جداسازی و ارزیابی فعالیت برخی از باکتریهای شاخص اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات از مزارع پرورش ماهیان گرمابی در استان مازندران

رضا صفری[۱*]، دکتر محمد رضا سعیدی اصل[۲]، زهرا یعقوب زاده[۱]

چکیده

یکی از مشکلات عمده در پرورش ماهیان گرمابی، افزایش گازهای سمی نظیر آمونیاک، نیترات و نیترات بوده که افزایش گازهای فوق باعث بیماریهای مختلف در ماهی شده و تلفات بالایی را بدنبال خواهد داشت. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی آن دسته از باکتریهای اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات می‌باشد که توانایی رشد در شرایط هوازی و بی هوازی و pH محدوده خنثی را دارند. پس از نمونه‌برداری از رسوب و آب و کشت آنها در محیط کشت نیتروزوموناس مدیوم و محیط کشت استنیر مدیوم بهینه شده و انکوباسیون در دمای C °۳۰-۲۵ به مدت ۶-۴ روز، میزان کدورت حاصله مورد ارزیابی قرار گرفته و کشت نهایی در محیطهای نیتروزوموناس مدیوم و استنیر مدیوم حاوی ۱۵٪ آگار انجام و کلنی‌های رشد یافته شناسایی شدند. برای ارزیابی میزان اکسیداسیون آمونیاک و نیترات، مقیاسهای مختلف تجزیه آمونیاک، نیتریت و نیترات (ارلن آزمایشگاهی، آکواریوم، ونیرو و استخر) در زمانهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. تاثیر pH، وجود یا عدم وجود هواده و غلظت سه فاکتور فوق بر روند اکسیداسیون نیز مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشات نشان داد که باکتریهای اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات به نامهای *سودوموناس آئروجینوزا*، *سودوموناس استوتزری*، *سودوموناس فلورسانس*، *سودوموناس سودوتوبرکلوزیس*، *نیتروزوموناس آئروپیه و نیتروباکتر وینوگرادسکی*، *نیتروزوکوکوس*، *نیتروکوکوس*، *باسیلوس لیکنی فرمیس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *آلکالی ژنز*، *اسینتو باکتر* جدا شده که توانایی رشد در pH = ۸-۷ و دمای ۲۵ تا ۳۰ را داشته و قادر به تبدیل نیترات به نیتریت و در نهایت نیتروژن بوده و فعالیت این باکتریها در بود یا نبود سیستم هواده تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد. با توجه به توانایی باکتریهای جداشده، می توان از آنها بعنوان باکتریهای پروبیونت، در کنار باکتریهای شرکت کننده در فرآیند نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون در بسته‌های پروبیوتیک استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *باکتریهای اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات، مزارع پرورش ماهیان گرمابی*

Isolation and evaluation of activation dominant ammonia, nitrite and nitrate oxidizing bacteria from warm water fish farms in Mazandaran province

Safari, R. [1*], Saeidi Asl, M.R.[2], Yaghoubzadeh, Z.[1]
1- Department of Biotechnology, Caspian Sea Ecology Research Academy, Sari, Iran (safari1351@gmail.com)*
2- Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzavar, Iran

One of the main problems in warm water fish farms is increasing of toxic gases such as ammonia, nitrite and nitrate. These gases are harmful for fish and can caused different diseases. The pararpose of this research was to isolate of nitrite, nitrate and ammonia oxidation bacteria from water and sediment that are able to growth in aerobic and anaerobic condition and neutral pH. Samplings were done from water and sediment of farms and then were cultured in Nitrosomonas medium and modified Stanier medium. Mediums were incubated in 25-30 °C for 4-6 days and then turbidity were evaluated .After plating in modified Stanier medium including 15% agar, isolated colonies were identified with biochemical tests. Oxidations of three mentioned factors were investigated in laboratory, aquarium, veniro and farm. Effects of pH and oxygen on bacterial oxidation were also examined. The results showed that some bacteria such as *Pseudomonas* sp. *Nitosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrococcus*, *Bacillus* sp. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* are able to oxidize of ammonia, nitrite and nirtate in pH of 7-8 and temperature between 25-30. It is concluded that these isolated bacteria, can be used as probiont bacteria in probiotic packages.

Key words: *Ammonia, Nitrite and Nitrate oxidizing bacteria, Warm water fish farms*

۱*- بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر، ساری، ایران safari1351@gmail.com
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

مقدمه

آبزیان از مهمترین منابع غذایی تامین کننده پروتئین بوده و امروزه صید و پرورش آنها، بعنوان یکی از فعالیتهای مهم تولیدی در اقتصاد جهانی مطرح می‌باشد. فرآورده های شیلاتی علاوه بر داشتن پروتئین، حاوی مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آمینه ضروری، انواع ویتامینها و مواد معدنی می باشند. اسیدهای چرب امگا- ۳ و امگا- ۶ موجود در آبزیان برای درمان بیماریهای مختلف از جمله بیماریهای قلبی ــ عروقی، کلیوی و بیماریهای التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱). تولید آبزیان در کشور در سال ۱۳۸۴، ۵۲۲۵۴۳ تن بوده که سهم آبزی پروری و ماهیان گرمابی به ترتیب ۱۳۴۱۶۴ و۷۳۳۹۶ تن بوده و آمار صید ماهیان گرمابی در استان مازندران ۳۰-۲۵ هزار تن می‌باشد. مساحت آب بندانها و استخرهای ماهیان گرمابی در استان مازندران در حدود ۱۷۰۰۰ هکتار بوده که در سال ۱۳۸۴، ۱۷ تا ۱۸ هزار تن از انواع ماهیان گرمابی از آن برداشت شده است (۳). یکی از مشکلات عمده آب بندانها و استخرها در پرورش ماهیان گرمابی، کمبود آب در فصل تابستان است که بدنبال آن اکسیژن محلول در آب کاهش می‌یابد و به علت تراکم نسبتاً بالای ماهیان پرورشی و فعالیت متابولیکی آنها، میزان مواد زائد و گازهای سمی از جمله آمونیاک، نیترات، نیتریت و سولفید هیدروژن زیاد می‌شود(۲). یکی از راههای کاهش گازهای سمی استفاده از پروبیوتیکها می‌باشد(۴). پروبیوتیک را بعنوان میکروارگانیسمهای تقویت کننده در نظر گرفته اند که آثار مفیدی بر میزبان داشته و این مکانیسم را با متعادل نمودن میکروفلور دستگاه گوارش انجام میدهند. مطالعات موردی که در ارتباط با استفاده از پروبیوتیک در آبزیان انجام گرفته نشان می‌دهد که باکتریها نه تنها در رشد و بقاء انواع آبزیان دخالت دارند بلکه بعنوان کنترل کننده های بیماریهای ماهی و فعال کننده تولید مجدد مواد غذایی نیز واجد اهمیت می‌باشند(۶، ۷، ۹، ۱۰ و۱۱). مقدار آمونیاک در استخرها و تانکها بایستی نزدیک به صفر باشد و وجود آن در استخر، نشان دهنده عدم تعادل در سیستم می‌باشد. آمونیاک فاقد بو و رنگ بوده و تلفات ایجاد شده را بدون آزمایش آمونیاک نمی‌توان تشخیص داد. سمیت NH_3 در پایین‌تر از ۰/۰۵ شروع شده و در غلظت ۲mg/l کشنده می‌باشد. این گاز در مقادیر پایین باعث صدمه به آبشش و استرس در ماهی می‌شود و حساسیت آن را به عفونتهای باکتریایی افزایش می‌دهد.USEPA محدوده ppm ۰/۰۲ از NH_3 را در محیطهای آب شیرین و دریا پیشنهاد می‌کند. باکتریهای طبیعی آمونیاک را تجزیه کرده که دارای سیکل ۱۴ روزه می باشند و با استفاده از پروبیوتیک می‌توان این فرآیند را تسریع داد(۱۸). راهکارهای عملی برای کاهش آمونیاک در استخر، هوادهی، کاهش pH و حذف غذادهی می باشند زیرا منبع اصلی آمونیاک از غذای ماهی است. pH و دما از عوامل موثر بر تغییرات آمونیاک می‌باشند(۱۸). نیتروژن در آب بصورت نیتریت، نیترات، آمونیاک و یون آمونیوم وجود دارد. به هنگامی که اکسیژن مورد نیاز در دسترس نباشد باکتریها از نیترات بعنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده کرده اگرچه نیترات سمیتی برای ماهی نداشته ولی نیترات اضافی در آب بعنوان اندیکاتوری از کیفیت ضعیف آب در نظر گرفته می شود. نیترات محصول نهایی نیتریفیکاسیون می باشد. نیترات تا حد بالاتر از ppm ۱۰۰، برای اکثر گونه‌ها غیر سمی می‌باشد. تجمع نیترات در حیوانات آبزی با تنظیم تغییرات آبی و استفاده از گیاهان زنده کنترل می‌شود. باکتریهای دنیتریفیکانس مسئول تبدیل نیترات به گاز نیتروژن در سیکل نیتروژن می‌باشند(۱۸). درمحیطهای دریایی، سطح قابل قبول نیتراتmg/l ۰/۱ تا ۰/۲ می‌باشد. سطح بین mg/l ۴۰-۱۰ نشان دهنده کیفیت پایین آب آکواریوم و سطح بیشتر از mg/l ۵۰ برای ماهیان برکه‌ای مضر می‌باشد(۱۱). هدف از

انجام این تحقیق جداسازی باکتریهای شاخص اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات بوده است.

مواد و روش کار

نمونه برداری از آب و رسوب در طی دوره ۳ ماهه (سال ۱۳۸۱) از ۵۱ آب بندان و استخر واقع در شهرهای ساری(۱۰ ایستگاه)، جویبار و قائمشهر (۷ ایستگاه)، بهشهر و نکاء (۷ ایستگاه)، بابل (۱۰ ایستگاه)، محمود آباد (۷ ایستگاه)، بابلسر (۵ ایستگاه) و آمل (۵ ایستگاه) انجام گرفت. تعداد نمونه های اخذ شده از هر ایستگاه در طول دوره، سه نمونه بوده و در مجموع تعداد ۳۰۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه یک نمونه واحد ، نمونه‌برداری از آب مناطق مختلف آببندان و یا استخر انجام و پس از مخلوط نمودن آنها، یک نمونه کامل مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری از رسوب نیز با استفاده از گرپ انجام گرفته و سپس به شیشه‌های ۵۰۰ میلی لیتری انتقال داده شدند. کل نمونه‌ها اخذ و در کنار زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند که به منظور جداسازی باکتریهای اکسید کننده آمونیاک، نیتریت و نیترات از محیطهای افتراقی Nitrosomonas medium و Modified stanier medium استفاده گردید. نمونه‌های آب و رسوب به محیطهای Nitrosomonas medium و Modified stanier medium حاوی عناصر کمیاب (۰/۱٪) و نوترینت براث (pH=7) اضافه شده و پس از انکوباسیون بمدت ۶-۴ روز در دمای ۳۰°c-۲۵، مورد ارزیابی قرار گرفتند. لوله‌های واجد کدورت به عنوان نمونه‌های مثبت احتمالی در نظر گرفته شده و در محیط Nitrosomonas medium و Modified stanier medium حاوی ۲۰-۱۵٪ آگار خالص، بصورت خطی کشت داده شده و مجدداً بمدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °c-۲۵ انکوبه شده و از پرگنه های مشکوک، رنگ‌آمیزی گرم تهیه گردید. پس از تعیین مشخصات میکروسکوپی باکتریهای جدا شده، با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی نظیر احیای نیترات، رشد در دما و pH های مختلف، حرکت، استفاده از اوره و رشد در حضور نمک باکتریهای شاخص جدا شدند. نمونه‌های خالص شده در گلیسرول ۲۰٪ و در دمای۲۰- درجه قرار داده شده و بعنوان استوکهای میکروبی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند(۱۸).

بررسی روند تجزیه آمونیاک نیتریت و نیترات در مقیاسهای مختلف

به منظور بررسی فرآیند تجزیه آمونیاک، نیتریت و نیترات در شرایط آزمایشگاهی، تعلیقی از باکتریهای شاخص جدا شده در محیطهای آبگوشت تهیه کرده و سپس مقدار ۵٪ از آنها به محیط پایه معدنی حاوی نیترات سدیم (۲/۵ و ۳ میلی گرم بر لیتر)، نیتریت سدیم (۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر) و کلرید آمونیوم (۰/۰۷ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر) انتقال یافته و روند تجزیه میکروبی با احتساب دو تکرار، pH های ۸/۵ و ۹ و دو سیستم (استفاده از هواده و عدم استفاده از هواده) و زمانهای صفر پنج، ده، پانزده و بیست ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲، ۱۳ و ۱۸). پس از نتیجه گیری در مرحله آزمایشگاهی، آکواریوم‌هایی با حجم کوچک ساخته شده و پس از اضافه کردن ۵ لیتر از آب استخر به آکواریوم و اندازه‌گیری عوامل شیمیایی در آب ریخته شده، نیترات سدیم به مقدار ۳، نیتریت سدیم به مقدار ۰/۲ و کلرید آمونیوم به مقدار ۰/۱ میلی گرم در لیتر به آکواریوم اضافه شده و در قالب دو سیستم استفاده از هواده و عدم استفاده از هواده، تیمارهای دو باکتری با همان فرمولاسیون ارائه شده در ارلن های حاوی محیط کشت، اضافه شده و در زمانهای صفر، پنج، ده، پانزده و بیست مورد آزمایش قرار گرفتند.در مرحله سوم، ابتدا ونیرویی به مساحت m^2 ۱/۵×۲ و ارتفاع ۱ متر

انتخاب شده و پس از اضافه نمودن آب استخر و سه گونه از ماهیان گرمابی (فیتوفاگ، آمور و کپور با نسبتهای تعریف شده) به آن، غذادهی بصورت معمول و با هوادهی خفیف انجام گرفته و ونیرو در هوای آزاد به مدت ۴ روز قرار داده شد تا میزان آمونیاک، نیتریت و نیترات افزایش یابد. اندازه گیری pH و دما بصورت روزانه ولی غلظت آمونیاک، نیتریت و نیترات در روز چهارم اندازه‌گیری گردید. در روز چهارم، مخلوطی از دو باکتری جدا شده ، بصورت سوسپانسیون‌های غلیظ و همچنین در رقتهای مختلف به ونیرو اضافه شده و پس از تزریق، میزان آمونیاک، نیتریت و نیترات در زمان‌های مختلف مجدداً اندازه‌گیری شد. پس از انجام آزمایش در ونیرو، مساحت مشخصی از استخرخاکی را محصور کرده ($۱۰\times۱۰m^2$) و تعداد ماهیان گرمابی در منطقه مورد نظر را افزایش داده تا میزان آمونیاک، نیتریت و نیترات در زمان کوتاهی افزایش یابد. نمونه برداری در روز دوم انجام گرفته و پس از مشخص شدن افزایش نسبی پارامتر مذکور، از تعلیق میکروبی استفاده گردید. سوسپانسیون میکروبی در حجمهای ۲۰۰ میلی‌لیتری تهیه و قسمتی از آن به صورت اسپری در کنارهای آب بندان پخش شده و قسمت دیگر نیز از طریق لوله‌های پلیکا به زیر استخر تزریق گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور ترسیم جداول و نمودارها از نرم افزار Excel و جهت تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS و تستهای Duncan و LSD به منظور ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها و از تست ANOVA یکطرفه و دوطرفه و تست T به منظور بررسی تغییرات معنی‌دار مابین تیمارهای مختلف استفاده گردید.

نتایج

نتایج آنالیز آزمایشگاهی نشان داد که بدنبال استفاده از محیط کشتهای متفاوت و استفاده از مواد افزودنی و ترکیبات شیمیایی مختلف به منظور تامین منبع انرژی، کربن و نیتروژن، باکتریهای مختلفی جدا شده که مهمترین آنها شامل: *سودوموناس آئروجینوزا (Pseudomonas aeroginosa)*، *سودوموناس استوتزری (Pseudomonas stutzeri)*، *سودوموناس فلورسانس (Pseudomonas fluorescence)*، *سودوموناس سودوتوبرکلوزیس (Pseudomonas psuedotuberculosis)*، *نیتروزوموناس آئروپیه (Nitosomonas europaea)* و *نیترو باکتر وینوگرادسکی (Nitobacter winogradskyi)*، *نیتروزوکوکوس (Nitrosococcus)*، *نیتروکوکوس (Nitrococcus)*، *باسیلوس لیکنی فرمیس (Bacillus licheniformis)*، *باسیلوس سوبتیلیس (Bacillus subtilis)*، *آلکالی ژنز (Alcaligenes)* و *اسینتو باکتر(Acinetobacter)* جدا گردید.

نتایج آزمایشات انجام شده در فاز آزمایشگاهی (محیط کشت): نتایج آزمایشات تجزیه میکروبی آمونیاک و نیترات در محیط کشت آزمایشگاهی و با احتساب تیمارهای مختلف در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین نیترات سدیم، نیتریت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور باکتریهای جدا شده از مزارع ماهیان گرمابی در دو pH (۸/۵ و ۹) از زمان ۰ تا ۲۰ ساعت درمقیاس آزمایشگاهی (توسط هواده)

پارامتر	غلظت (ppm)	pH	زمان(ساعت)				
			صفر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
نیترات سدیم	۲/۵	۸/۵	۲/۵	۱/۲۴	۱/۲	۰/۸۱	۰/۵۲
		۹	۲/۵	۱/۳۵	۱/۳۷	۱/۰۷	۰/۹۳
	۳	۸/۵	۳	۲/۶۳	۲/۲۳	۱/۶۵	۱/۰۶
		۹	۳	۲/۵	۲/۴	۱/۳۴	۱/۲۱
نیتریت سدیم	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۱۷	۰/۱۴
		۹	۰/۱	۰/۱۳	۰/۱۹	۰/۱۶	۰/۱۱
	۰/۲	۸/۵	۰/۲	۰/۲۴	۰/۳	۰/۳۲	۰/۲۴
		۹	۰/۲	۰/۲۱	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۲
کلرید آمونیوم	۰/۰۷	۸/۵	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۲
		۹	۰/۰۷	۰/۰۴۵	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۱
	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۰۸۵	۰/۰۷۷	۰/۰۲۵
		۹	۰/۱	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۸۵	۰/۰۵۴

جدول ۲- میانگین نیترات سدیم، نیتریت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور باکتریهای جدا شده از مزارع ماهیان گرمابی در دو pH (۸/۵ و ۹) از زمان ۰ تا ۲۰ ساعت در مقیاس آزمایشگاهی (بدون هواده)

پارامتر	غلظت (ppm)	pH	زمان(ساعت)				
			صفر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
نیترات سدیم	۲/۵	۸/۵	۲/۵	۱/۰۲	۰/۸۵	۰/۲۵	۰/۰۹۱
		۹	۲/۵	۱/۱۱	۰/۰۱	۰/۹۵	۰/۲۵
	۳	۸/۵	۳	۲/۳۲	۲/۳	۱/۵۶	۱/۰۴
		۹	۳	۲/۵	۲/۳۵	۱/۹۵	۱/۴۳
نیتریت سدیم	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱۲	۰/۰۸	۰/۰۳۵	۰/۰۳۵
		۹	۰/۱	۰/۱۳	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۲۹
	۰/۲	۸/۵	۰/۲	۰/۱۸	۰/۰۹	۰/۰۸۷	۰/۰۴۶
		۹	۰/۲	۰/۱۷	۰/۰۸۳	۰/۰۵۳	۰/۰۴۴
کلرید آمونیوم	۰/۰۷	۸/۵	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۴
		۹	۰/۰۷	۰/۰۶۵	۰/۰۶۳	۰/۰۵۱	۰/۰۵۱
	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۰۹۱	۰/۰۸۵	۰/۰۷۷	۰/۰۶۳
		۹	۰/۱	۰/۰۹۳	۰/۰۸۱	۰/۰۵۲	۰/۰۳۲

نتایج آزمایشات انجام شده در آکواریوم، ونیرو و استخر پرورش ماهی به هنگام استفاده از مخلوط باکتریهای جدا شده در آکواریوم مشخص نمود که به هنگام استفاده از سیستم هواده، غلظت نیترات سدیم، نیتریت سدیم وکلرید آمونیوم از۳، ۰/۲ و۰/۱ به ۱/۹۳، ۰/۱۶ و ۰/۰۴۲ میلی‌گرم بـر لیتـر و در غیاب سیستم هواده از ۳، ۰/۲ و۰/۱ به ۱/۱۱ ، ۰/۱۸ و۰/۰۸۳ میلـی‌گـرم بـر لیتـر کاهش یافته است (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین نیترات سدیم، نیتریت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور باکتریهای جدا شده از مزارع ماهیان گرمابی در دو pH (۸/۵ و ۹) از زمان ۰ تا ۲۰ ساعت در مقیاس آکواریوم

پارامتر	پمپ هواده	زمان(ساعت)				
		صفر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
نیترات سدیم	+	۳/۶۷	۳/۲۵	۲/۳۶	۲/۰۴	۱/۹۳
نیتریت سدیم	+	۰/۲۷	۰/۴۳	۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۱۶
کلرید آمونیوم	+	۰/۱۶	۰/۱۳	۰/۰۹۲	۰/۰۸۳	۰/۰۴۲
نیترات سدیم	-	۳/۵۶	۳/۰۴	۲/۵۳	۱/۴۳	۱/۱۱
نیتریت سدیم	-	۰/۳۲	۰/۴۶	۰/۳۸	۰/۲۷	۰/۱۸
کلرید آمونیوم	-	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۰۹۶	۰/۰۸۳

قبل از استفاده از تیمارهای باکتریایی در ونیرو و استخر، ابتدا میزان pH و دما و همچنین غلظت نیترات سدیم ،نیتریت سدیم وکلرید آمونیوم در چهار روز اول اندازه‌گیری شده که میزان pH از ۷/۱ تا ۹ ودما از ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نوسان بوده و غلظت نیترات سدیم ،نیتریت سدیم وکلرید آمونیوم ۴، ۰/۲۵۴ و۱ میلی‌گرم بر لیتر بوده که این زمان بعنوان زمان صفر در نظر گرفته شده و پس از آن باکتریهای جدا شده اضافه گردید. غلظت فاکتور ذکر شده پس از بیست ساعت به ترتیب به ۲/۰۴، ۰/۱۷۲ و ۰/۶۵ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت(جدول ۴). نتایج استفاده از فرمولهای میکروبی در استخر پرورش ماهیان گرمابی نشان داد که غلظت نیترات سدیم، نیتریت سدیم وکلرید آمونیوم از ۲/۵، ۰/۲۱و۰/۹۳ (در روز دوم که بعنوان زمان صفر تلقی گردید) به ۱/۲۳، ۰/۱۱۲ و۰/۰۹۲ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافته و تغییرات دما و pH نیز بین ۲۳ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۶/۸ تا ۸/۲ در نوسان بود (جدول ۴). در جدول ۵ به درصد کاهش فاکتورهای شیمیایی مورد استفاده و معنی‌دار بودن کاهش آنها اشاره شده است.

جدول۴- میانگین نیترات سدیم ، نیتریت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور باکتریهای جدا شده از مزارع ماهیان گرمابی در دو pH (۸/۵ و ۹) از زمان صفر تا ۲۰ ساعت در مقیاس ونیرو و استخر دارای ماهی

پارامتر	پمپ هواده	مقیاس	زمان(ساعت)				
			صفر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
نیترات سدیم	+	ونیرو	۴	۳/۶۵	۳/۷۲	۲/۹۶	۲/۰۴
نیتریت سدیم	+	ونیرو	۰/۲۵۴	۰/۳۱۵	۰/۲۶۳	۰/۱۹۱	۰/۱۷۲
کلرید آمونیوم	+	ونیرو	۱	۰/۹۳	۰/۸۲	۰/۷۶	۰/۶۵
نیترات سدیم	+	استخر	۲/۵	۲/۰۱	۲/۱	۱/۶۷	۱/۲۳
نیتریت سدیم	+	استخر	۰/۲۱	۲/۲۶۵	۰/۲۲۳	۰/۱۶۱	۰/۱۱۲
کلرید آمونیوم	+	استخر	۰/۹۳	۰/۸۲	۰/۶۳	۰/۲۳	۰/۰۹۲

جدول۵- تغییرات نیترات ، نیتریت و آمونیوم در حضور باکتریهای جدا شده از مزارع ماهیان گرمابی در زمان صفر و ۲۰ ساعت در آکواریوم ، ونیرو و استخر(در حضور و غیاب هواده)

پارامتر	اکسیژن	مقیاس	صفر	۲۰ساعت	کاهش٪	P value
نیترات	+	آکواریوم	۳	۱/۹۳	٪۳۵/۶	p>۰/۰۵
نیتریت	+	آکواریوم	۰/۲	۰/۱۶	٪۲۰	p>۰/۰۵
کلرید آمونیوم	+	آکواریوم	۰/۱	۰/۰۴۲	٪۵۸	p>۰/۰۵
نیترات	-	آکواریوم	۳	۱/۱۱	٪۶۳	p>۰/۰۵
نیتریت	-	آکواریوم	۰/۲	۰/۱۸	٪۱۰	p>۰/۰۵
کلرید آمونیوم	-	آکواریوم	۰/۱	۰/۰۸۳	٪۱۷	p>۰/۰۵
نیترات	+	ونیرو	۴	۲/۰۴	٪۴۹	p>۰/۰۵
نیتریت	+	ونیرو	۰/۲۵۴	۰/۱۷۲	٪۳۲/۲۸	p>۰/۰۵
کلرید آمونیوم	+	ونیرو	۱	۰/۶۵	٪۳۵	p>۰/۰۵
نیترات	-	استخر	۲/۵	۱/۲۳	٪۵۰/۸۰	p>۰/۰۵
نیتریت	-	استخر	۰/۲۱	۰/۱۱۲	٪۴۰/۶۰	p>۰/۰۵
کلرید آمونیوم	-	استخر	۰/۹۳	۰/۰۹۲	٪۹۰/۱۰	p>۰/۰۵

بحث

به هنگام افزایش آمونیاک، نیتریت، سولفید هیدروژن، متان در محیطهای آبی، میکروارگانیسم‌های موجود قادر به کاهش آنها در کوتاه مدت نبوده و از طرفی تکثیر میکروارگانیسم‌های هتروتروف تجزیه کننده مواد آلی، باعث افزایش BOD و کاهش DO شده و متعاقب آن، شرایط بی هوازی و کمبود اکسیژن به وجود می آید که دارای اثرات سوء بر آبزیان مختلف می‌باشد. به منظور تقویت میکروارگانیسم‌های طبیعی استخر، از باکتریهای مفید تحت عنوان پروبیوتیک استفاده شده که این میکروبها باعث افزایش تجزیه مواد آلی، کاهش غلظت نیتروژن و فسفر، متعادل نمودن رشد جلبکها، افزایش اکسیژن محلول، کاهش سیانوباکتریها، کنترل آمونیاک، نیتریت، H_2S، کاهش شیوع بیماری و افزایش بقاء و در نتیجه افزایش تولید می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه اکولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشمندان را قادر ساخته که در ارتباط با ترکیب جمعیت مورد استفاده، فعالیت جمعیتهای مختلف باکتریایی در اکوسیستم‌های آبی، بهینه سازی آب در مناطق بزرگ و وسیع، افزایش جمعیت گونه‌های خاص باکتریایی و فعالیتهای بیوشیمیایی آنها مطالعات مختلفی را انجام دهند. روشهای غیر بیولوژیک نظیر استفاده از مواد شیمیایی نظیر ازن، کلر، عوامل اکسید کننده و شلاته کننده (غیر فعال کننده) و روشهای فیزیکی مانند فیلتراسیون، هوادهی و گرما دارای محاسن و معایب متفاوتی بوده ولی استفاده از پروبیوتیک‌ها به لحاظ ارزان و ساده بودن تکنیک مورد استفاده و عدم وجود عوارض و خطرات احتمالی مفید و موثر می‌باشد(۸ و۱۰). در استفاده از میکروارگانیسمها به منظور کاهش آلاینده‌های مختلف از جمله آمونیاک و نیتریت بایستی به عوامل مختلف از جمله نوع میکروارگانیسم، دوز و روش مورد استفاده، دما، pH، سیستم هواده و ... توجه نمود، زیرا فاکتورهای ذکر شده جزء فاکتورهایی هستند که در ارتباط مستقیم با افزایش و یا کاهش واکنش‌های تجزیه‌ای هستند. در این تحقیق فاکتورهای مذکور به نوعی در مراحل مختلف دخالت داده شده‌اند که در ذیل به آن اشاره می‌گردد. نوع باکتری: در این تحقیق از گونه‌های مختلف مثل *سودوموناس*

آئروجینوزا، *سودوموناس استوتزری*، *نیتروزوموناس*، *باسیلوس لیکنی فرمیس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *آلکالی‌ژنز* استفاده گردید. در فرآیند نیتریفیکاسیون آمونیاک از طریق *نیتروزوموناس* و *آرتروباکتر آژیلیس* به نیتریت تبدیل می‌گردد. علاوه بر *نیتروزوموناس*، برخی از باکتریها نظیر سوشهای خاصی از باسیلوس قادر به انجام این واکنش بوده و در برخی از بسته‌های پروبیوتیک بجای *نیتروزوموناس* از این سویه‌ها استفاده می‌گردد. نیتریت تولید شده در نیتریفیکاسیون یا به نیترات تبدیل شده و یا آنکه توسط برخی دیگر از باکتریها مستقیماً به N2 تبدیل می‌گردد. در بسته‌های تجارتی Alken Murray، Aquatron، Epicin از گونه‌های مختلف نظیر سودوموناس، باکتریهای اکسیدکننده آمونیاک و نیتریت استفاده می‌گردد (۸ و ۱۹). دوز و روش مورد استفاده: غلظت مورد استفاده باکتریها، بستگی به هدف مورد نظر و نوع فرآیند متفاوت می‌باشد. دوز مورد استفاده باکتریها در اکثر مطالعات مربوط به تجزیه بیولوژیک معادل ۳ مک فارلند (ضریبی از 10^8) بوده که بمقدار ۵٪ به محیط پایه اضافه می‌گردد. در اکثر بسته‌های پروبیوتیک نظیر پروبیوتیک Alken-Murray از دوزهای فوق استفاده میگردد (۸ و۱۹). باکتریهایی که در این غلظت مورد استفاده قرار می‌گیرند اولاً دارای تعداد مشابه باکتریهای طبیعی استخر پرورش ماهی بوده ثانیاً فاقد عوارض جانبی و بیماریزایی برای آبزیان بوده و ثالثاً رشد و تکثیر باکتریهای مفید را تقویت کرده و باعث بهینه نمودن محیط استخر میگردند(۱۴، ۱۵ و ۱۷). در این مطالعه دوز مورد استفاده برای باکتریهای جدا شده معادل ۳ مک فارلند و بمقدار ۵٪ بوده است. به هنگام استفاده از این باکتریها در مزارع پرورشی از روشهای متفاوت نظیر استفاده مستقیم از باکتریها و اسپری به آب (بیشتر برای ماهیان گرمابی)، تزریق به عمق استخر، اضافه نمودن دوز مشخصی از باکتریها به غذای مورد استفاده ماهیان (بیشتر برای ماهیان سردآبی و میگو) بهره گرفته میشود(۴ و۱۷). در این تحقیق، باکتریهای شاخص به شکل تازه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از محققین گزارش کرد که استفاده از سویه *Vibrio alginolyticus* بشکل تازه و لیوفیلیزه باعث کاهش باکتریهای بیماریزا نظیر *V.ordalii*، *V.anguillarum*، *A.salmonicida* و *Y.rucker* می‌گردد(۵). در مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر مشخص گردید که سلولهای لیوفیلیزه، تازه و رقیق شده با سرم فیزیولوژی باسیلوس S_{11} ، دارای اثرات مشابه بر رشد و بقای میگو بوده و فاکتورهای کیفی آب نظیر اکسیژن محلول، pH، آمونیاک، نیترات، نیتریت و فسفر را به ترتیب در حد۶mg/l-۵، ۸/۲-۷/۹، ۰/۵mg/l-۰، ۱/۲ mg/l-۰، ۲/۵ mg/l-۰ و ۳ mg/l-۲ نگه داشته است(۱۷). در این تحقیق، از باکتریها به دو روش اسپری در سطح استخر و تزریق سوسپانسیون میکروبی به عمق استخر استفاده گردید. روش اول برای تسریع فرآیند هوازی و از روش دوم برای مهیا نمودن شرایط بیهوازی برای باکتریهای بیهوازی اختیاری بود. باکتریهای مورد استفاده هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بیهوازی قادر به تجزیه نیترات، نیتریت وآمونیاک می‌باشند. در مطالعه دیگری گزارش شد که به هنگامی که باکتریهای فتوسنتتیک نظیر *رودوموناس* به آب مزرعه پرورش ماهی اضافه گردد باعث حذف آمونیاک، H_2S، اسیدهای آلی و سایر مواد مضر شده و کیفیت آب را افزایش داده و به متعادل نمودن pH کمک می‌کنند(۸)

برای مهیا نمودن شرایط رشد باکتری نیاز به فاکتورهای مختلف نظیر دما و pH می‌باشد. باکتریها (بسته به جنس و گونه) در دامنه وسیعی از دما و pH قادر به رشد و تکثیر بوده ولی هر باکتری دارای اپتیمم دما و pH رشد می‌باشد. pH اپتیمم برای رشد اکثر گونه‌های این گروه ۲ تا ۳ می‌باشد. باکتریهای جدا شده اولاً قادر به رشد در pH های

بالاتر بوده (۶ تا ۹)، ثانیاً باعث تقویت رشد باکتریهای نیتریفیه کننده شده و ثالثاً در فرآیند دنیتریفیکاسیون دخالت داشته رابعاً در شرایط هوازی و بیهوازی قادر به رشد می‌باشند (۸، ۱۶ و۱۹). هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین pH های مورد استفاده در سایر موارد مشاهده نشده است.

باکتریها بر اساس نیاز به اکسیژن به گروههای مختلفی تقسیم بندی شده اند که می‌توان به هوازی اجباری، هوازی اختیاری، بیهوازی اختیاری، بیهوازی اجباری و ... اشاره نمود. در انتخاب باکتریهای تجزیه کننده بایستی دقت نمود و بیشتر از باکتریهایی استفاده کرد که در شرایط بیهوازی اختیاری قادر به فعالیت باشند. به منظور اکسیداسیون آمونیاک ونیترات در شرایط آزمایشگاهی، از دو سیستم هواده و عدم استفاده از هواده بهره گرفته شد. نتایج نشان داد که هرچند میزان تجزیه در شرایط هوازی بهتر انجام گرفته ولی با این وجود نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از آن است که روند تجزیه در هر دو سیستم، فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است. این امر بدلیل توانایی رشد باکتریهای جدا شده در حالتهای هوازی و بیهوازی می‌باشد.

تغییرات میزان آمونیاک ونیترات در آکواریوم، ونیرو و استخر معنی‌دار نبوده و علت آن نیز پراکنش باکتریهای هوازی و بیهوازی اختیاری بوده که جزء فلور نرمال آب بوده و در هر دو حالت هوازی و بیهوازی دارای فعالیت می‌باشند. در این تحقیق از چهار سیستم محیط کشت آزمایشگاهی، آکواریوم، ونیرو و استخر استفاده شده است. در هریک از این سیستمها از تیمارهای مختلفی استفاده شده است. بدنبال استفاده از محیط کشت آزمایشگاهی، فاکتورهای شیمیایی بصورت املاح معدنی به محیط اضافه شده و در زمانهای مختلف از نظر تجزیه میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به لحاظ کنترل عوامل مختلف در محیط کشت و به حداقل رساندن عوامل مهارکننده رشد باکتری، می‌توان پیش‌بینی نمود که باکتری با گذشت زمان قادر به کاهش املاح معدنی اضافه شده گردد(۸ و۱۰). تغییرات کلی فاکتورهای مورد بررسی در فاز آزمایشگاهی دارای اختلاف معنی‌دار بوده است($P<۰/۰۰۱$).

در تهیه تیمارهای مختلف در آکواریوم، از آب استخر استفاده شده و املاح معدنی آمونیاک، نیترات ونیتریت با غلظت مشخص به آن اضافه گردید. نتایج نشان داد که فاکتورهای اضافه شده، کاهش داشته ومیزان کاهش در شرایط هوازی بیشتر مشاهده می‌گردد. که باکتریهای اکسید کننده در حضور باکتریهای طبیعی استخر قادر به کاهش گازهای سمی بوده و بعبارت دیگر هیچگونه اثر آنتاگونیسمی بر علیه یکدیگر نشان نمی‌دهند. در استفاده از تلقیح میکروبی در ونیرو و استخر خاکی، به لحاظ دخالت عوامل زیستی (ماهی، فون بنتیک و پلانکتونها) و غیر زیستی (دما، pH، میزان در دسترس بودن مواد غذایی)، شرایط متفاوت بوده و باکتریها با گذشت زمان و بدست آوردن سوبسترای مورد نظر به رشد لگاریتمی رسیده و اثر تجزیه کنندگی خود را نشان می‌دهند(۸، ۱۳ و ۱۹) نتیجه‌گیری که از این تحقیق حاصل میشود آنست که با استفاده از باکتریهای جدا شده در این تحقیق و سایر مواد افزودنی، املاح معدنی و مواد نگهدارنده می‌توان بسته‌های پروبیوتیک طراحی کرده و با دستورالعمل‌های خاصی در مزارع پرورش ماهیان گرمابی مورد استفاده قرار داد. البته بایستی خاطر نشان نمود که برخی از ویژگیهای باکتریهای جدا شده از جمله خواص ضد میکروبی آنها نیز بایستی مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

از همکاری‌های ارزشمند جناب آقای دکتر رضوانی ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران، آقایان دکتر پورغلام و دکتر غرقی روسای سابق بخش بیوتکنولوی موسسه، ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

جناب آقای دکتر رستمی، معاونت محترم تحقیقاتی، جناب آقای مهندس علی سلمانی و کلیه همکاران به جهت راهنمائیهای لازم در کلیه مراحل پروژه تشکر و قدردانی می شود. از پرسنل محترم بخش بیوتکنولوژی و تکثیر و پرورش که در مراحل اجرای پروژه اعم از نمونه‌برداری و انجام آزمایشات، همکاری صمیمانه داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

۱. غرقی. ا (۱۳۸۰): کاربرد پروبیوتیک‌ها در تغذیه انسان، دام و آبزیان پرورشی، موسسه تحقیقات شیلات ایران، بخش بیوتکنولوژی.

۲. فضلی. ح (۱۳۸۱): بهینه سازی آب بندانهای استان مازندران، مدیریت و برنامه ریزی استان مازندران.

۳. گروه آمار دفتر طرح وتوسعه شیلات ایران (۱۳۸۳): سالنامه آماری شیلات ایران، دفتر طرح وتوسعه شیلات ایران.

4. Ashraf, A., (2000): Probiotics in fish farming evaluation of a condidate bacterial mixture. Ph.D thesis.Vattenbruk sinstitutionen. Slu, 901 83 Umca. Pp: 1-18.
5. Austin, B. and Brunt, J. (1995): A probiotic strain of vibrio alginolyticus effective in reducing diseases caused by Aeromonas salmonicide, vibrio anguillarum and vibrio ordalii.J. Fish. Dis. 18: 93-96.
6. Fuller, R., (1992): History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), Exrlich Karl F., 1995. Biology filtration and aquaculture health maintenance. File: III A\1 Biological filtration part 20.
7. Fuller, R., (1992): Problems and prospects. In: Fuller, R. (Ed.), probiotics. The scientific basis. Chapman & Hall. London, UK. Pp: 377-386.
8. Gatesoupe, F.J. (1999): The use of probiotics in aquaculture: a review. Aquaculture. 180: 147-165.
9. Hamnes, W.P. and Weiss, R. (1992): The genera lactobacillus and cornobacterium. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Vol. II. Springer. New York. Pp: 1536-1594.
10. Holzapfel, W.H. and Schillinger. U. (2002): Introduction to per – and probiotics. Food Res. Int. 35:109-116.
11. Klaenhammer, T.R. and Kullen, M.J. (1999): Selection and design of probiotics. Int. J. food Microbiol. 50: 45-58.
12. Maeda, M. and Hiragama, K. (1997): The role of microorganisms in aquaculture ponds. Research International. 35: 109-116.
13. Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M. and Hiragama, K. (1997): The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia. 358: 285-290.
14. Montes, A.J. and Pugh, D.E. (1993): The use of probiotics in food – animal practice. Vet. Med. 88: 282-288.
15. Moriarty, D.J.W. (1997): The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture. 151: 333- 349.
16. Naida, A.S. and Clemens, R.A. (2000): Probiotics. CRC press. Pp: 432-457.
17. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyativatitivorakul, S. and Menasveta, P. (2000): Immunity enhancement in black tiger shrimp (Penacus monodon) by a probiont bacterium (Bacillus spp.). Aquaculture. 191: 271-288.
18. Sadowsky, M. (1999): Biofilter microbes, final project (Report, University of Minnesoata Contract Number 417121).
19. Verstraete, W. (2000): Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Am. Soc. Microbiol. Vol .64, No.4. Pp: 655-671.