نشریه علمی زیست‌شناسی خاک / جلد ۱۱ / شماره ۲ / ۱۴۰۲/ص۱۵۵-۱۶۵
dx.doi.org/10.22092/sbj.2024.362289.251

بررسی کارایی حل‌کنندگی فسفر معدنی و آلی نامحلول توسط سیانوباکتری‌های جداسازی شده از استخرهای پرورش ماهی

علیرضا فلاح نصرت‌آباد، مصطفی علی‌شیری جونقانی* و رویا بزاززاده

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

دانش‌آموخته دوره‌ی دکتری تخصصی گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران **mostafaalishiri@ut.ac.ir**

کارشناس محقق موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران **bazzazzadeh96@gmail.com**

«مقاله پژوهشی»

دریافت۱۴۰۲/۴/۲۴ و پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

چکیده

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی در محیط‌های آبی است و نقش مهمی در شکوفایی و غنی‌سازی اکوسیستم‌های آب شیرین بخصوص در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی دارد. این عنصر در محیط‌های آبی به اشکال مختلف محلول و عمدتاً نامحلول وجود دارد. سیانوباکتری‌ها گروهی متنوع از پروکاریوت‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک هستند که توانایی آن‌ها در فعالیت فسفاتازی که فسفر نامحلول را به شکل محلول تبدیل کرده، اثبات‌شده است. بنابراین پژوهش حاضر باهدف جداسازی، شناسایی و بررسی توانایی سیانوباکتری‌های موجود در استخر پرورش ماهیان گرمابی در حل‌کنندگی فسفر در سطح آزمایشگاهی انجام شد. در این پژوهش کارایی حل‌کنندگی چهار جدایه سیانوباکتریایی جداسازی شده از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی شامل *Chroococcus sp.*، *Oscillatoria sp.*، *Microcystis sp.* و *Gloeocapsa sp.* با دو منبع فسفات معدنی و آلی شامل تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم در دو بخش روشناور و زی‌توده سنجیده شد. نتایج نشان داد در بین جدایه‌های سیانوباکتریایی بیشترین توانایی را *Microcystis sp.* با میزان ۴۷/۵ و ۶۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم در سنجش فسفر محلول در بخش رو شناور نشان داد. همچنین در بخش زی توده نیز بیشترین کارایی حل کنندگی فسفات از منبع تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم را *Gloeocapsa sp.* به ترتیب با میزان ۳۵/۵ و ۱۸/۷ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد. هر چند برای هر دو منبع فسفر سیانوباکتر *Microcystis sp.* بیشترین مقدار زی توده را نسبت به سایر سیانوباکترها نشان داد، با این حال هیچ اختلاف معنی‌داری در تعداد سیانوباکتری‌های رشد کرده تحت تأثیر منابع مختلف فسفر در هیچ گروه آزمایشی دیده نشد. نتایج این پژوهش نشان داد که برخی از سیانوباکتری‌های جداشده از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی در شرایطی که به اندازه کافی منابع فسفر نامحلول در دسترس داشته باشند تا حدودی قابلیت انحلال آن را دارند.

کلمات کلیدی: تری کلسیم فسفات، حل‌کنندگی فسفات، سیانوباکتری، فیتات کلسیم

* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: **mostafaalishiri@ut.ac.ir**

مقدمه

تولیدات طبیعی استخرهای پرورش ماهیان گرمابی به شکل مستقیم و غیرمستقیم در تغذیه و رشد ماهیان در استخرهای خاکی و در سیستم پرورشی چندگونه‌ای نقش مهمی دارند. با افزایش تولیدات طبیعی استخر، میزان تولید ماهیان گرمابی نیز می‌تواند افزایش پیدا کند (خان و همکاران، ۲۰۰۷). به همین منظور بهینه‌سازی مواد معدنی در آب استخرهای پرورشی ماهیان گرمابی ضروری به نظر می‌رسد (لارسون و تولارن، ۱۹۸۶).

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی در محیط-های آبی است و پس از نیتروژن دومین عنصر غذایی لازم برای رشد و نمو گیاهان و ریز جانوران است (ابراهیمی، ۱۳۹۶). به‌علاوه این عنصر نقش مهمی در شکوفایی جلبکی[1] و غنی‌سازی اکوسیستم‌های آب شیرین بخصوص در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی دارد (پال و همکاران، ۲۰۲۰). همچنین یک عامل محدودکننده رشد برای فیتوپلانکتون‌ها است (هو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ساگونان، ۲۰۰۰). این عنصر در فرآیندهایی مانند فتوسنتز، تنفس سلولی، تقسیم سلولی و چند فرآیند مهم بیولوژیکی دیگر نقش دارد (گولاتی، ۲۰۱۰). فسفر در محیط‌های آبی به اشکال مختلفی ازجمله فسفر آلی (OP)[2]، فسفر معدنی محلول در آب (WSIP)[3] و فسفات معدنی نامحلول در آب (ISIP)[4] وجود دارد. فسفر معدنی محلول در آب می‌تواند به‌طور مستقیم توسط تولیدکنندگان اولیه آب جذب شود. اما فسفات معدنی نامحلول در آب مانند فسفات کلسیم، فسفات آلومینیوم ($A1PO_4$) یا فسفات آهن ($FePO_4$) و فسفر آلی مانند فسفولیپید، فیتات کلسیم یا اسیدهای نوکلئیک معمولاً توسط تولیدکنندگان اولیه آب مانند جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها به طور مستقیم قابل‌استفاده نیستند، ولی می‌توانند تحت شرایط مختلف فیزیکی، شیمیایی یا بیولوژیکی به اشکال محلول تبدیل شوند (فو و پینگ، ۲۰۰۵؛ کیم و همکاران، ۲۰۰۳). گزارش‌شده است سیانوباکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف مانند تولید و ترشح آنزیم فسفاتاز قلیایی می‌توانند انواع فسفرهای معدنی نامحلول ازجمله $Ca_3(PO_4)_2$، $FePO_4$، $A1PO_4$ و $Ca_5(PO_4)_3{\cdot}OH$ را حل کنند (دورجی و همکاران، ۱۹۸۵؛ ولف و همکاران، ۱۹۸۵؛ کامرون و جیلیان، ۱۹۹۸؛ یاندیگریو همکاران، ۲۰۱۱). همچنین توانایی تثبیت نیتروژن به‌وسیله‌ی سیانوباکتری‌ها نیز اثبات شده است (هندرایانتی و همکاران، ۲۰۱۸).

سیانوباکتری‌ها گروهی متنوع از پروکاریوت‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک هستند. در مطالعات قبلی توانایی سیانوباکتری‌ها در تبدیل فسفر نامحلول به فرم محلول بواسطه‌ی فسفاتاز قلیایی، اثبات شده است (میشرا و همکاران، ۲۰۰۵). سیانوباکتری‌ها در شرایط محدودیت فسفر، فسفاتاز قلیایی برون سلولی تولید و ترشح می‌کنند که باعث تجزیه انواع فسفات آلی می‌شود (پاندی و پارون، ۲۰۱۱؛ ویتون و همکاران، ۱۹۹۱). وجود غلظت زیادی از ترکیبات فسفات معدنی و فسفر آلی نامحلول در آب و رسوبات استخرهای پرورش ماهیان گرمابی در مطالعات قبلی گزارش‌شده است (هو و همکاران، ۲۰۱۰).

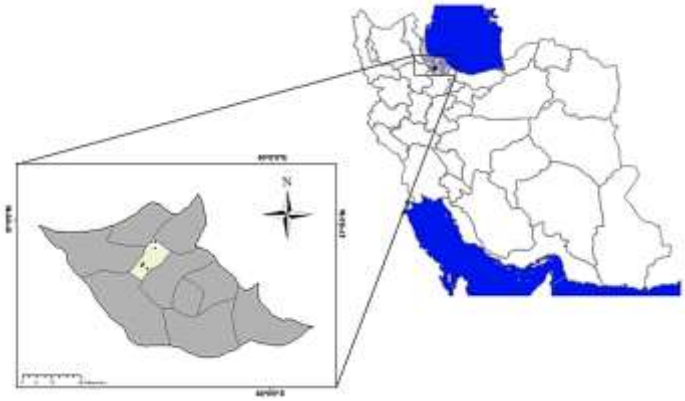
بنابراین با توجه به نقش فسفر محلول در تولیدات طبیعی استخرهای پرورش ماهیان گرمابی و پتانسیل سیانوباکتری‌ها در انحلال فسفر با توجه به مطالعات قبل و نیز ملاحظات زیست محیطی، این پژوهش باهدف جداسازی، شناسایی و بررسی توانایی سیانوباکتری‌های موجود در استخر پرورش ماهیان گرمابی در حل‌کنندگی و قابل‌دسترس کردن فسفر نامحلول در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

1 algal bloom
2 Organic Phosphorus
3 Water-Soluble Inorganic Phosphorus
4 Water-Insoluble Inorganic Phosphate

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سیانوباکتری‌ها

نمونه‌برداری از آب استخر پنج مزرعه پرورش ماهیان گرمابی (پی اچ= ۷/۸، دما= ۲۸ °C) در استان گیلان، شهرستان رودبار، بخش رحمت‌آباد (شکل ۱) در مهرماه ۱۴۰۱ انجام شد. نمونه‌برداری در ظهر و از هر چهار طرف استخرها و از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی‌متری سطح آب انجام گردید و پس از اختلاط نمونه‌ها، یک نمونه ۲۵۰ میلی‌لیتری جهت کشت و جداسازی سیانوباکتری‌ها و به دور از نور خورشید در مجاورت یخ به آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور منتقل شد (کولیک، ۱۹۹۵).



شکل۱- مناطق نمونه‌برداری شده از مزارع پرورش ماهیان گرمابی در استان گیلان، شهرستان رودبار

جهت رشد کلنی‌های اولیه سیانوباکتری، یک میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} آب استخر نمونه‌برداری شده، در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 (۷۵ میلی‌گرم $MgSO_4.7\ H_2O$، ۱۵۰۰ میلی‌گرم $NaNO_3$، ۶ میلی‌گرم $C_6\ H_8O_7$، ۳۶ میلی‌گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۴۰ میلی‌گرم $K_2HPO_4.3H_2O$، ۶ میلی‌گرم $C_6\ H_5$+4y Fex Ny O_7، ۲۰ میلی‌گرم Na_2CO_3) پخش گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و با تناوب نوری ۲۴ ساعت روشنایی در گرمخانه نگهداری شدند. بعد از پیدایش کلنی-های متفاوت سیانوباکتری‌ها، هر کلنی به صورت جداگانه به پتری دیش‌های جدید حاوی محیط کشت جامد BG11 منتقل شد و مجدداً به مدت ۱۴ روز در شرایط قبلی نگهداری شدند. در ادامه طی سه مرتبه واکشت مشابه شرایط قبل سیانوباکتری‌ها خالص گردیدند. سپس مقداری از هر کلنی در محیط کشت جامد برداشته شد و به فالکون-های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع BG11 تلقیح گردید و به مدت ۱۴ روز در اتاقک رشد بر روی دستگاه تکان دهنده (با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی قرار داده شدند (جوهانسون و برگمن، ۲۰۰۶).

همچنین جدایه‌های سیانوباکتریایی به روش مورفولوژیک، با تهیه لام از کلنی‌های مختلف، با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها، مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نمونه‌های موردنظر شناسایی شدند (جوهن و موزیم، ۲۰۱۲؛ کومارک و همکاران، ۲۰۱۴).

سنجش میزان حل‌کنندگی فسفات سیانوباکتری‌ها

چهار گونه سیانوباکتری که بیشترین تراکم را در استخرهای شکوفا شده داشتند به‌صورت جداگانه در محیط کشت مایع BG11 با حجم ۲۵ میلی‌لیتر و در سه تکرار کشت شدند. سپس جهت سنجش میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی و فسفر آلی، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون از کشت جوان و در مرحله رشد تصاعدی به ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشتBG11 به همراه سه گرم بر لیتر تری کلسیم فسفات (فسفات معدنی) و فیتات کلسیم (فسفر آلی) به‌صورت جداگانه، تلقیح شد (یاندیگری و همکاران،

۲۰۱۱). گروه‌های کنترل نیز حاوی محیط کشت با منبع فیتات کلسیم و تری کلسیم فسفات با غلظت سه گرم بر لیتر بودند. لازم به ذکر است که ترکیب شیمیایی K_2HPO_4 به جهت در دسترس نبودن فسفر محلول از محیط کشت حذف شد و پتاسیم این ترکیب با ۳۴/۲ میلی‌گرم بر لیتر از ترکیب شیمیایی پتاسیم کلرید جبران شد. در ادامه تمامی گروه‌های آزمایشی و کنترل برای ۱۴ روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در انتهای دوره دو میلی‌لیتر از هر گروه آزمایشی برداشته و داخل میکروتیوپ ریخته شد. سپس پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریوفیوژ شدند. پس از آن، بخش روشناور برای اندازه‌گیری فسفر محلول جدا شد و میزان فسفر محلول با روش مولیبدات-وانادات اندازه‌گیری شد (پائول و سینها، ۲۰۱۳). همچنین میزان فسفر زیست‌توده سیانوباکتریایی ته‌نشین شده در میکروتیوب با توجه به ماهیت جامد توده سیانوباکتریایی و لزوم استخراج فسفر و همچنین دقت بیشتر این روش برای مقادیر کم فسفر، به روش آسکوربیک اسید-وانادات سنجیده شد (اکت و همکاران، ۲۰۱۰).

ارزیابی زیست‌توده سیانوباکتریایی

جهت بررسی و مقایسه میزان زیست‌توده سیانوباکتری‌های مختلف از روش شمارش با لام نئوبار استفاده شد. در این روش در پایان دوره ۱۴ روزه، ۱۰ میکرو لیتر از کشت هر گروه آزمایشی روی لام نئوبار ریخته شد و پس از شمارش سیانوباکتری‌ها با استفاده از رابطه زیر تعداد سیانوباکتری‌ها در واحد حجم به دست آمد.

$$\text{تعداد کل سیانوباکتری‌ها} = A \times 16 \times 25 \times 10^4$$

A= میانگین تعداد سیانوباکتری‌ها در هر مربع کوچک

آنالیزهای آماری

آزمایش بر اساس فاکتوریل بر مبنای طرح پایه کاملاً تصادفی بود که برای تجزیه‌وتحلیل و رسم داده‌های مربوطه از نرم‌افزار SPSS-26 و Excel-2016 استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها در تیمارهای جداگانه با آزمون لون، جهت بررسی اختلاف معنی‌دار از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی سیانوباکتری‌ها

جدایه‌های سیانوباکتریایی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شامل شکل، رنگ، اندازه سلول، کلنی، تریکوم، شکل سلول رأسی، وجود یا عدم وجود غلاف و سایر خصوصیات مورفولوژیک شناسایی شدند. سپس جدایه‌هایی که در تمامی پنج استخر شکوفا شده حضورداشته و بیشترین درصد فراوانی را در نمونه آب استخر پرورش ماهی داشتند، جهت انجام این پژوهش انتخاب گردیدند که به شرح(جدول۱) از جنبه فراوانی جدایه‌ها بیشترین فراوانی متعلق به *Chroococcus sp.* با میانگین فراوانی ۴۰/۷۴ درصد و کمترین فراوانی متعلق به *Microcystis sp.* با ۹/۴۷ درصد بود. در این راستا کمالی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه‌ای بر تنوع گونه‌ای استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان گلستان سه جنس *Chroococcus sp.*، *Oscillatoria sp.* و *Microcystis sp.* را در گزارش کردند. همچنین فندرسکی و همکاران (۱۳۸۸) هر چهار جدایه این پژوهش را در مطالعه خود از پراکنش سیانوباکتریایی استخرهای پرورش ماهی آلاگل واقع در شرق استان گلستان گزارش کرده‌اند. بااین‌حال فصل نمونه‌برداری، ترکیب و تراکم ماهیان استخر، آب‌وهوای منطقه، زمان نمونه‌برداری، اندازه سیانوباکتری، قابلیت چرای سیانوباکتری، درجه یوتروفی استخر، شرایط کوددهی، دما و pH استخر، پایداری شرایط فیزیکی و شیمیایی آب استخر و سایر عوامل می‌تواند بر ترکیب و

تنوع سیانوباکتریایی استخر پرورش ماهی تأثیر بسزایی بگذارد (فرسین و همکاران، ۲۰۱۰؛ پادماواتی و پراساد، ۲۰۰۷؛ ریگمن و مور ۱۹۸۶).

جدول ۱- حضور یا عدم حضور سیانوباکتری‌ها در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی

سیانوباکتری‌ها	حضور/ عدم حضور					میانگین تراکم± انحراف معیار (تعداد سیانوباکتری در میلی‌لیتر)	درصد فراوانی*
	استخر۱	استخر۲	استخر۳	استخر۴	استخر۵		
Chroococcus sp.	+	+	+	+	+	۳۹/۶±۵/۶۸	**۴۰/۴۷**
Gloeocapsa sp.	+	+	+	+	+	۳۰/۸±۶/۳	**۳۱/۶۹**
Oscillatoria sp.	+	+	+	+	+	۱۷/۶±۳/۵۷	**۱۸/۱**
Microcystis sp.	+	+	+	+	+	۹/۲±۲/۳۸	**۹/۴۷**

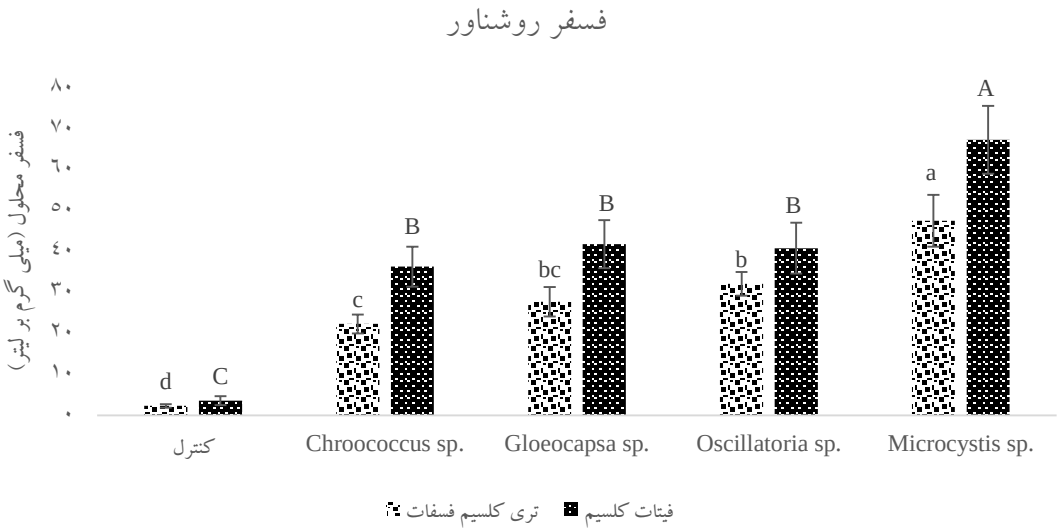
* درصد فراوانی فقط مربوط به سیانوباکتری‌هایی است که در آب استخر شکوفا شده‌اند.

سنجش میزان حل‌کنندگی فسفات سیانوباکتری‌ها

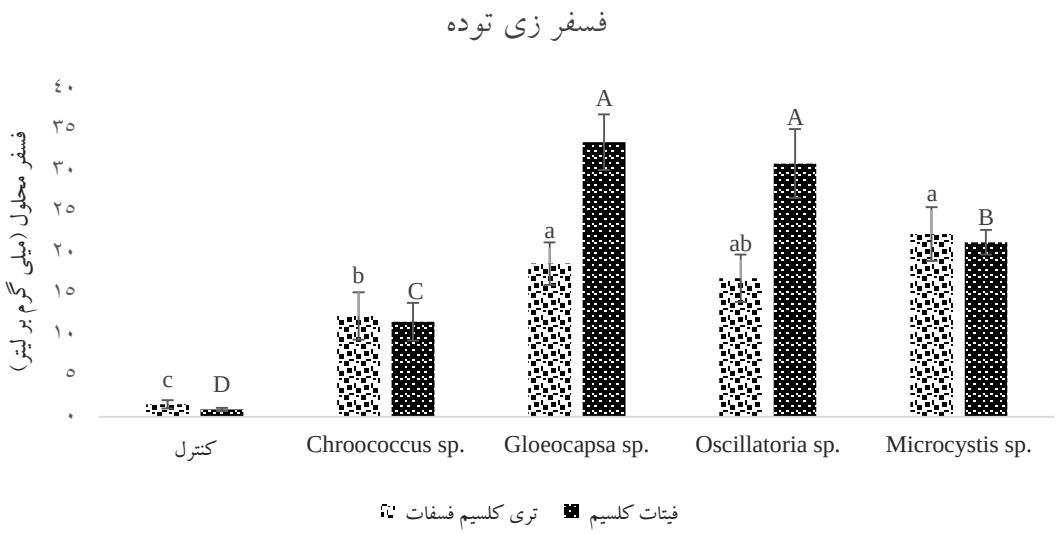
در این پژوهش غلظت فسفر محلول برای گروه آزمایشی با منبع تری کلسیم فسفات طبق نمودار شکل ۱، بعد از ۱۴ روز بین ۲۲/۳ تا ۴۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر فسفات و برای گروه آزمایشی با منبع فیتات کلسیم بین ۳۶/۳ تا ۶۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر برای سنجش از بخش روشناور متغیر بود. بیشترین کارایی حل‌کنندگی فسفات از منبع تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم را *Microcystis sp.* به ترتیب با میزان ۴۷/۵ و ۶۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر در سنجش فسفر محلول در بخش رو شناور نشان داد (شکل ۱). این در حالی است که توانایی حل‌کنندگی فسفات با منبع تری کلسیم فسفات برای سیانوباکترهای *Microcystis sp.*، *Oscillatoria sp.* و *Chroococcus sp.* به ترتیب ۳۳/۹، ۴۹/۴ و ۵۳/۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش‌شده بود (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۶). در همین راستا سودایی مشایی و همکاران (۱۳۹۸) توانایی حل‌کنندگی فسفات برای ۳۰ جدایه سیانوباکترهایی از خاک‌های شالیزاری ایران را گزارش کرده‌اند. به‌علاوه در مطالعه‌ای دیگر بیان‌شده است نوعی سیانوباکتری قابلیت انحلال فسفر معدنی و آلی را از منابع سنگ فسفات و پودر استخوان دارد (افکایرین، ۲۰۲۱). با توجه به اینکه فسفر، عنصری ضروری برای همه موجودات ازجمله سیانوباکتری‌ها است، بنابراین در شرایط فقدان یا محدودیت فسفر، فسفاتاز قلیایی برون سلولی تولید و ترشح می‌کنند که تجزیه انواع فسفات آلی پیچیده را تسریع می‌نماید (پاندیو پارون، ۲۰۱۱). همچنین ثابت‌شده است که سیانوباکترها می‌توانند برخی فسفات‌های معدنی نامحلول از جمله فسفات کلسیم را حل کنند (سودایی مشایی و همکاران ۱۳۹۸).

مکانیسم‌های مختلفی جهت حل‌کنندگی فسفات نامحلول بیان‌شده است. ازجمله توانایی تولید اسیدهای آلی، سنتز کلات کننده‌ها، احیای آهن فریک و حل کردن آنزیمی یا اینکه چند مکانیسم به‌صورت هم‌زمان عمل می‌کنند (یاندیگری و همکاران، ۲۰۱۱، آرمنده و همکاران، ۱۳۹۷). اسیدی شدن محیط با تولید اسیدهای آلی، یکی از فرآیندهای مؤثر جهت توانایی حل‌کنندگی فسفات معدنی است. تولید اسید فتالیک یک راهکار بالقوه برای حل-کنندگی فسفر توسط سیانوباکتری‌ها پیشنهادشده است. بدین‌صورت که این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با اکسیداسیون ناقص قندها، اسیدهای آلی تولید کنند (ماندال و همکاران، ۱۹۹۲؛ یاندیگری، ۲۰۱۱) و درنتیجه اسیدهای آلی از طریق کاهش میزان pH و کلات نمودن یون‌ها منجر به افزایش فسفر قابل‌دسترس می‌شوند (کوئسی، ۱۹۸۳).

همچنین ثابت‌شده است باکتری‌های حل‌کننده فسفات ازجمله سیانوباکتری‌ها مقداری از فسفر حل‌شده را در ساختار خود ذخیره می‌کنند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۶؛ کوئسی و همکاران، ۱۹۸۹). این بخش از فسفر که به شکل آلی در پیکر ریز جانداران وجود دارد، پس از مرگ ریز جاندار به کمک آنزیم فسفاتاز کانی می‌شود و سپس به شکل محلول درمی‌آید (رودریگرز و فراگا، ۱۹۹۹). بنابراین در پژوهش حاضر علاوه بر اندازه‌گیری فسفر محلول روشناور میزان فسفر زی‌توده نیز اندازه‌گیری شده است. بر همین اساس طبق نمودار شکل ۲، در سنجش میزان فسفر محلول زی‌توده این مقدار برای گروه‌های آزمایشی با منبع تری فسفات کلسیم ۱۲/۳ تا ۲۲/۳ میلی‌گرم بر لیتر و برای گروه آزمایشی با منبع فیتات کلسیم ۱۱/۶ تا ۳۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شده است. در بخش توده زیستی نیز بیشترین کارایی حل‌کنندگی فسفات از منبع تری کلسیم فسفات و فیتات کلسیم را *Gloeocapsa sp.* به ترتیب با میزان ۳۵/۵ و ۱۸/۷ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد.



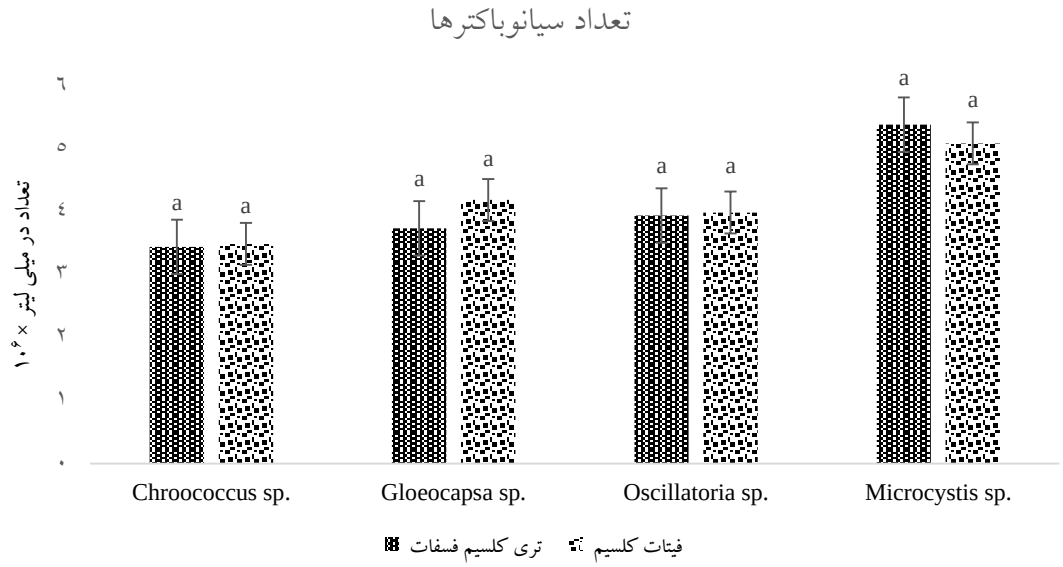
شکل ۱- میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی و آلی توسط جدایه های سیانوباکتریایی در بخش رو شناور.
حروف لاتین غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد (P<۰/۰۵) است.



شکل۲- میزان حل کنندگی فسفات معدنی و آلی توسط جدایه های سیانوباکتریایی در بخش زی توده.
حروف لاتین غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد (P<۰/۰۵) است.

ارزیابی زیست‌توده سیانوباکتریایی

سنجش تعداد سیانوباکترها در شرایط کشت خالص تحت تأثیر فسفر با منابع فسفات غیر محلول آلی و معدنی در تعداد هیچ‌کدام از سیانوباکترها اختلاف معنی-داری ایجاد نکرد. این مسئله می‌تواند به دلیل این باشد که در محیط کشت سیانوباکترها با توجه به ترکیبات محیط کشت BG11 و نیز انحلال فسفر نامحلول، میزان فسفر محلول به‌اندازه کافی وجود داشته است و محدودیتی برای تکثیر و تولید سیانوباکترها در هیچ جدایه وجود نداشته است. بااین‌حال به نظر می‌رسد با توجه به‌اندازه و خصوصیات منحصربه‌فرد هر سیانوباکتر، جدایه *Microcystis sp* از سایر جدایه‌ها رشد بهتری داشته است و میزان رشد *Chroococcus sp* کمتر بوده است.



نمودار ۳. تعداد انواع مختلف جدایه‌های سیانوباکتریایی پس از ۱۴ روز کشت تحت تأثیر منابع مختلف فسفر نامحلول.
حروف لاتین غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد (P<۰/۰۵) است.

نتیجه‌گیری

محدودیت فسفر محلول و قابل‌استفاده برای شکوفایی فیتوپلانکتون‌های استخرهای پرورش ماهیان گرمابی ازجمله مشکلات حال حاضر برخی از این مزارع است، پرورش‌دهندگان ماهیان گرمابی طیف گسترده‌ای از کودهای فسفاته را، به‌منظور افزایش میزان فسفر در آب استفاده می‌کنند، که علاوه بر تهدیدات زیست‌محیطی و تغییر کیفیت آب‌وخاک، بخش زیادی از آن به اشکال مختلف از دسترس خارج می‌شود (جلالی و همکاران، ۱۴۰۰). با توجه به نتایج این پژوهش، مشخص شد که برخی از سیانوباکتری‌های جداشده از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی در شرایطی که به‌اندازه کافی منابع فسفر نامحلول در دسترس داشته باشند تا حدودی قابلیت انحلال آن را دارند و این مسئله می‌تواند به شکوفایی آب مزارع پرورش ماهیان گرمابی و متعاقباً به رشد ماهی کمک کند. بنابراین استفاده از کودهای زیستی جلبک‌های سبزآبی راهکار مناسبی برای غلبه بر مشکل کمبود فسفر محلول در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی و سیستم‌های پرورش توأم است. البته باید در نظر داشت افزایش میزان انحلال فسفر و متعاقباً افزایش نسبت فسفر به نیتروژن در آب مزارع پرورش ماهی می‌تواند باعث یوتریفیکاسیون و شکوفایی جلبکی شود و بسیار مهم است که در این خصوص احتیاط‌های لازم انجام شود. با توجه به اینکه در این پژوهش ثابت‌شده است برخی سیانوباکتری‌های آزادکننده فسفر در استخرهای پرورش ماهی وجود دارند، به‌عنوان یک راهکار پیشنهادی می‌توان از آب خروجی استخرهای شکوفا شده برای شالیزارهای برنج به‌عنوان کود زیستی نیز استفاده کرد. البته این امر مهم نیازمند آزمایش‌های تکمیلی به‌منظور بررسی تأثیر آب خروجی از استخرهای شکوفا شده بر رشد و توسعه گیاه برنج دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از موسسه تحقیقات خاک و آب کشور بخصوص اعضای بخش بیولوژی خاک به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

فهرست منابع

۱. ابراهیمی، م. صفری سنجانی، ع. ساریخانی، م، ر. علی اصغرزاده، ناصر. ۱۳۹۶. بررسی توان برخی جدایه‌های باکتری در حل فسفات و تعیین چگونگی پخش فسفر حل شده در دو بخش محلول و زیتوده میکروبی. فصل نامه علمی پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها. شماره ۲۵، صفحات ۱۲۵-۱۰۹.

۲. آرمنده، م. محمودی، ن. فلاح، ع ر. ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل کننده فسفات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی به عنوان کاندیدای کود زیستی فسفره. مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان سال ششم، شماره چهارم، صفحه ۱۴۰-۱۲۱.

۳. جلالی، م. محمودی، ن. فلاح نصرت آباد، ع. کاهش مصرف کود شیمیایی فسفات در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی از طریق کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات در قالب کود زیستی. ۱۴۰۰. مجله علوم و فنون شیلات. دوره ۱۰. شماره ۴. ص ۴۳۶-۴۲۳.

۴. سعادت نیا، ه. ریاحی، ح. فخاری، ج. ۱۳۸۸.استفاده از جلبک‌های سبز-آبی جدا شده از یک شالیزار در استان گیلان به عنوان کود زیستی در گیاه برنج. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۳، شماره ۶.

۵. فندرسکی، ف. حسینی، ع. ایمانپور، م. ۱۳۸۸. بررسی پراکنش سیانوباکترهای استخرهای پرورشی کپورماهیان محدوده آلاگل. دومین سمپوزیوم بین المللی مهندسی محیط زیست.

۶. کمالی، م. رحیمی، الف. قلیچی، الف. موسوی ندوشن، ر. ۱۳۹۲. جمعیت جلبک های سبز آبی استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی شرق استان گلستان، شهر گنبدکاووس. فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری، شماره ۱، صفحات ۱۰۰-۸۳.

7. Achat, D. L., Morel, C., Bakker, M. R., Augusto, L., Pellerin, S., Gallet-Budynek, A., & Gonzalez, M. (2010). Assessing turnover of microbial biomass phosphorus: Combination of an isotopic dilution method with a mass balance model. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(12), 2231–2240. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.023
8. 8. Afkairin, A., Ippolito, J. A., Stromberger, M., & Davis, J. G. (2021). Solubilization of organic phosphorus sources by cyanobacteria and a commercially available bacterial consortium. *Applied Soil Ecology*, *162*(January), 103900. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103900
9. 9. Cameron, H. J., & Julian, G. R. (1988). Utilization of hydroxyapatite by Cyanobacteria as their sole source of phosphate and calcium. *Plant and Soil*, *109*(1), 123–124. https://doi.org/10.1007/BF02197589
10. 10. Dorich, R. A., Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1985). Estimating Algal Available Phosphorus in Suspended Sediments by Chemical Extraction. *Journal of Environmental Quality*, *14*(3), 400–405. https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq1985.00472425001400030018x
11. 11. Feresin, E. G., Arcifa, M. S., Silva, L. H. S. da, & Esguícero, A. L. H. (2010). Primary productivity of the phytoplankton in a tropical Brazilian shallow lake: experiments in the lake and in mesocosms. *Acta Limnologica Brasiliensia*, *22*(4), 384–396. https://doi.org/10.4322/actalb.2011.004
12. 12. Gen-Fu, W., & Xue-Ping, Z. (2005). Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. *Water Research*, *39*(19), 4623–4632. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.08.036
13. 13. Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V., & Prasad, R. (2010). Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by Acinetobacter rhizosphaerae strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology*, *192*(11), 975–983. https://doi.org/10.1007/s00203-010-0615-3
14. 14. Hendrayanti, D., Khoiriyah, I., Fadilah, N. and Salamah, A. 2018. Diversity of N2-fixing cyanobacteria in organic rice field during the cycle of rice crops. Inventing Prosperous Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management.
15. https://doi.org/10.1063/1.5050107.
16. 15. Hu, X. J., Li, Z. J., Cao, Y. C., Zhang, J., Gong, Y. X., & 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. https://doi.org/10.1007/s10499-010-9325-8
17. 16. Johansson, C., & Bergman, B. (2006). Reconstitution of the symbiosis of Gunnera manicata Linden: Cyanobacterial specificity. *New Phytologist*, *126*, 643–652. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02960.x
18. 17. John, D. M., & Museum, N. H. (2012). The Freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. *Choice Reviews Online*, *49*(12), 49-6880-49–6880. https://doi.org/10.5860/choice.49-6880
19. 18. Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. (2007). Review article Methods for

studying root colonization by introduced. *Agronomie*, *23*, 407–418. https://doi.org/10.1051/agro

20. 19. Kim, L.-H., Choi, E., & Stenstrom, M. K. (2003). Sediment characteristics, phosphorus types and phosphorus release rates between river and lake sediments. *Chemosphere*, *50*(1), 53–61. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00310-7
21. 20. Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, *86*(4), 295–335.
22. 21. Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, *63*, 671–678.
23. 22. Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., & Leggett, M. E. (1989). Microbially Mediated Increases in Plant-Available Phosphorus (N. C. Brady (ed.); Vol. 42, pp. 199–228). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60525-8
24. 23. Kulik, M. M. (1995). The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *101*(6), 585–599. https://doi.org/10.1007/BF01874863
25. 24. Larsson, S. E., & Toolanen, G. (1986). Posterior fusion for atlanto-axial subluxation in rheumatoid arthritis. *Spine*, *11*(6), 525–530. https://doi.org/10.1097/00007632-198607000-00004
26. 25. Mandal, B., Das, S. C., & Mandal, L. N. (1992). Effect of growth and subsequent decomposition of cyanobacteria on the transformation of phosphorus in submerged soils. *Plant and Soil*, *143*(2), 289–297. https://doi.org/10.1007/BF00007885
27. 26. Mishra, U., Choudhary, K. K., Pabbi, S., Dhar, D., & Singh, P. (2005). Influence of blue green algae and Azolla inoculation on specific soil enzymes under paddy cultivation. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, *7*, 9–12.
28. 27. Padmavathi, P., & Prasad Durga, M. K. (2007). Egular Aper. *Regular Paper*, *24*, 32–43.
29. 28. Pal, M., Yesankar, P. J., Dwivedi, A., & Qureshi, A. (2020). Biotic control of harmful algal blooms (HABs): A brief review. Journal of Environmental Management, 268(April), 110687. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110687
30. 29. Pandey, V. D., & Parveen, S. (2011). Alkaline Phosphatase Activity in Cyanobacteria : *Indian Journal of Fundamenal and Applied Life Sciences*, *1*(4), 295–303.
31. 30. Paul, D., & Sinha, S. N. (2013). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Advances in Applied Science Research*, *4*(4), 409–412.
32. 31. Rai, A.N., Soderback, E & Bergman, B. (2000). Cyanobacerium- plaqnt symbioses. 147(116): 449-4.
33. 32. Rodriguez, A. A., Stella, M. M,, Zulpa, G & Zaccaro, M.C. (2006). Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerancein oryza sativa L., Saline system. 206:2-7.
34. 33. Riegman, R., & Mur, L. R. (1986). Phytoplankton growth and phosphate uptake (for P limitation) by natural phytoplankton populations from the Loosdrecht lakes (The Netherlands). *Limnology and Oceanography*, *31*(5), 983–988. https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.5.0983

35. 34. Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17(4), 319–339. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2
36. 35. Sugunan, V. (2000). Ecology and fishery management of reservoirs in India. *Hydrobiologia*, *430*, 121–147. https://doi.org/10.1023/A:1004081316185
37. 36. Whitton, B. A., Grainger, S. L., Hawley, G. R., & Simon, J. W. (1991). Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microbial Ecology*, *21*(1), 85–98. https://doi.org/10.1007/BF02539146
38. 37. Wolf, A. M., Baker, D. E., Pionke, H. B., & Kunishi, H. M. (1985). Soil Tests for Estimating Labile, Soluble, and Algae-Available Phosphorus in Agricultural Soils. *Journal of Environmental Quality*, *14*(3), 341–348. https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq1985.00472425001400030008x
39. 38. Wilson, L. T., (2006). Cyanobacteria: A Potential Nitrogen Source in Rice Field, texas rice. 6(6): 9-10.
40. 39. Yandigeri, M. S., Yadav, A. K., Srinivasan, R., Kashyap, S., & Pabbi, S. (2011). Studies on mineral phosphate solubilization by cyanobacteria Westiellopsis and Anabaena. *Microbiology*, *80*(4), 558–565. https://doi.org/10.1134/S0026261711040229

Solubilizing efficiency of inorganic phosphate and insoluble organic phosphorus by cyanobacteria isolated from fish Culture ponds

A.Fallah Nosratabad, M. Alishiri Junaghani*, and R. Bazazzadeh

Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Education and Promotion Research Organization, Karaj, Iran**rezafayah@yahoo.com**
Ph. D Graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran **mostafaalishiri@ut.ac.ir**
Research expert, Soil and Water Research Institute, Agricultural Education and Promotion Research Organization, Karaj, Iran:**bazzazzadeh96@gmail.com**

Received: July 15, 2023 and Accepted: January 31, 2024

Abstract

Phosphorus plays a crucial role in aquatic ecosystems, serving as a vital nutrient that promotes the growth and enrichment of freshwater environments, particularly in warm-water fish ponds. It exists in various forms within aquatic systems, both soluble and insoluble. Cyanobacteria, a diverse group of oxygen-producing, photosynthetic prokaryotes, possess phosphatase activities that convert phosphorus into a soluble form. Thus, this study aimed to isolate, identify, and examine the phosphorus-dissolving capabilities of cyanobacteria found in fish culture ponds at a laboratory scale. The study evaluated the phosphorus dissolution efficiency of four cyanobacterial strains isolated from warm-water fish ponds: *Chroococcus sp*., *Oscillatoria sp*., *Microcystis sp*., and *Gloeocapsa sp*., using two phosphorus sources, tricalcium phosphate and calcium phytate, in both floating surface and biomass portions. The findings indicated that *Microcystis sp*. was particularly effective, dissolving 47.5 mg/liter of tricalcium phosphate and 67.3 mg/liter of calcium phytate in the floating portion. In the biomass, *Gloeocapsa sp*. demonstrated the highest efficiency in dissolving phosphorus from both tricalcium phosphate and calcium phytate, with concentrations of 35.5 mg/liter and 18.7 mg/liter, respectively. However, the study observed no significant difference in cyanobacterial growth under varying phosphorus concentrations and sources across the experimental groups. The research highlights that certain cyanobacteria isolated from fish culture ponds possess the capacity to dissolve phosphorus to a notable extent when provided with sufficient sources of insoluble phosphorus.

Key Words: *Calcium Phytate, Cyanobacteria, Phosphate solubilizer, Tricalcium Phosphate.*

* Corresponding author: mostafaalishiri@ut.ac.ir