر از ترکیبات فسفر معدنی نامحلول است. همچنین با توجه به نقش سازوکارهای مرتبط با آنزیم‌ها در آزاد سازی فسفات از فیتات کلسیم، کاهش pH نیز تأثیری در محیط کشت مایع حاوی فیتات ندارد.

جدول 2- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌ها در محیط کشت مایع حاوی تری‌کلسیم فسفات

جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)	جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)
T1	148/91 ± 0/37	5/24	$2/2\times10^4$	**T12**	188/77 ± 2/72*	5/28	3×10^6
T2	160/23 ± 0/75	5/53	2×10^6	**T13**	219/49 ± 2/29*	5/17	5×10^6
T3	164/37 ± 1/72	5/19	$1/9\times10^5$	**T14**	169/60 ± 1/13	5/16	$2/1\times10^5$
T4	151/96 ± 0/65	5/48	$3/5\times10^5$	**T15**	108/16 ± 0/1	5/08	$2/9\times10^6$
T5	160/23 ± 0/75	5/22	$2/9\times10^6$	**T16**	168/30 ± 2/7	5/51	4×10^6
T6	155/22 ± 1/7	5/23	$2/6\times10^6$	**T17**	216/88 ± 2/9*	5/31	$3/3\times10^6$
T8	169/82 ± 0/75	4/48	$2/9\times10^6$	**T18**	212/74 ± 2/26*	5/27	6×10^6
T9	207/73 ± 0/3*	5/29	$1/9\times10^6$	**T19**	182/67 ± 2/6*	5/34	5×10^6
T10	205/11 ± 1/88*	5/17	4×10^6	**T20**	183/98 ± 2/26*	4/44	$3/7\times10^6$
T11	170/69 ± 0/75	5/25	2×10^6	**شاهد**	123/85 ± 1/13	6/01	---

"*" نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

به‌علاوه، همبستگی معناداری بین میزان نوسانات pH و میزان فسفر آزادشده در محیط حاوی منبع فسفر معدنی مشاهده نشد که این موضوع با نتایج تحقیقات تائو و همکاران (2008) نیز مطابقت داشت. به نظر می‌رسد که تفاوت در توان کلات‌کنندگی اسیدهای آلی برای کلات-کردن یون‌های کلسیم مهم‌ترین دلیلی باشد که چرا برخی از سویه‌های آزادکننده فسفر با اثر کمتر بر کاهش pH، بر حلالیت فسفر اثرگذاری بالاتری دارند (ایلمر و شینر، 1992). بنابراین رهاسازی فسفر نتیجه وجود هر دو اثر اسیدهای آلی شامل کاهش pH محیط و کلات‌کنندگی می‌باشد (آنتون، 2012).

عملکرد جدایه‌ها در محیط میکروکازم

نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های معرفی‌شده به محیط میکروکازم توانستند پس از 48 ساعت بخوبی خود را در رسوبات تثبیت کرده و به میانگین جمعیت CFU/ml $1/6\times10^6$ برسند. دامنه آزادسازی فسفر در این مرحله از 0/03 تا 28/18 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. از گروه آزادکننده‌های فسفر آلی، سویه‌های P2، P13، P3، P21، P1، P6، P34 و P33 بهترین عملکرد را در آزادسازی فسفر داشتند (جدول 3).

همچنین از گروه آزادکننده‌های فسفر معدنی نیز سویه‌های T2، T19، T4 و T3 به ترتیب با مقادیر فسفر

محلول 10/24، 9/05، 6/39 و 5/2 میلی‌گرم در لیتر بهترین عملکرد را داشتند (جدول 4).

جدول 3- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی در محیط میکروکازم

جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)	جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)
P1	10/29 ± 0/17*	7/98	$2/4\times10^6$	**P18**	0/88 ± 0/23	8/41	$2/8\times10^6$
P2	28/18 ± 0/47*	7/99	3×10^6	**P19**	6/4 ± 0/27*	8/78	$2/3\times10^6$
P3	11/86 ± 0/52*	8/08	1×10^7	**P21**	11/8 ± 0/24*	8/11	$6/1\times10^6$
P4	0/29 ± 0/19	8/04	$1/2\times10^6$	**P22**	0/25 ± 0/2	8/14	$2/2\times10^6$
P5	4/47 ± 0/06*	8/10	$2/2\times10^6$	**P23**	0/71 ± 0/06	8/40	$2/2\times10^6$
P6	9/97 ± 0/53*	7/98	$3/3\times10^6$	**P24**	0/2 ± 0/03	7/93	$7/2\times10^6$
P7	4/83 ± 0/63*	8/04	$4/2\times10^5$	**P26**	1/02 ± 0/76*	8/12	$3/2\times10^5$
P8	0/18 ± 0/11	8/11	$3/8\times10^6$	**P27**	0/77 ± 0/13	8/09	$2/1\times10^6$
P9	0/88 ± 0/03	8/23	$2/6\times10^6$	**P28**	0/33 ± 0/03	7/98	$6/8\times10^6$
P10	0/27 ± 0/15	8/28	$5/9\times10^6$	**P29**	0/91 ± 0/33*	8/45	$1/2\times10^6$
P11	0/14 ± 0/03	8/05	$1/8\times10^5$	**P30**	1/5 ± 0/06*	8/07	$3/9\times10^5$
P12	1/06 ± 0/07*	8/06	$7/1\times10^5$	**P31**	0/8 ± 0/03	7/99	$7/9\times10^6$
P13	12/53 ± 0/37*	8/03	$2/6\times10^6$	**P32**	0/73 ± 0/1	8/45	$3/5\times10^6$
P14	0/44 ± 0/06	8/36	$2/9\times10^5$	**P33**	8/02 ± 0/23*	8/68	$4/2\times10^5$
P15	0/03 ± 0/03	8/12	2×10^6	**P34**	9/93 ± 0/23*	8/22	$5/2\times10^6$
P16	1/08 ± 0/37*	7/92	$1/6\times10^6$	**P35**	0/29 ± 0/75	8/05	$1/8\times10^6$
P17	0/2 ± 0/03	8/18	$2/5\times10^6$	**شاهد**	0/07 ± 0/03	8/50	---

"*" نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

جدول 4- جمعیت، pH و میزان فسفر آزاد شده توسط جدایه‌های آزادکننده فسفر معدنی در محیط میکروکازم

جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)	جدایه	آزادسازی فسفر (mg/l)	pH	جمعیت (CFU/ml)
T1	0/51 ± 0/06	8/15	$6/4\times10^6$	**T12**	0/36 ± 0/1	8/04	$3/5\times10^6$
T2	10/24 ± 0/42*	8/08	5×10^5	**T13**	1/5 ± 0/26*	8/22	1×10^6
T3	5/2 ± 0/11*	8/07	2×10^7	**T14**	0/82 ± 0/07*	8/35	1×10^7
T4	6/39 ± 0/17*	8/2	$3/2\times10^6$	**T15**	0/33 ± 0/03	8/07	$2/2\times10^6$
T5	0/6 ± 0/07	8/29	$2/2\times10^6$	**T16**	0/18 ± 0/1	8/20	$6/1\times10^6$
T6	0/42 ± 0/03	8/01	3×10^6	**T17**	0/8 ± 0/03*	8/12	$3/5\times10^6$
T8	2/45 ± 0/42*	8/42	$6/2\times10^5$	**T18**	0/14 ± 0/03	8/06	$2/2\times10^6$
T9	0/42 ± 0/2	7/98	2×10^6	**T19**	9/05 ± 0/23*	8/62	$1/5\times10^6$
T10	0/71 ± 0/13*	8/39	$1/6\times10^6$	**T20**	3/7 ± 0/13*	8/47	$3/6\times10^6$
T11	0/66 ± 0/07	8/15	$1/9\times10^6$	**شاهد**	0/07 ± 0/03	8/50	---

"*" نشان‌دهنده تفاوت معنادار تیمار مورد نظر با گروه شاهد در سطح 0/05 است

در این مطالعه برای ارزیابی دقیق‌تر، آزمایشات ارزیابی در محیط مشابه با رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (میکروکازم رسوب) نیز انجام گرفت. از آنجایی که شرایط در استخر پرورشی، بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاهی است، ارزیابی جدایه‌ها در شرایط مشابه با محیط طبیعی بسیار مهم است. در این راستا، اکثر محققین (لیو و همکاران، 2015؛ لی و همکاران، 2019) توصیه کرده‌اند که فرآیند ارزیابی توانایی انحلال فسفر باکترهای آزادکننده فسفر باید در شرایط مشابه با محیط طبیعی در میکروکازم خاک/رسوب همراه شود. در مطالعه حاضر مشاهده شد که باکتری‌های انتخاب شد با استفاده از محیط‌کشت NBRIP (جامد و مایع) نظیر P22، P18، T13 و T17 هنگامی که در شرایط میکروکازم (محیط رسوبات) قرار گرفتند، قادر به تکرار عملکرد خوب خود در محیط میکروکازم رسوب نشدند و با افت محسوس عملکرد مواجه شدند. از دلایل این موضوع می‌توان به اتصال سریع فسفر آزادشده توسط جدایه‌ها به سایر کاتیون‌های فلزی نظیر کلسیم موجود در رسوبات اشاره کرد که با توجه به ماهیت قلیایی استخر پرورش ماهیان گرمابی، پدیده‌ای محتمل و شناخته شده است (گاتر و میر، 1993؛ مایترا و همکاران، 2015).

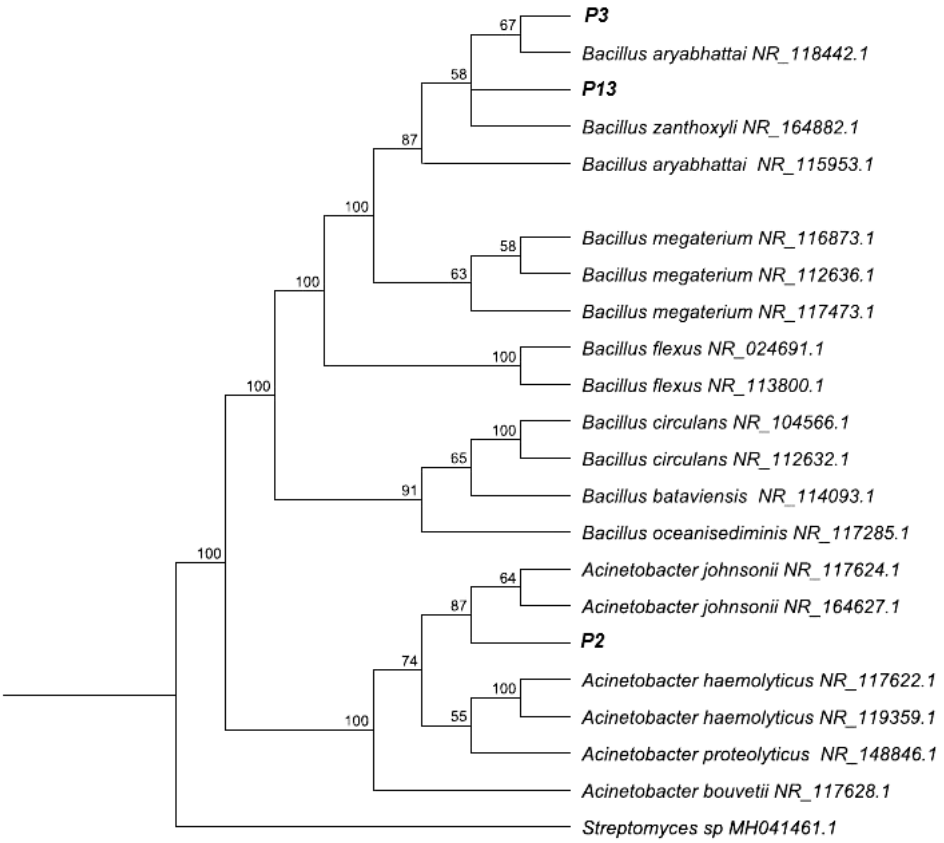
البته در این خصوص، بررسی‌های بیشتر در مورد دینامیک و پویایی فسفر در محیط‌های آبی (سازوکارهای درگیر، شدت ته‌نشینی و آزادسازی فسفر) پیشنهاد می‌گردد. از دیگر دلایل کاهش عملکرد جدایه‌ها در میکروکازم رسوب می‌توان به عدم تطابق مواد مغذی موجود در محیط‌های کشت معمول آزمایشگاهی با مواد مغذی موجود رسوبات آبی (علیرغم تثبیت مناسب جمعیتی) اشاره کرد. نوع و میزان منابع کربن، فسفر، نیتروژن و غیره تاثیری مهمی بر میزان توانایی جدایه‌ها در آزادسازی فسفر دارد. این تفاوت‌ها در نهایت سبب می‌شود باکتری‌های جداسازی شده در این محیط کشت‌ها هنگامی که در شرایط طبیعی (محیط حاوی رسوب) قرار می‌گیرند عملکرد متفاوتی را از خود بروز دهند. بنابراین در هنگام فرآیند جداسازی باکتری‌ها، طراحی و ساخت محیط‌های کشت متناسب با شرایط اکوسیستم‌ها (از نظر منابع کربن، فسفر و نیتروژن) باید مورد توجه قرار گیرد (ناتیال،1999؛ لی و همکاران 2016). نتایج مطالعه حاضر با نتایج برخی محققین (کولاوینو و همکاران، 2010؛ لیو و همکاران، 2015) منطبق است که بیان داشتند کارآمدترین سویه‌های آزادکننده فسفر جداسازی شده از محیط جامد و مایع قادر به آزادسازی فسفر در شرایط خاک نبودند. بنابراین، استفاده از محیط‌های شبیه‌سازی شده نظیر میکروکازم می‌تواند گامی مؤثر در راه جداسازی باکتری-های کارآمدتر تلقی گردد. نتایج حاصل از ارزیابی عملکرد جدایه‌ها در محیط میکروکازم نشان داد که جدایه‌های آزادکننده فسفر آلی میزان فسفر بیشتری نسبت به جدایه-های آزادکننده فسفر معدنی رهاسازی کرده‌اند (جداول 3 و 4). به خوبی ثابت شده است که باکتری‌های آزاد کننده فسفر از ترکیبات آلی با باکتری‌های آزاد کننده فسفر از منابع معدنی از نظر استفاده از منابع فسفر و سازوکارهای دسترسی به فسفر، متمایز هستند (تائو همکاران، 2008).

برخی از باکتری‌های آزادکننده فسفر از طریق سازوکار ترشح اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین (اسید سیتریک، اگزالیک و تارتاریک) اثر قویتری بر انحلال منابع فسفر معدنی نامحلول دارند (شارما و همکاران، 2013؛ بهرا و همکاران، 2014). به‌علاوه، برخی دیگر از این باکتری‌ها با رهاسازی آنزیم‌ها (فسفاتاز و فیتاز) اثر قویتری بر انحلال منابع فسفر آلی نامحلول دارند (بهرا و همکاران، 2014). با توجه به مطالعات آرمنده و همکاران (1397)، بیش از 85 درصد از فسفر کل موجود در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران را فسفر آلی تشکیل می‌دهد. با در نظر گرفتن این شرایط، انتظار می‌رود باکتری‌های آزادکننده فسفر آلی فعال‌تر از باکتری‌های آزادکننده فسفر معدنی در رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی باشند. از این رو جداسازی و بررسی عملکرد باکتری‌های آزادکننده فسفر صرفا بر مبنای ماده تری‌کلسیم فسفات (فسفر معدنی

نامحلول) نمی‌تواند امری منطقی و مطلوب به نظر رسد که در نتایج مطالعه حاضر نیز این موضوع به وضوح تأیید شد. در همین راستا، تائو و همکاران (2008) بیان داشتند که باکتری‌های جدا شده از منابع معدنی اثر بهتری در آزادسازی فسفر از منابع معدنی و باکتری‌های جداشده از منابع آلی اثر قویتری در آزادسازی فسفر از منابع آلی دارند. در مقاله مروری باشان و همکاران (2013) نیز بیان شد که اکثر سویه‌هایی که با استفاده از تری‌کلسیم فسفات انتخاب شده‌اند یا بی‌اثر بودند یا توانایی انحلال پایینی بر سایر ترکیبات فسفر نامحلول به‌ویژه در خاک‌های اسیدی و خاک های غنی از فسفر آلی داشتند.

انتخاب نهایی بهترین جدایه‌ها به منظور شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها

با تأکید بر نتایج بدست آمده در مرحله میکروکازم، در نهایت سه جدایه P13، P3 و P2 که بهترین عملکرد را در بین سایر جدایه‌ها از خود نشان داده بودند به‌منظور شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی سه جدایه مورد مورد نظر و مقایسه آن با سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) در شکل 1 ارائه شده است.



شکل 1- درخت فیلوژنی جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA

نتایج نشان داد از مجموع سه جدایه‌ی منتخب، یک جدایه متعلق به جنس *Priestia*، یک جدایه متعلق به جنس *Bacillus* و یک جدایه متعلق به جنس *Acinetobacter* می‌باشد. توالی‌های جدایه P3 به باکتری *Priestia aryabhattai* strain *SB.P3* (GenBank: MT757933) و توالی جدایه P13 به باکتری strain

GenBank:) *Bacillus zanthoxyli SA.P13* MT757932) تعلق داشتند. توالی جدایه P2 نیز متعلق به باکتری *Acinetobacter johnsonii* strain *SC.P2* (GenBank: MT757934) بود. مروی بر منابع (آستین و آستین، 2012؛ فائو، 2017) حاکی از آن است که مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های بیماریزا در حوزه آبزی‌پروری شامل *Vibrio*، *Enterobacteria*، *Aeromonas*، *Edwardsiella*، *Flavobacterium*، *Streptococcus*، *Mycobacterium* و *Pseudomonas* می‌باشند. همچنین باکتری‌های *Aeromonas hydrophila*، *Pseudomonas fluorescens* و *P. aeruginosa* از مهمترین باکتری‌های بیماریزا در اکوسیستم‌های آب شیرین مخصوصاً در استخرهای ماهیان گرمابی محسوب می‌شوند (لیوپو و لیم، 2003؛ فائو 2017؛ لی و همکاران 2020) و با توجه به اطلاعات موجود(لوردزی و همکاران، 2020)، باکتری‌های خانواده باسیلاسه شناسایی شده در مطالعه حاضر عمدتاً به‌عنوان پروبیوتیک مطرح هستند و دارای اثرات بسیار مثبتی بر کیفیت آب می‌باشند. بررسی مطالعات گذشته نیز نشان داده است که باکتری *Acinetobacter johnsonii* برای ماهیان گرمابی بیماریزا نیست (کوزینکا، 2014). به‌علاوه این باکتری به ندرت در انسان بیماری ایجاد می‌کند (مونتانا، 2016). با این وجود، با توجه به عدم مطالعه دقیق روی پتانسیل بیماریزایی این باکتری در آبزیان و انسان، به‌کارگیری این سویه به عنوان کاندیدای کودهای زیستی تا زمان ارزیابی دقیق بیماریزایی این سویه روی گونه‌های ماهیان گرمابی توصیه نمی‌شود. خصوصیات میکروسکوپی و ریخت شناسی هر یک از جدایه‌ها نیز در جدول 5 آمده است.

جدول 5- خصوصیات میکروسکوپی و ریخت شناسی باکتری‌های جداسازی شده

	Bacillus zanthoxyli	***Bacillus aryabhattai***	***Acinetobacter johnsonii***
رنگ آمیزی گرم	گرم مثبت	گرم مثبت	گرم منفی
شکل	باسیل	باسیل	کوکو باسیل
قابلیت اسپور زایی	فاقد اسپور	دارای اسپور	فاقد اسپور
تنفس	هوازی	هوازی	هوازی
وضعیت حرکتی	متحرک	متحرک	غیر متحرک
رنگ کلنی	متمایل به زرد	متمایل به زرد	شیری متمایل به زرد
سطح کلنی	صاف	صاف	محدب
اندازه کلنی	2 تا 4 میلی‌متر	3 تا 5 میلی‌متر	1 تا 2 میلی‌متر
بافت کلنی	کره‌ای	کره‌ای	لزج

نتیجه‌گیری کلی

نوع منبع مورد استفاده در فرآیند جداسازی جدایه‌های آزادکننده فسفر باید بر اساس نوع ترکیبات موجود در اکوسیستم مورد مطالعه باشد. بنابراین با توجه به اینکه بخش بزرگی از فسفر کل موجود در اکوسیستم-های آبی ما از نوع فسفر آلی (50 الی 90 درصد) می‌باشد، در این مطالعه از ترکیب فیتات کلسیم به عنوان یکی از ترکیبات غالب فسفر آلی نامحلول استخرهای پرورش ماهیان برای جداسازی باکتری آزادکننده فسفر استفاده شد. نتایج محیط میکروکازم رسوب نشان داد جدایه‌هایی که با استفاده از ترکیب فیتات کلسیم جداسازی شده‌اند توانایی بهتری در آزادسازی فسفر نسبت به جدایه‌های جداسازی شده با ترکیب تری‌کلسیم فسفات داشتند. ارزیابی در شرایط میکروکازم مبین این موضوع بود که جدایه‌ها به‌هنگام قرارگیری در شرایط مشابه استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (میکروکازم) عملکرد متفاوتی را نسبت به محیط‌های کشت معمول (جامد و مایع) از خود نشان می‌دهند. بنابراین، استفاده از

محیط‌های شبیه‌سازی شده نظیر میکروکازم می‌تواند گامی مؤثر در راه جداسازی باکتری‌های کارآمدتر تلقی گردد.

سه باکتری آزادکننده فسفر *Priestia aryabhattai*، *Bacillus zanthoxyli* و *Acinetobacter johnsonii* در طول فرآیندهای ارزیابی، عملکرد مطلوبی را از خود نشان دادند. با توجه به پتانسیل بیماریزایی *A. johnsonii* برای ماهی و انسان، سویه‌های خانواده Bacillaceae را می‌توان به‌عنوان کاندیدای استفاده در کودهای زیستی برای ارزیابی‌های تکمیلی آینده در شرایط واقعی استخر پرورش ماهیان گرمابی در نظر گرفت.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه علوم‌دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت-مدرس و همچنین رئیس و کارشناسان محترم بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع:

1. آرمنده، م.، محمودی، ن. و فلاح نصرت آباد، ع. 1397. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل کننده فسفات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفر. نشریه علمی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. 6(4): 140-121
2. Antoun, H., 2012. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. Procedia Engineering, 46, pp.62-67.
3. Austin, B. and Austin, D.A., 2012. Vibrionaceae representatives. Bacterial fish pathogens (pp. 357-411). Springer, Dordrecht.
4. 4Avila-Segura, M., Lyne, J.W., Meyer, J.M. and Barak, P., 2004. Rapid spectrophotometric analysis of soil phosphorus with a microplate reader. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 35(3-4), pp.547-557.
5. Bai, X., Ding, S., Fan, C., Liu, T., Shi, D. and Zhang, L., 2009. Organic phosphorus species in surface sediments of a large, shallow, eutrophic lake, Lake Taihu, China. Environmental Pollution, 157(8-9), pp.2507-2513.
6. Bashan, Y., Kamnev, A. A. and de-Bashan, L. E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biology and Fertility of Soils, 49 (4), 465-479.
7. Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H.N., 2014. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2), pp.97-110.
8. Cao, Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G. and Hu, Z. 2018. Phosphorus solubilizing and releasing bacteria screening from the rhizosphere in a natural wetland. Water, 10 (2), 195.
9. 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.
10. Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. and Aguilar, O.M., 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote Phaseolus vulgaris growth. Biology and Fertility of Soils, 46(7), pp.727-738.
11. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) Major bacterial diseases affecting aquaculture. Aquatic AMR Workshop, Mangalore, India. http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen .pdf.

12. FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2020. Sustainability in Action. Rome. https://doi.org/10.4060/ca9229en
13. Gächter, R. and Meyer, J.S., 1993. The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. In Proceedings of the Third International Workshop on Phosphorus in Sediments (pp. 103-121). Springer, Dordrecht.
14. Hlordzi, V., Kuebutornye, F.K., Afriyie, G., Abarike, E.D., Lu, Y., Chi, S. and Anokyewaa, M.A., 2020. The use of Bacillus species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. Aquaculture Reports, *18*, p.100503.
15. 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.
16. Illmer, P. and Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry, 27(3), pp.257-263.
17. 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.
18. Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review. Agronomy for Sustainable Development, 27 (1), 29-43.
19. Kim, C. H., Han, S. H., Kim, K. Y., Cho, B. H., Kim, Y. H., Koo, B. S. and Kim, Y. C. 2003. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium Enterobacter intermedium. Current Microbiology, 47 (6), 457-461.
20. Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A. and Niemczuk, W., 2014. Acinetobacter johnsonii and Acinetobacter lwoffii-the emerging fish pathogens. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 58(2), pp.193-199.
21. Li, Y. and Boyd, C.E., 2016. Laboratory tests of bacterial amendments for accelerating oxidation rates of ammonia, nitrite and organic matter in aquaculture pond water. Aquaculture, 460, pp.45-58.
22. Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. and Mou, Z., 2019. Characteristics of inorganic phosphate-solubilizing bacteria from the sediments of a eutrophic lake. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(12), p.2141.
23. Li, X.M., Zhu, Y.J., Ringo, E. and Yang, D., 2020. Prevalence of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens and factors influencing them in different freshwater fish ponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(1), pp.111-124.
24. Lio-Po, G.D. and Lim, L.S., 2014. Infectious diseases of warmwater fish in fresh water. Diseases and disorders of finfish in cage culture. 2nd edition. Wallingford and. Boston: CAB International, pp.193-253.
25. 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, pp.217-224.
26. Maitra, N., Manna, S.K., Samanta, S., Sarkar, K., Debnath, D., Bandopadhyay, C., Sahu, S.K. and Sharma, A.P., 2015. Ecological significance and phosphorus release potential of phosphate solubilizing bacteria in freshwater ecosystems. Hydrobiologia, 745(1), pp.69-83.
27. Mehta, S., and Nautiyal, C. S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology, 43 (1), 51-56.

28. Montaña, S., Schramm, S.T., Traglia, G.M., Chiem, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Quiroga, C., Tolmasky, M.E. and Iriarte, A., 2016. The genetic analysis of an Acinetobacter johnsonii clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. PLoS One, 11(8), p.e0161528.
29. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170 (1), 265-270.
30. Premono, M.E., Moawad, A.M. and Vlek, P.L.G., 1996. Effect of phosphate-solubilizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere (No. REP-12113. CIMMYT.).
31. Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. and Clesceri, L. S. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association: Washington, DC, USA, 10.
32. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus, 2(1), pp.1-14.
33. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12), pp.2725-2729.
34. Tao, G. C., Tian, S. J., Cai, M. Y. and Xie, G. H. 2008. Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. Pedosphere. 18(4): 515–523.
35. 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.
36. Gen-Fu, W. and Xue-Ping, Z., 2005. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. Water Research, 39(19), pp.4623-4632.
37. Yang, L., Liu, Y., Cao, X., Zhou, Z., Wang, S., Xiao, J., Song, C. and Zhou, Y., 2017. Community composition specificity and potential role of phosphorus solubilizing bacteria attached on the different bloom-forming cyanobacteria. Microbiological Research, 205, pp.59-65.

Evaluation of different insoluble phosphorus sources to isolate phosphorus-releasing bacteria in fish ponds

V. Arjmand, N. Mahmoudi[1], and A. R. Fallah Nosratabad

Graduate of the Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran; E-mail: vahed.arjmand@gmail.com

Assistance professor of Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran; E-mail: n.mahmoudi@modares.ac.ir

Associate Professor of Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: rezafayah@yahoo.com

Received: October, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

One of the main reasons for the low yield of biofertilizers in fish ponds is the use of insoluble mineral phosphorus sources (often tri-calcium phosphate) during the process of isolation and evaluation of phosphorus-releasing microorganisms. A large part of insoluble phosphorus (50 to 90%) in warm water fish ponds is insoluble organic phosphorus. Therefore, it seems phosphorus-releasing microorganisms isolated solely from mineral phosphorus sources can not be effective as biofertilizers in warm water fish ponds. The aim of this study was to isolate phosphorus-releasing bacteria from warm water fish ponds using NBRIP medium containing organic phosphorus source (calcium phytate) and compare their performance with bacteria derived from insoluble mineral phosphorus source (tri-calcium phosphate) in microcosm conditions (Erlenmeyer contains sediment: conditions similar to a fish pond). The phosphorus release ability of isolates (33 organic isolates and 19 inorganic isolates) was evaluated in NBRIP solid and liquid medium. The range of soluble phosphorus in the liquid medium containing calcium phytate varied between 57.40 - 141.93 and 108.16 - 219.49 mg/l in the medium containing tricalcium phosphate. In the final step, evaluation of isolates in sediment microcosm showed that three isolates from organic phosphorus source (3P, 13P, and 2P) were the best phosphorus release isolates (with 11.86, 12.53, and 28.18 mg / l respectively) and had better performance compared to isolates from mineral phosphorus source. Molecular identification showed these isolates belonged to *priestia aryabhattai*, *Bacillus zanthoxyli*, and *Acinetobacter johnsonii*. Due to the pathogenic potential of *A. johnsonii* for fish and humans, the Bacillaceae family strains can be considered candidates for use in biofertilizers for further evaluation.

Keywords: Biofertilizer, Organic phosphorus solubilization, Sediment microcosm, Phytate, Warm water fish

[1]. Corresponding author: Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran