Archive of SID

جداسازی و شناسایی سویه‌های برتر باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد بومی مزارع پرورش ماهیان گرمابی نواحی مرکزی استان مازندران

رعنا دشت بین، نعمت الله محمودی[1] و حسین بشارتی کلایه

دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس؛ rana.dashtbin70@gmail.com

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

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ besharati1350@yahoo.com

دریافت: 98/7/7 پذیرش: 99/2/15

چکیده

تحقیق حاضر با هدف جداسازی سویه‌های برتر باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد بومی مزارع پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران برای حذف سولفید هیدروژن انجام شد. پس از نمونه‌برداری از رسوبات و آب بین رسوب مزارع پرورش ماهیان در شهرستان‌های فریدون‌کنار، بابل، بابلسر و ساری، اقدام به غنی‌سازی برای افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مورد نظر در سه محیط کشت مایع استارکی، پستگیت و H-3 گردید، پس از جداسازی بر اساس تفاوت‌های ریخت شناسی (در محیط‌های کشت جامد فوق)، 27 جدایه (14 جدایه اتوتروف و 13 جدایه هتروتروف) خالص‌سازی گردید، سپس غربالگری اولیه بر اساس کاهش pH در محیط کشت مایع استارکی انجام شد که از این میان 6 جدایه کارآمدتر انتخاب شدند. به منظور ارزیابی دقیق‌تر توانایی اکسایش گوگرد 6 جدایه، میزان مصرف تیوسولفات، میزان تولید یون سولفات و نیز تراکم باکتری‌ها در محیط کشت مایع استارکی بررسی گردید. از بین 6 جدایه، جدایه‌های FH-13، FH-21 و FH-14 توانایی بیشتری در اکسیداسیون یون تیوسولفات (4053/79، 3104/5 و 278/97 میلی‌گرم بر لیتر در مدت 14 روز) و تولید یون سولفات (2240، 965 و 490 میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت مایع را داشتند. شناسایی مولکولی این جدایه‌ها نیز با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. نتایج نشان داد که هر سه جدایه FH-14، FH-13 و FH-21 به ترتیب 99/70، 100 و 99/80 درصد با سویه *Thiobacillus thioparus* HM173634 شباهت تبارزایی داشتند. بر اساس نتایج این پژوهش، از این سویه‌ها می‌توان به‌عنوان سویه‌های موثر اکسید کننده گوگرد در فرآیند زیست پالایی به منظور حذف سولفید هیدروژن در مزارع پرورش ماهیان گرمابی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پرورش ماهیان گرمابی، سولفید هیدروژن، باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد، اکسیداسیون گوگرد، *Thiobacillus thioparus*

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: نور، دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه شیلات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در مقایسه با محیط‌های طبیعی، مقدار ماده آلی استخرهای پرورش آبزیان به علت ورود مواد غذایی، مدفوع، کود و غیره بیش‌تر است (ابراهم و همکاران، 2004). افزایش مواد آلی در استخرها سبب ایجاد شرایط بی‌هوازی در رسوب و لایه‌های پایینی آب می‌گردد (بهرا و همکاران، 2014a). در این شرایط ترکیبات سمی نظیر سولفید هیدروژن (H_2S)، توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوآها و غیره تولید می‌شود (ابراهم و همکاران، 2004). افزایش تولید سولفید هیدروژن در استخرهای پرورش آبزیان سبب ایجاد مشکلاتی نظیر مرگ و میر دست جمعی ماهیان (لاهاو و همکاران، 2004؛ پلتون و همکاران، 2002)، کاهش رشد ماهی (پیلاری، 2008)، بوی نامطبوع (پلتون و همکاران، 2002) و افزایش نرخ مصرف اکسیژن (کنگ و همکاران، 2016) می‌گردد. از مهم‌ترین عوارض سولفید هیدروژن بر فیزیولوژی ماهی می‌توان به کاهش فعالیت سیتوکروم اکسیداز C، مهار سیستم انتقال الکترون و تنفس هوازی اشاره کرد که در نهایت سبب افزایش لاکتات خون و هیپوکسی بافت می‌گردد (آفانسو و همکاران، 2004).

معمولاً برای کنترل میزان سولفید هیدروژن در استخرهای پرورش آبزیان از فرایندهای فیزیکوشیمیایی شامل هوادهی، تعویض آب، آهک پاشی و اکسیداسیون شیمیایی (به عنوان مثال هیدروکسید آهن) استفاده می‌شود (بوید و توکر، 2012). از جمله معایب این روش‌ها می‌توان به کارایی کم، تلفات ناگهانی ماهیان، هزینه‌های زیاد انرژی، تولید آلودگی‌های ثانویه و نیاز به مواد شیمیایی گران قیمت اشاره نمود (لاهاو و همکاران، 2004؛ زائو و همکاران، 2016؛ ژنگ و همکاران، 2008). با توجه به این مشکلات، استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای حذف سولفید هیدروژن از استخرهای پرورش آبزیان می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی پایدار، موثر، کم هزینه و دوستدار محیط زیست حائز اهمیت باشد (کریشنانی و همکاران، 2010a؛ زائو و همکاران، 2016). بیش‌تر میکروارگانیسم‌هایی که برای حذف سولفید هیدروژن به کار برده شده‌اند، عمدتا شیمیوتروف بوده و در محیط‌های کشت حاوی ترکیبات سولفیدی همچون سولفید هیدروژن و تیوسولفات رشد می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها انرژی لازم برای رشد را از اکسیداسیون ترکیبات سولفیدی به دست می‌آورند (مجرد مغانلو و همکاران، 1392).

مطالعات زیادی به نقش مهم میکروارگانیسم‌های اکسید کننده گوگرد در چرخه گوگرد اکوسیستم آبی شامل مانگرو (بهرا و همکاران، 2014a؛ بهرا و همکاران، 2014b؛ بهرا همکاران، 2016)، دریاچه‌ها (هولمر و استورخولم، 2001)، اشاره داشتند. در سال‌های اخیر، مطالعات در زمینه نقش باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد در بهبود خاک‌های قلیایی و حلالیت مواد مغذی عمدتاً در حوزه گیاهان زراعی (بشارتی، 2017؛ بشارتی و همکاران، 1395) بوده است. همچنین استفاده از باکتری اکسیدکننده گوگرد برای حذف سولفید هیدروژن از پساب کارخانه‌های صنعتی نیز بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است (میرزایی و همکاران، 2014؛ مجرد مغانلو و همکاران، 1392). اما با وجود مزیت‌های باکتری‌های اکسید کننده گوگرد، مطالعات بسیار کمی در مورد شناسایی و استفاده از این باکتری‌ها به منظور حذف سولفید هیدروژن از استخرهای پرورش ماهیان گرمابی انجام شده است (کریشنانی و همکاران، 2010a؛ رانجیبت کومار و همکاران، 2018). با توجه به لزوم استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی به منظور حفاظت از محیط زیست، استفاده از گونه‌ها و سویه‌های بومی[1] به دلیل رقابت پذیری بالا و امکان سازگاری با شرایط اقلیمی بسیار لازم و ضروری است. بنابراین هدف از این مطالعه، غنی‌سازی، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد از استخرهای پرورشی ماهیان کپور استان مازندران به منظور حذف سولفید هیدروژن می‌باشد.

مواد و روش

نمونه برداری

نمونه برداری از عمق 10-0 سانتی‌متری رسوبات شش مزرعه پرورشی ماهی کپور در نواحی مرکزی استان مازندران در مرداد ماه 1397 انجام شد. مشخصات جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری در جدول 1 آورده شده است. برای تهیه یک نمونه واحد، نمونه‌برداری از سه نقطه نزدیک ورودی، خروجی و مرکز مزرعه با استفاده از نمونه‌بردار گرب ون وین[2] (Hydro-Bios، آلمان) انجام و سپس کاملاً مخلوط شدند. نمونه‌های رسوبات به همراه آب بین رسوب در درون ظروف نمونه‌گیری و استریل در مجاورت یخ به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی تربیت مدرس منتقل شد و طی 24 ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

1. Endemic strains
2. Van Veen Grab Sampler

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- مشخصات جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری

ردیف	شماره نمونه	منطقه	مختصات جغرافیایی	
			عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
1	S1	روستای فرم- فریدون‌کنار	36.619253°	52.539321°
2	S2	روستای حیدرکلا- فریدون‌کنار	36.617834°	52.547728°
3	S3	روستای میرود پشت- بابل	36.476814°	52.704267°
4	S4	روستای موسی کلا- ساری	36.555520°	52.754846°
5	S5	بهنمیر- بابلسر	36.689552°	52.761172°
6	S6	روستای سید محله- ساری	36.710996°	52.994980°

جدول 2- محیطهای کشت پایه معدنی و آلی استفاده شده برای جداسازی باکتری‌های اتوتروف و هتروتروف

ترکیب مورد استفاده		محیطهای کشت پایه معدنی			محیطهای کشت پایه آلی		
		استارکی	پستگیت	H-3	استارکی	پستگیت	H-3
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	محلول عناصر پرمصرف (g/lit)	10	7	10	10	7	10
$(NH_4)SO_4$		1	3/5		1	3/5	
$(NH_4)Cl$				1			1
$MgSO_4.7H_2O$		1/5	0/7	0/5	1/5	0/7	0/5
$CaCl_2.2H_2O$		0/42	0/4		0/42	0/4	
KH_2PO_4		0/5	0/15	2/30	0/5	0/15	2/30
$Na_2HPO_4.2H_2O$				2/9			2/9
KCl		0/7			0/7		
$MnCl_2.4H_2O$				0/003			0/003
$NaHCO_3$ (5%)		.....	.....	10cc	.....	....	
$Fe(NH_4)$citrate							0/05
glucose						5	
EDTA		0/0005	5	0/0005	0/0005	5	0/0005
$ZnSO_4.7H_2O$		0/01	2/2	0/01	0/01	2/2	0/01
$FeSO_4.7H_2O$		0/0002	0/49	0/0002	0/0002	0/49	0/0002
$CaCl_2.2H_2O$			0/72			0/72	
H_3BO_3	محلول عناصر کم‌مصرف (g/100cc)	0/03		0/03	0/03		0/03
$MnCl_2.4H_2O$		0/003	0/16	0/003	0/003	0/16	0/003
$NaMoO_4.2H_2O$		0/003		0/003	0/003		0/003
$(NH_4)Mo_7O_{24}.4H_2O$			0/11			0/11	
$CuSO_4.5H_2O$		0/001	0/16	0/001	0/001	0/16	0/001
$CoCl_2.6H_2O$		0/02	0/16	0/02	0/02	0/16	0/02
$NiCl_2.6\,H_2O$		0/002		0/002	0/002		0/002

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت

از سه محیط کشت استارکی[1] (استارکی، 1934)، H-3 [2] (medium 81.DSMZ) و پستگیت[3] (پستگیت، 1966) هم بر پایه کربن معدنی و هم بر پایه کربن آلی برای جداسازی باکتری‌های اتوتروف و هتروترف اکسیدکننده‌ی گوگرد استفاده شد. ترکیبات این محیط‌های کشت در جدول 2 نشان داده شده است. این محیط‌های کشت به دو صورت مایع و جامد (با اضافه کردن دو درصد آگار) تهیه شد. در همه محیط‌های کشت از برم تیمول بلو[4] (0/02 گرم معرف در یک لیتر محیط اصلی) به عنوان شناساگر pH استفاده شد.

غنی سازی باکتری

به منظور غنی‌سازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد، یک گرم از نمونه‌ی رسوبات هموژن شده به 100 میلی‌لیتر محیط‌های کشت مایع استارکی، H-3 و پستگیت اضافه (مکظوم و همکاران، 2017) و درون انکوباتور شیکردار (مدل Comecta، ساخت اسپانیا) در دمای 29 درجه سلسیوس و چرخش 97 دور بر دقیقه به مدت 14 روز نگهداری شدند. سپس به میزان پنج درصد از سوسپانسیون را به 100 میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه انتقال داده شد و بعد از اتمام دوره انکوباسیون، رقت‌های متوالی تا 10^{-5} تهیه و از هر رقت 100 میکرولیتر روی محیط‌های کشت جامد تلقیح در سطح پلیت پخش (کشت سطحی) شد (ژو و همکاران، 2007).

جداسازی و خالص سازی

در این مرحله، کلنی‌های رشد کرده روی محیط‌های کشت جامد، جداسازی و خالص‌سازی شدند. کلنی‌های دارای مشخصات ریخت شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) متفاوت با استفاده از روش کشت خطی خالص سازی و در دمای 29 درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند تا کلنی‌های خالص مشخص شوند (برنر و همکاران، 2005). محیط کشت استارکی به علت تغییرات زیاد کاهش pH در مرحله غنی‌سازی و همچنین دستیابی به جدایه‌های بیش‌تر به عنوان محیط کشت بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد توسط جدایه‌ها

به منظور غربالگری اولیه جدایه‌ها، یک لوپ از کلنی‌های خالص شده را به 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع استارکی تلقیح شدند و بر مبنای تغییر اسیدیته محیط ارزیابی شدند (رانجیبت کومار و همکاران، 2018). سنجش pH به روش معمول با استفاده از pH متر رومیزی (مدل 3510، ساخت انگلستان) و برموتیمول بلو به عنوان شناساگر انجام شد. در مرحله غربالگری نهایی، جدایه‌هایی که بیشترین توانایی کاهش pH را از مرحله قبل داشتند، انتخاب شده و به میزان یک میلی‌لیتر از آن‌ها را به 100 میلی‌لیتر محیط کشت مایع استارکی منتقل شدند. در این فرآیند به منظور ارزیابی دقیق‌تر، مقدار تیوسولفات سدیم مصرف شده و مقدار یون سولفات تولید شده (توانایی اکسیداسیون تیوسولفات سدیم) ارزیابی شدند (رانجیبت کومار و همکاران، 2018؛ اوهبا و اووآ، 2005). برای سنجش میزان تیوسولفات سدیم در محیط کشت مایع از روش تیتراسیون تیوسولفات با محلول یدین در حضور نشاسته استفاده شد. مقدار 10 میلی‌لیتر نمونه، درون ارلن 50 میلی‌لیتری ریخته و سپس یک میلی‌لیتر محلول نشاسته یک درصد، به عنوان معرف اضافه گردید. تیتراسیون با محلول ید 10 میلی‌مولار تا زمانی ادامه یافت که رنگ آبی مشاهده شود. حجم محلول ید مصرف شده یادداشت و سپس میزان تیوسولفات باقی‌مانده به دست آورده شد (بنسیو و همکاران، 2008). مقدار یون سولفات در محیط کشت مایع با روش کدورت سنجی بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل DR1900) در طول موج 450 نانومتر شرکت هک سنجش شد. همچنین تعداد کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت استارکی شمارش گردید و جمعیت باکتری‌ها بر حسب واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر (cfu/ml) گزارش شد (بشارتی و همکاران، 1383).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های مورد نظر، از روش تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA استفاده شد. توده‌ی زیستی جدایه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در ویال جمع‌آوری شد و برای استخراج ماده ژنتیکی (DNA) از کیت استخراج ژنوم باکتریایی شرکت سیناژن استفاده شد. به منظور تکثیر ژن 16S rRNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) انجام شد. جهت اطمینان از تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR به ژل آگاروز 1 درصد منتقل و الکتروفورز (مدل Dena Gene Tajhiz، ساخت ایران) گردید (ویسبورگ و همکاران، 1991). قطعه تکثیر شده برای توالی‌یابی به شرکت

---

1. Starkey medium
2. Medium for chemolithotrophic growth
3. Postgate medium
4. Thymol blue

www.SID.ir

Archive of SID

بایونیر[5] کره‌ی جنوبی ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی، به کمک نرم افزار BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت با توجه به نتایج حاصل از BLAST، درخت فیلوژنی سویه‌های جداسازی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 از روش Neighbor-joining با مدل تکاملی Tamura-Nei رسم شد (تامورا و همکاران، 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزارهای Excel (نسخه 2016) و SPSS (نسخه 24) استفاده گردید. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها در SPSS، با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف انجام شد. جهت مقایسه آماری سطح سولفات، تیوسولفات و pH از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در قالب آزمون دانکن استفاده شد و مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان 95 درصد انجام گردید.

نتایج

غنی‌سازی، جداسازی و خالص سازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد

موفقیت غنی‌سازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد با کاهش قابل توجه در pH یا رسوب ذرات گوگرد در همه محیط‌های کشت به جز محیط کشت پستگیت با پایه کربن آلی مشاهده شد. از این رو، پس از تهیه رقت‌های متوالی از نمونه‌های رسوب غنی‌سازی شده دامنه تشکیل کلنی‌ها بین رقت 10^5-10^4 مشاهده گردید. بر اساس تفاوت‌های مورفولوژیکی کلنی‌ها و پس از خالص‌سازی متوالی در محیط کشت جامد با پایه کربن معدنی و آلی، 27 جدایه باکتری اکسیدکننده گوگرد جداسازی شد که در محیط‌های استارکی، H-3 و پستگیت به ترتیب 14، 7 و 6 جدایه بدست آمدند.

کشت غنی‌کننده یک روش جداسازی طراحی شده برای ایجاد شرایطی بسیار مطلوب برای رشد و افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مورد نظر و عدم رشد سایر میکروارگانیسم‌ها است (مدحوری و همکاران، 2019). در این تحقیق به دلیل تراکم کم باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد ($2/40\times10^4$ - $2/30\times10^2$ در هر 100 میلی‌لیتر) در نمونه‌های رسوب (آبراهم و همکاران، 2004) و عدم تشکیل کلنی در محیط کشت جامد به روش رقت‌سازی متوالی از تکنیک غنی‌سازی در محیط‌های مایع استارکی، پستگیت و H-3 به منظور افزایش تراکم و دست‌یابی به جدایه‌های بیش‌تر استفاده شد. در اکثر مطالعات انجام شده در زمینه جداسازی و غربالگری باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد نیز از این تکنیک استفاده شده است. در این راستا، رجاس- اولیزپیا و همکاران (2013) گزارش کردند که با استفاده از تکنیک غنی‌سازی در محیط‌های کشت مختلف 75 میکروارگانیسم شیمیولیتواتوتروف اکسیدکننده گوگرد از نمونه‌های محیطی مختلف جداسازی شد. ندلا و همکاران (2019) به منظور جداسازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد از نمونه‌های خاک مزارع پرورش ماهی از روش کشت غنی‌کننده در محیط کشت معدنی استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که نمونه‌های خاک غنی‌سازی شده توانایی تولید کلنی تا رقت 10^5 روی محیط کشت جامد گردید که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همسو و منبطق است. در این پژوهش محیط کشت استارکی به علت تغییرات زیاد کاهش pH در مرحله غنی‌سازی و همچنین دستیابی به جدایه‌های بیش‌تر به عنوان محیط کشت بهینه انتخاب شد. مطالعات انجام شده بر نمونه‌های مختلف به ویژه نمونه‌های رسوب و پساب نیز حاکی از عملکرد مناسب این محیط کشت برای جداسازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد بوده است (رجاس- اولیزپیا و همکاران، 2013؛ چادهری و همکاران، 2017).

ارزیابی توانایی اکسایش جدایه‌ها

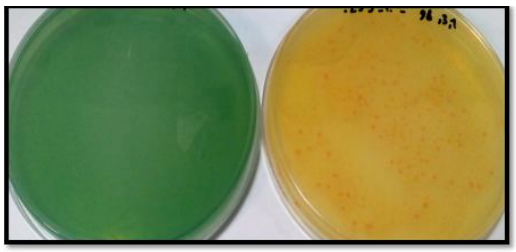
پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، غربالگری اولیه بر اساس اندازه‌گیری کاهش pH همراه با برموتیمول بلو به عنوان شناساگر (شکل 1) انجام شد. نتایج غربالگری اولیه نشان داد که 21 جدایه توانایی کاهش pH در محیط کشت مایع استارکی را نداشتند و تنها شش جدایه FH-13، FH-14، FH-15، FH-21، FH-24 و FH-27 توانستند pH محیط کشت مایع را به ترتیب از 7 به 5/46، 5/98، 5/65، 6/35، 5/31 و 6/73 کاهش دهند که مطابق با نتایج سریدر و همکاران (2015)، دوناتی و همکاران (1996) و بهرا و همکاران (2014b) می‌باشد. این کاهش pH بواسطه تولید اسید سولفوریک بود که در نتیجه اکسیداسیون بیولوژیکی تیوسولفات به سولفات اتفاق می‌افتد. این فرآیند همچنین در مطالعات و رجاس- اولیزپیا و همکاران (2013)، سوزوکی (1999) گزارش شد.

[5] Bioneer

www.SID.ir

Archive of SID

الف



ب

شکل 1- غربالگری اولیه جدایه‌ها روی محیط کشت مایع (الف) و جامد استارکی (ب) با برموتیمول بلو به عنوان یک شناساگر: باکتری‌هایی که توانایی کاهش pH را داشتند رنگ محیط کشت را از سبز به زرد تغییر دادند.

در ارزیابی نهایی، مقدار یون سولفات و یون تیوسولفات و جمعیت شش جدایه منتخب اتوتروف و هتروتروف در محیط کشت مایع استارکی بعد از 14 روز در دمای 29 درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس میزان تولید یون سولفات و میزان مصرف یون تیوسولفات نشان داد که شش جدایه اکسیدکننده گوگرد، بر مقدار یون سولفات و یون تیوسولفات در محیط کشت مایع استارکی اثر معنی‌داری داشته است (جدول 3 و 4). از این رو، نتایج مربوط به اندازه‌گیری یون تیوسولفات مصرف شده توسط جدایه‌های باکتری نشان داد که جدایه FH-13، FH-21 و FH-14 به ترتیب بیش‌ترین توانایی مصرف یون تیوسولفات (4053/79، 3104/5 و 278/97 میلی‌گرم بر لیتر) را در محیط کشت مایع داشتند (جدول 5). همچنین، توانایی تولید یون سولفات در محیط کشت توسط این سه جدایه به ترتیب 2240، 965 و 490 میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول 5). بنابراین، جدایه‌های FH-13، FH-14 و FH-21 قادر به اکسیداسیون یون تیوسولفات به یون سولفات بودند. این 3 جدایه بعنوان جدایه کارآمدتر به منظور تعیین توالی انتخاب شدند .

جدول 3- تجزیه واریانس میزان تولید یون سولفات جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد در محیط کشت استارکی بعد از 14 روز در دمای 29 درجه سلسیوس

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig
اختلاف بین گروهی	1163061/29	6	1938435/714	383/399	/000
اختلاف درون گروهی	67950/000	14	4853/571		
کل	11698564/29	20			

جدول 4- تجزیه واریانس میزان مصرف یون تیوسولفات جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد در محیط کشت استارکی بعد از 14 روز در دمای 29 درجه سلسیوس

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig
اختلاف بین گروهی	53704095/54	6	8950682/590	7743/144	/000
اختلاف درون گروهی	16183/292	14	1155/949		
کل	53720278/83	20			

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 5- میزان تولید یون سولفات، مصرف یون تیوسولفات و جمعیت جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد در محیط کشت استارکی بعد از 14 روز در دمای 29 درجه سلسیوس

ردیف	جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد	مقدار سولفات (mgl^{-})	مقدار یون تیوسولفات (mgl^{-})	جمعیت جدایه‌ها (cfu/ml)
1	شاهد	1110 ± 110^{e}	4467 ± 0^{a}	0
2	FH-13	3350 ± 50^{a}	$413/21 \pm 33/50^{e}$	$3/6\times10^{7}$
3	FH-14	1600 ± 100^{c}	$4188/03 \pm 55/84^{c}$	$5/1\times10^{7}$
4	FH-15	1275 ± 25^{d}	$4366/72 \pm 11/17^{b}$	2×10^{4}
5	FH-21	2075 ± 75^{b}	$1362/50 \pm 22/32^{d}$	1×10^{7}
6	FH-24	1200 ± 50^{ed}	$4455/93 \pm 11/05^{a}$	0
7	FH-27	1225 ± 25^{ed}	$4411/27 \pm 55/72^{ab}$	$2/8\times10^{7}$

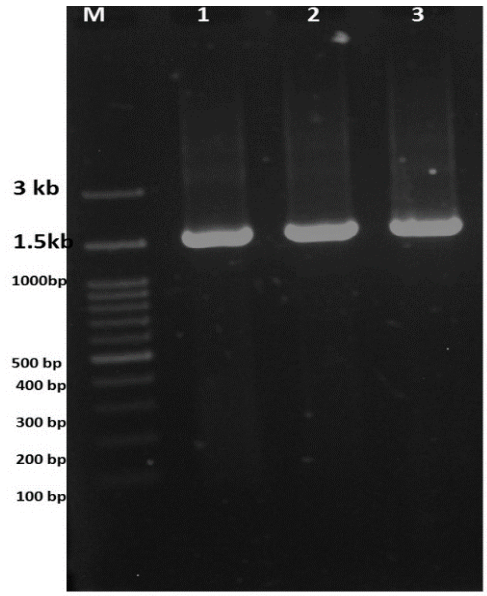
در این راستا، رجاس- اولیزپیا و همکاران (2013) نشان دادند که از 41 جدایه باکتری شیمیولیتواتوتروف اکسیدکننده گوگرد تنها هفت جدایه بیش‌ترین توانایی اکسیداسیون گوگرد به سولفات را از 190 تا 380 میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت مایع استارکی اصلاح شده داشتند. علاوه بر این، آن‌ها گزارش کردند جدایه‌هایی که قادر به تولید مقادیر بالاتری از سولفات بودند مقدار pH نهایی را بیش‌تر کاهش می‌دهند، با این حال آن ها هیچ ارتباط مستقیمی بین تولید سولفات و کاهش pH مشاهده نکردند. در تحقیقی یوسف و همکاران (2018) گزارش کردند که حداکثر مقدار یون سولفات (155/12 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به جدایه SOB-9 و سپس جدایه SOB-4 (125/73 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. بعلاوه اوهبا و اووآ (2005) گزارش کردند که بر اساس اندازه‌گیری میزان یون تیوسولفات مصرف شده و کاهش pH، از بین هشت سویه باکتری تنها سه سویه باکتری اکسیدکننده گوگرد بودند که هر سه سویه توانایی کاهش pH (از 6/5 به 4/3- 3/4) و مصرف تقریباً تمام یون تیوسولفات (1/60- 1/59) را در محیط کشت داشتند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA بر روی ژل آگاروز یک درصد در شکل 2 نشان داده شده است. پس از اصلاح توالی ژن 16S rRNA بدست آمده هر سه سویه باکتری اکسیدکننده گوگرد به روش دستی، شباهت آن‌ها با داده‌های معتبر ثبت شده در بانک ژنی NCBI مقایسه شد. جدول 6 نتایج حاصل از BLAST جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد را نشان داده است. نتایج مشخص کرد که هر سه سویه FH-14، FH-13 و FH-21 به ترتیب 99/70، 100 و 99/80 درصد با سویه *Thiobasillus thioparus* HM173634 شباهت تبارزایی داشتند. سه جدایه فوق مربوط به شاخه پروتئوباکتریا و رده بتا پروتئوباکتریا می‌باشد. همچنین، درخت تبار شناسی جدایه‌های مورد نظر بر اساس روش Neighbor joining با مدل Tamura-Nei و با استفاده از نرم افزار Geneious (9.1.3) ترسیم شد (شکل 3). ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد کارآمد در جدول 7 نشان داده شده است. هر سه جدایه‌ی اکسیدکننده گوگرد، کلنی‌هایی گرد با حاشیه‌ای صاف و پهن تشکیل می‌دهند. رنگ کلنی جدایه‌های FH-13 و FH-14 سفید و جدایه FH-21 کرم است. بررسی میکروسکوپی نشان داد که هر سه جدایه میله‌ای شکل و گرم منفی هستند.

www.SID.ir

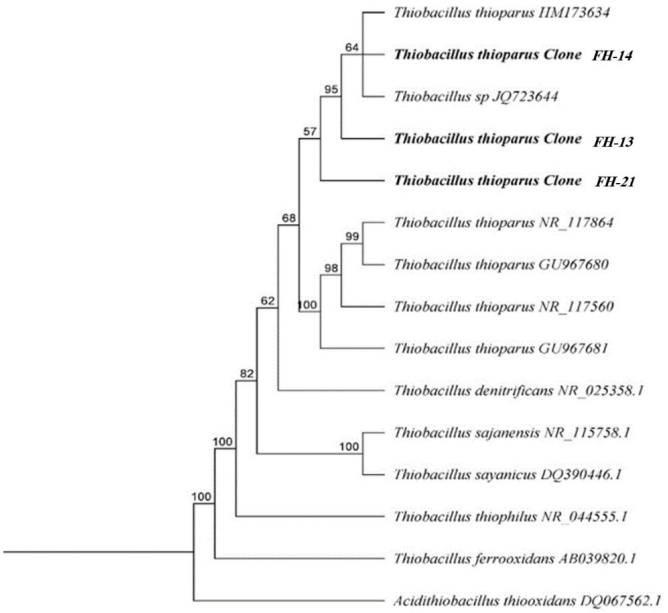
Archive of SID



شکل 2- باند 16S rRNA حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

جدول 6- مقایسه میزان شباهت ژن جدایه‌های مورد آزمایش در این تحقیق با سویه‌های استاندارد

نام جدایه	شماره دستیابی	درصد شباهت	سویه استاندارد با بیش ترین میزان شباهت	تاکسونومی
FH-14	MK828485	99/70	*Thiobacillus thioparus* HM173634	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Thiobacillaceae; Thiobacillus
FH-13	MK828486	100	*Thiobacillus thioparus* HM173634	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Thiobacillaceae; Thiobacillus
FH-21	MK828487	99/80	*Thiobacillus thioparus* HM173634	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Thiobacillaceae; Thiobacillus



شکل 3– درخت تبار شناسی باکتری های شناسایی شده در تحقیق به روش Neighbor joining با مدل Tamura-NSei با تعداد تکرار 1000 و ضریب صحت گره بالاتر از 50 درصد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 7- ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های اکسیدکننده گوگرد کارآمد

ویژگی ها	FH-13	FH-14	FH-21
نوع گرم	گرم منفی	گرم منفی	گرم منفی
شکل	میله ای	میله ای	میله ای
شکل کلنی	گرد	گرد	گرد
حاشیه کلنی	صاف	صاف	صاف
ارتفاع کلنی	پهن	پهن	پهن
رنگ کلنی	سفید	سفید	کرم
قوام کلنی	سفت	کره ای	کره ای
تحرک	متحرک	متحرک	متحرک
اندازه کلنی	1 میلی‌متر	1 میلی‌متر	1 میلی‌متر

در این راستا، ایتو و همکاران (2004) با استفاده از آنالیز توالی ژن 16S rRNA یک باکتری شیمیولیتواتوتروف اکسیدکننده گوگرد را شناسایی کردند که این باکتری با جنس *Halothiobacillus* (89 درصد) شباهت تبارزایی داشت. علاوه بر این، صادقی پور مروی و همکاران (1395) گزارش کردند که شش جدایه اکسیدکننده گوگرد از خاک کشاورزی در منطقه مس سر چشمه کرمان جداسازی و با استفاده از آنالیز توالی ژن S 16rRNA شناسایی کردند که با جنس‌های *Thiobacillus* و *Starkey* شباهت تبارزایی داشتند. مطالعات زیادی در اکوسیستم‌های مختلف (هوت و همکاران، 2017؛ چو و همکاران، 1991؛ مایزر و همکاران، 2013؛ باربوسا و همکاران، 2006؛ ولسسیانو و همکاران، 1997) گزارش کردند که این باکتری‌ها توانایی اکسیداسیون ترکیبات گوگردی از جمله تیوسولفات، تریتیونات، تتراتیونات، پنتاتیونات، هگزاتیونات، تیوسیانات، دی‌تیونات، سولفید هیدروژن، دی متیل سولفید، دی‌متیل دی‌سولفید، متان‌تیول[1] (CH_3SH) و متیل مرکاپتان به عنوان منبع انرژی را دارند.

در اکثر منابع (هوت و همکاران، 2017 و مایزر و همکاران، 2013) باکتری *T. thioparus* را شیمیولیتواتوتروف اجباری معرفی کردند. در مطالعه حاضر، دو سویه FH-13 و FH-14 از محیط کشت با پایه کربن معدنی (بی‌کربنات سدیم) و یک سویه FH-21 از محیط با پایه کربن آلی (گلوکز) جداسازی شد. دو سویه FH-13 و FH-14 توانایی رشد در محیط کشت حاوی تیوسولفات و گلوکز را نداشتند در حالی که FH-21 توانایی رشد در محیط کشت حاوی هم تیوسولفات و هم گلوکز و تیوسولفات را داشت (نتایج نشان داده نشد). این نتایج می‌تواند نشان دهد که سویه FH-21 توانایی رشد روی منابع آلی را دارد و افزودن گلوکز به محیط کشت استارکی سبب افزایش رشد این سویه می‌گردد. در این راستا، ولسسیانو و همکاران (1997) نشان دادند که سویه *Thiobacillus thioparus* LV43 به صورت اتوتروفی از طریق اکسیداسیون تیوسولفات و سولفید رشد می‌کند اما توانایی رشد به طور هتروتروفی روی ترکیبات آلی (به عنوان مثال، عصاره مخمر، سدیم استات، سدیم سیترات، گلوکز و فروکتوز) را ندارد. علاوه بر این، آن‌ها گزارش کردند که افزودن این ترکیبات آلی به محیط معدنی حاوی تیوسولفات باعث افزایش سرعت رشد سویه LV43 نشد. لیفلت و ماتین (1980) نشان دادند که در محیط‌های کشت میکسوتروفیک هم گلوکز و هم تیوسولفات سبب رشد سلول می‌گردد. گلوکز در این شرایط می‌تواند به عنوان منبع کربن سلول و یا به عنوان منبع هم کربن و هم انرژی باشد. بنابراین، لازم است برای کسب اطلاعات در این زمینه میزان کربن گوکز استفاده شده را با میزان کربن موجود در مواد سلولی سنتز شده مقایسه گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سه سویه *Thiobacillus thioparus* بهترین عملکرد از لحاظ توانایی اکسایش تیوسولفات، تولید سولفات و کاهش pH در شرایط آزمایشگاهی داشتند. بنابراین، از این سه سویه می‌توان به‌عنوان سویه‌های مؤثر اکسیدکننده گوگرد در فرایند زیست پالایی به منظور حذف ترکیبات گوگردی به ویژه سولفید هیدروژن از مزارع پرورشی کپور ماهیان استفاده کرد. به دلیل اهمیت بسیار زیاد باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد در فرایند تجزیه ترکیبات گوگردی به ویژه سولفید هیدروژن، در این تحقیق سعی بر آن بود تا با معرفی سویه‌های برتر بومی در این فرایند از مصرف مواد شیمیایی در مزارع پرورش ماهی جلوگیری به عمل آید. از این سویه‌ها می‌توان در حوزه‌های مختلف کشاورزی و تصفیه پساب نیز استفاده کرد.

[1] Methanethiol

www.SID.ir

Archive of SID

قدردانی و تشکر

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه علوم دریایی و منابع طبیعی آقایان دکتر مرتضی کمالی، مهندس حسین نورانی، مهندس مصطفی حسینی، مهندس صادق بور و خانم مهندس منظر حق دوست کمال تشکر را داریم. از اعضای بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور جناب آقای دکتر هادی اسدی رحمانی، جناب آقای دکتر فرهاد رجالی، جناب آقای دکتر علیرضا فلاح، جناب آقای دکتر حسین کاری دولت آباد، سرپرست محترم آزمایشگاه خانم مهندس ندا علیزاده و کارشناسان محترم بخش خانم‌ها مهندس خدیجه اربابی، مهندس مهناز اوتادی تشکر و قدردانی می‌کنیم. همچنین از زحمات خانم دکتر سمیه مکظوم، دکتر محدثه رمضانی و آقای دکتر مهدی مشتاقی اعضای محترم مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و از خانم دکتر هانیه شریفیان و آقای دکتر کرمی کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع:

1. بشارتی، ح. خسروی، ه. مستشاری، م. میرزاشاهی، ک. قادری، ج. و ذبیحی، ح. 1395. بررسی اثر تیوباسیلوس، گوگرد و فسفر بر شاخص های رشد ذرت (*Zea mays L.*) در برخی مناطق ایران. مجله تحقیقات کاربردی خاک. جلد 4، شماره 1، ص 113-103.
2. بشارتی، ح. صالح راستین، ن. ملکوتی، م.ج. و علیزاده، ع. 1383. بررسی توان ماندگاری باکتری تیوباسیلوس بر روی چند نوع حامل مختلف. مجله علوم خاک و آب. جلد 18، شماره 2، ص 176-171.
3. صادقی‌پور مروی، م. پوربابایی، ا.ع. علیخانی، ح. حیدری، ا. و منافی، ز. 1395. جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد در خاک کشاورزی و بررسی عملکرد اکسایش گوگرد. مجله زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها. جلد 6، شماره 22، ص 125-113.
4. مجردمغانلو، گ.م. فاتحی‌فرد، ا. و ساعدی، س. 1392. حذف سولفید هیدروژنی از فاضلاب صنعتی با استفاده از راکتور ایرلیفت بیوفیلمی سوسپانسیونی. نشریه مهندسی عمران و محیط زیست. جلد 43، شماره 4، ص 86-79.
5. Abraham, T.J. Ghosh, S. Nagesh, T.S. and Sasmal, D. 2004. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of west bengal, India. Aquaculture. 239: 275–288.
6. Affonso, E.G. Polez, V.L.P. Correa, C.F. Mazon, A.F. Araujo, M.R.R. Moraes, G. and Rantin, F.T. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by The air-breathing catfish, Hoplosternum Littorale (*Siluriformes Callichthyidae*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 139: 251–257.
7. Barbosa, V.L. Atkins, S.D. Barbosa, V.P. Burgess, J.E. and Stuetz, R.M. 2006. Characterization of *Thiobacillus thioparus* isolated from an activated sludge bioreactor used for hydrogen sulfide treatment. Journal of Applied Microbiology. 10: 1269–1281.
8. Banciu, H.L. Sorokin, D.Y. Tourova, T.P. Galinski, E.A. Muntyan, M.S. Kuenen, J.G. and Muyzer, G. 2008. Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sufur-oxidizing Gammaproteobacterium *Thioalkalibacter halophilus* gen. nov., sp. nov. from South-Western Siberian soda lakes. Extremophiles. 12: 391–404.
9. Behera, B.C. Mishra, R.R. Dutta, S.K. and Thatoi, H.N. 2014a. Sulphur oxidizing bacteria in mangrove ecosystem, a review. African Journal of Biotechnology. 13: 2897–2907.
10. Behera, B.C. Patra, M. Dutta, S.K. and Thatoi, H.N. 2014b. Isolation and characterisation of sulphur oxidising bacteria from mangrove soil of Mahanadi river delta and theirs sulphur oxidizing ability. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 2: 1–5.
11. Behera, B.C. Singh, S.K. Patra, M. Mishra, R.R. Sethi, B.K. Dutta, S.K. and Thatoi, H.N. 2016. Partial purification and characterisation of sulphur oxidase from *Micrococcus* sp

www.SID.ir

Archive of SID

and *Klebsiella* sp isolated from mangrove soils of Mahanadi river delta, Odisha, India. Universal Journal of Microbiology Research. 4: 66–78.

12. Besharati, H. 2017. Effects of sulfur application and *Thiobacillus* inoculation on soil nutrient availability, wheat yield and plant nutrient concentration in calcareous soils with different calcium carbonate content. Journal of Plant Nutrition. 40: 447–456.
13. Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 2012. Pond aquaculture water quality management. Springer Science and Business Media. 2: 49–62.
14. Brenner, D.J. Krieg, N.R. Staley, J.T. and Garrity Sc, D. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2: The proteobacteria, Part B: The gamma proteobacteria. Berlin.
15. Chaudhary, S. Dhanker, R. and Tanvi, S.G. 2017. Characterization and optimization of culture conditions for sulphur oxidizing bacteria after isolation from rhizospheric mustard soil, decomposing sites and pit house. International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering. 11: 427–431.
16. Cho, K.S. Hirai, M. and Shoda, M. 1991. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, mimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. Journal of Fermentation and Bioengineering. 71: 384–389.
17. Donati, E. Curutchet, G. Pogliani, C. and Tedesco, P. 1996. Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Process Biochemistry. 31: 129–134.
18. Holmer, M. and Storkholm, P. 2001. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. Freshwater Biology. 46: 431–451.
19. Hutt, L.P. Huntemann, M. Clum, A. Pillay, M. Palaniappan, K. Varghese, N. and Shapiro, N. 2017. Permanent draft genome of *Thiobacillus thioparus* DSM 505 T, an obligately chemolithoautotrophic member of the betaproteobacteria. Standards in Genomic Sciences. 12: 10.
20. Ito, T. Sugita, K. and Okabe, S. 2004. Isolation, characterization, and in situ detection of a novel chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium in wastewater biofilms growing under microaerophilic conditions. Applied and Environmental Microbiology. 70: 3122–3129.
21. Kang, X. Liu, S. and Ning, X. 2016. Reduced inorganic sulfur in sediments of the mariculture region of Sanggou bay, China. Aquaculture Environment Interactions. 8: 233–246.
22. Krishnani, K.K. Gopikrishna, G. Pillai, S.M. and Gupta, B. 2010a. Abundance of suphure-oxidizing bacteria in coastal aquaculture using soxb gene analyses. Aquaculture Research. 41: 1290–1301.
23. Lahav, O. Ritvo, G. Slijper, I. Hearne, G. and Cochva, M. 2004. The potential of using iron-oxide-rich soils for minimizing the detrimental effects of H_2S in freshwater aquaculture systems. Aquaculture. 238: 263–281.
24. Leefeldt, R.H. and Matin, A. 1980. Growth and physiology of *Thiobacillus novellus* under nutrient-limited mixotrophic conditions. Journal of Bacteriology. 142: 645–650.
25. Madhuri, R.J. Saraswathi, M. Gowthami, K. Bhargavi, M. Divya, Y. and Deepika, V. 2019. Recent approaches in the production of novel enzymes from environmental samples by enrichment culture and metagenomic approach. In Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. 251–262.
26. Makzum, S. Amoozegar, M. and Dastgheib, S. 2017. Isolation and identification of obligately chemolithoautotrophic, haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio* sp. strain EMA and optimizing its thiosulfate removal activity in haloalkaliphilic condition. Biological Journal of Microorganism. 6: 15–29.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Medium 81. DSMZ. List of media for microorganisms. 2011. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb Germany.
28. Muyzer, G. Kuenen, J.G. and Robertson, L.A. 2013. Colorless sulfur bacteria. The prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. 555–588.
29. Mirzaei, M. Amoabediny, G. Yazdian, F. Sheikhpour, M. Ebrahimi, E. and Zadeh, B.E.H. 2014. An immobilized *Thiobacillus thioparus* biosensing system for monitoring sulfide hydrogen; Optimized parameters in a bioreactor. Process Biochemistry. 49: 380–385.
30. Nadella, R.K. Vaiyapuri, M. Kusunur, A.B. Joseph, T.C. Velayudhan, L.K. and Mothadaka, M.P. 2019. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria (*Halothiobacillus sp.*) from aquaculture farm soil. Journal of Environmental Biology. 40: 363–369.
31. Ohba, H. and Owa, N. 2005. Isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from the buried layer containing reduced sulfur compounds of A paddy field on Sado island in Niigata Prefecture. Bull Faculty of Agriculture, Niggata University. 58: 55–61.
32. Pillay, T.V.R. 2008. Aquaculture and the Environment. John Wiley and Sons, New York.
33. Postgate, J.R. 1966. Media for sulphur bacteria. Laboratory Practice. 15: 1239.
34. Poulton, S.W. Krom, M.D. Rijn, J.V. and Raiswell, R. 2002. The use of hydrous iron oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems. Water Research. 36: 825–834.
35. Ranjit Kumar, N. Archana, K. K. Basha, K.A. Muthulakshmi, T. Joseph, T.C. and Prasad, M.M. 2018. Isolation and identification of sulphur oxidizing bacteria from freshwater fish farm soil. Fishery Technology. 55: 270–275.
36. Rojas-Avelizapa, N.G. Gómez-Ramírez, M. Hernández-Gama, R. Aburto, J. and García de León, R. 2013. Isolation and selection of sulfur-oxidizing bacteria for the treatment of sulfur-containing hazardous wastes. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 27: 109–117.
37. Sridar, R. Veerender, K. Sivaji, M. and Gayathri, R. 2015. Genetic diversity of sulphur oxidizing bacteria from different ecosystems. Indian Journal of Biotechnology. 14: 72–80.
38. Starkey, R.L. 1935. Products of the oxidation of thiosulfate by bacteria in mineral media. The Journal of General Physiology. 18: 325–349.
39. Suzuki, I. 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. Canadian Journal of Microbiology. 45: 97–105 .
40. 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: 2725–2729.
41. Vlasceanu, L. Popa, R. and Kinkle, B.K. 1997. Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 63: 3123–3127.
42. 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: 697–703.
43. Yousef, N. Mawad, A. Aldaby, E. and Hassanein, M. 2018. Isolation of sulfur oxidizing bacteria from polluted water and screening for their efficiency of sulfide oxidase production. Global NEST Journal. 20: 259-264.
44. Zhang, L. De Schryver, P. De Gusseme, B. De Muynck, W. Boon, N. and Verstraete, W. 2008. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. Water Research. 42: 1–12.
45. Zhao, Y.G. Zheng, Y. Tian, W. Bai, J. Feng, G. Guo, L. and Gao, M. 2016. Enrichment and immobilization of sulfide removal microbiota applied for environmental biological remediation of aquaculture area. Environmental Pollution. 214: 307–313.

www.SID.ir

Archive of SID

46. Zhou, Q.G. Bo, F. Bo, Z.H. Xi, L. Jian, G. Fei, L.F. and Hua, C.X. 2007. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 1217–1225.
47. Zhuang, R. Lou, Y. Qiu, X. Zhao, Y. Qian, D. Yan, X. and Qian, L. 2017. Identification of a yeast strain able to oxidize and remove sulfide high efficiently. Applied Microbiology and Biotechnology. 101: 391–400.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and Identification of Efficient Strains of Native Sulfur Oxidizing Bacteria from Warm-water Fish Farms in the Central Regions Mazandaran

R. Dashtbin, N. l. Mahmoudi[1], and H. Besharati
MSc Student, Tarbiat Modares University; E-mail: rana.dashtbin70@gmail.com
Assistant professor., Dept. of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University; E-mail: n.mahmoudi@modares.ac.ir
Academic member, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran; E-mail: besharati1350@yahoo.com
Received: September, 2019 & Accepted: May, 2020

Abstract

This study was aimed to isolate and identify the most efficient native bacteria from warm-water fish farms of Mazandaran that can potentially oxidize hydrogen sulfide. After sampling the sediments and sediment pore water of fish farms in Fereydunkenar, Babol, Babolsar and Sari counties, enrichment and isolation carried out in three liquid culture media of Starkey, Postgate, and H-3 to increase the number of the desired microorganisms. After isolation based on morphological difference (in the above solid culture media), 27 isolates (14 autotrophic and 13 heterotrophic isolates) were purified. Then preliminary screening was performed based on pH decrease in Starkey liquid culture media, among which only 6 isolates were selected. In the next stage, the amount of thiosulfate consumption, sulfate production, and the density of bacteria in Starkey liquid culture media were measured to a more detailed evaluation of the ability of sulfur oxidation. Among the 6 isolates, isolates FH-13, FH-21, and FH-14 had the highest oxidation ability of thiosulfate ions (4053.79, 3104.5, and 2878.97 mg / l for 14 days) and sulfate ion production (2240, 965 and 490 mg / l) in the liquid culture medium. Molecular identification of these isolates was performed using the 16S rRNA gene sequencing method. The results showed that three isolates FH-14, FH-13, and FH-21 had 99.70, 100, and 99.80% of identity with the *Thiobacillus thioparus* HM173634, respectively. Based on the results of this study, these strains can be used as effective sulfur-oxidizing strains in the bioremediation process to remove hydrogen sulfide in warm-water fish farms.

Keywords: Warm-water fish culture, Hydrogen sulfide, Sulfur-oxidizing bacteria, Sulfur oxidation, *Thiobacillus thioparus*

[1.] Corresponding author: Aquaculture Department, Faculty of Natural Resources and Marine Science- Tarbiat Modares University, noor

www.SID.ir