جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز1390، دوره سوم، شماره دهم، صفحه 44-35

جداسازی و شناسایی دو گونه باکتری اکسیدکننده سولفید سدیم و ارزیابی اثر آنها در کاهش تولید گاز SH_2 در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه

رضا صفری[1]، زهرا یعقوب زاده[1]

1. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

نویسنده مسؤول: زهرا یعقوب زاده، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر- ساری، za_yaghoub@yahoo.com

دریافت: 90/7/18 پذیرش: 90/9/30

چکیده

زمینه و هدف: گازهای سمی از مهمترین فاکتورهای شیمیایی آب بوده که به هنگام افزایش بیش از حد غلظت آنها، باعث به مخاطره انداختن سلامت آبزیان می شوند . در مزارع پرورش ماهیان گرمابی به علت راکد بودن آب ، خطر افزایش SH_2 وجود داشته و با کاهش اکسیژن محلول و pH ، میزان SH_2 به چند برابر افزایش می یابد. یکی از راههای کاهش SH_2 استفاده از باکتریهای اکسید کننده گوگرد می باشد. هدف از انجام این تحقیق جداسازی آندسته از باکتریهای اکسید کننده گوگرد بوده که توانایی رشد در شرایط هوازی و بی هوازی و pH محدوده خنثی را داشته و قادر به احیای اشکال مختلف نیتروژن نیز باشند.

روش بررسی: پس از نمونه برداری از آب و رسوب وکشت در محیط های T2 medium و نوترینت براث حاوی سولفید سدیم، انکوباسیون در دمای 30-25 درجه سانتی گراد به مدت 6-4 روز انجام گرفت. پس از کشت در محیط آگاردار، کلنی های رشد یافته با استفاده از مشخصات ماکروسکوپی ، میکروسکوپی و همچنین تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند. برای ارزیابی میزان اکسیداسیون سولفید سدیم، مقیاسهای مختلف تجزیه آن (ارلن آزمایشگاهی،آکواریوم ، ونیرو و استخر) در زمانهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج آزمایشات نشان داد که دو نوع از باکتریهای اکسید کننده SH_2 بنامهای *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و *پاراکوکوس دنیتریفیکانس* جدا شده که توانایی رشد در pH = 7-8 ، دمای 25 تا 30 درجه سانتی گراد 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 معنی داری نشان نمی دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به توانایی باکتریهای جداشده ، میتوان از آنها بعنوان باکتریهای پروبیونت، در کنار باکتریهای شرکت کننده در فرآیند نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون استفاده کرده و بصورت ترکیبی مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: باکتریهای اکسید کننده سولفید سدیم، مزارع پرورش ماهیان گرمابی، تیوباسیلوس، پاراکوکوس

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 می باشد. 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 3 و امگا 6 موجود در آبزیان برای درمان بیماریهای مختلف از جمله بیماریهای قلبی عروقی،کلیوی و بیماریهای التهابی مورد استفاده قرار می گیرد(1). تولید آبزیان در کشور در سال 1384 ، 522543 تن بوده که سهم آبزی پروری و ماهیان گرمابی به ترتیب 134164 و 73396 تن بوده و آمار صید ماهیان گرمابی در استان مازندران 30-25 هزار تن می باشد. مساحت آببندانها و استخرهای ماهیان گرمابی در استان مازندران در حدود 17000 هکتار بوده که در سال 1384 ، 17 تا 18 هزار تن از انواع ماهیان گرمابی از آن برداشت شده است (2).

یکی از مشکلات عمده آببندانها و استخرها در پرورش ماهیان گرمابی، کمبود آب در فصل تابستان بوده که بدنبال آن اکسیژن محلول در آب کاهش یافته و به علت تراکم نسبتا بالای ماهیان پرورشی و فعالیت متابولیکی آنها ،میزان مواد زائد و گازهای سمی از جمله آمونیاک ، نیتریت و SH_2 افزایش می یابد(3). یکی از راههای کاهش گازهای سمی استفاده از پروبیوتیکها می باشد(4). 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 می دهند. مطالعات موردی که در ارتباط با استفاده از پروبیوتیک در آبزیان انجام گرفته نشان می دهد 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 می باشند (5- 9). SH_2 از جمله گازهای سمی بوده که افزایش بیش از حد آن در مزارع پرورشی باعث ظهور صدمات جدی در آبزیان می شود. از مهمترین عوارض SH_2 در ماهی، متوقف نمودن اکسیداسیون سیتوکروم a3 و مهار کننده کردن سیستم انتقال الکترون و تنفس هوازی بوده که در نهایت سبب افزایش لاکتات خون و هیپوکسی می گردد. سمیت این ماده با کاهش اکسیژن محلول و pH افزایش می یابد. تاثیر SH_2 بیشتر بر روی تخم، لارو و ماهیان جوان بوده و در برخی از موارد غلظت طبیعی آن در محیط (کمتر از 0/006 mg/l) برای این گروه کشنده می باشد. اگر غلظت SH_2 به بالاتر از 0/004 mg/l برسد اثرات معکوسی بر رشد و بقاء ماهی خواهد داد. نتایج تحقیقات نشان داد که هنگامیکه گربه ماهی در معرض mg/l 0/5 از SH_2 و در دمای 20 درجه قرار گیرد پس از مدتی عوارض تنفسی در ماهی پدیدار می گردد. اگر ماهی در معرض mg/l 0/1 از SH_2 بمدت 30 دقیقه و در دمای 20 درجه قرار گیرد، فعالیت سیتوکروم اکسیداز تا 40% متوقف شده و از طرفی میزان لاکتات خون از 11/6 به 38/1 mg/l افزایش می یابد. اگر ماهی مبتلا، در آب شیرین با دمای 10 درجه سانتی گراد و بمدت 6 ساعت قرار گیرد، مجددا به شرایط اولیه برگشته و میزان لاکتات و همچنین سیتوکروم به حد طبیعی برمی گردد (10) .

گروههای مختلفی از باکتریها مثل باکتریهای بنفش و سبز قادر به اکسید نمودن سولفید سدیم بوده و از جنسهای شاخص می توان به تیوباسیلوس، کلروبیوم، کروماتیوم و تیوپدیا اشاره نمود. در برخی از نمونه های تجارتی پروبیوتیک، از سوش تیوباسیلوس نوولوس بعنوان اکسید کننده های هوازی اجباری سولفید و مرکاپتان استفاده می شود. اخیرا نیز از دو گونه باسیلوس به نامهای *باسیلوس سولفیدوفیلوس* و *باسیلوس موجاونسیز* به منظور اکسیداسیون سولفید سدیم استفاده شده است(11). در بین گونه های باکتریایی اکسید کننده سولفید سدیم، دو باکتری *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و *پاراکوکوس (میکروکوکوس) دنیتریفیکانس* به لحاظ رشد در شرایط هوازی و بیهوازی، احیای نیترات به نیتریت و سایر متابولیتها و رشد در pH= 6-9 از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و می توان از آنها بعنوان باکتریهای پروبیونت در کنار باکتریهای گروه دنیتریفیکانس استفاده نمود(12). هدف از انجام این تحقیق جداسازی باکتریهای شاخص اکسید کننده SH_2 که توانایی احیای نیترات و نیتریت را نیز دارا می باشند.

روش بررسی

تعیین ایستگاه و نمونه برداری: به منظور جداسازی باکتریهای اکسید کننده سولفید سدیم ، نمونه برداری از آب و رسوب در طی دوره 3 ماهه (سال 1381) از 51 آببندان و استخر واقع در شهرهای ساری(10 ایستگاه)، جویبار و قائم شهر (7 ایستگاه)، بهشهر و نکاء (7 ایستگاه)، بابل (10 ایستگاه)، محمود آباد (7 ایستگاه)، بابلسر (5 ایستگاه)و آمل (5 ایستگاه) انجام

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گرفت. تعداد نمونه های اخذ شده از هر ایستگاه در طول دوره ، سه نمونه بوده و در مجموع تعداد 306 نمونه مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه یک نمونه واحد ، نمونه برداری 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 شیشه های 500 میلی لیتر انتقال داده شدند. کل نمونه های اخذ شده در کنار زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتریهای اکسید کننده سولفید سدیم : به منظور جداسازی باکتریهای اکسید کننده سولفید سدیم از محیطهای افتراقی T2- medium ، نوترینت براث و نوترینت آگار غنی شده با سولفید سدیم (Merk) استفاده گردید. پس از تهیه رقتهای متوالی (10^2- 10^4) از نمونه‌های آب و رسوب، کشت در محیطهای غنی کننده T2- medium حاوی عناصر کمیاب (به مقدار 0/1%) و نوترینت براث (pH =7) انجام شده و روند رشد باکتریها پس انکوباسیون بمدت 6-4 روز در دمای 30-25 ^{o}c ، مورد ارزیابی قرار گرفت. رشد باکتریها با سیاه شدن محیط و تولید گوگرد فلزی و چسبیدن به ته لوله مشخص گردید. لوله‌های دارای کدورت به عنوان نمونه‌ها مثبت احتمالی در نظر گرفته شده و کشت خطی در محیط نوترینت آگار و T2 medium حاوی 20-15 g/l آگار خالص، انجام و انکوباسیون بمدت 48-24 ساعت در دمای 25-30^{o}c صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی کلنی های رشد یافته و تعیین مشخصات میکروسکوپی آنها، با استفاده از تستهای بیوشیمیایی نظیر احیای نیترات، رشد در دما و pH های مختلف، حرکت، استفاده از اوره و رشد در حضور نمک باکتریهای شاخص جدا شدند نمونه های خالص شده در گلیسرول 20% و در دمای 20- درجه قرار داده شده و بعنوان ذخیره های میکروبی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ظاهر شدن کلنی سیاه بر روی T2 medium آگار، احتمال وجود این گروه از باکتریها وجود داشته که با تستهای اشاره شده (بر اساس مرجع Bergey) جنسهای تیوباسیلوس و پاراکوکوس جدا شده که با انجام تستهای تائیدی کلیدی نظیر احیای نیترات گونه های اختصاصی شناسایی شدند (13).

بررسی روند تجزیه سولفید سدیم در مقیاسهای مختلف : به منظور بررسی فرآیند تجزیه سولفید سدیم در شرایط آزمایشگاهی ، سوسپانسیونی از باکتریهای شاخص Thiobacillus denitrificans و Paracoccus denitrificans در محیطهای آبگوشت تهیه شده و سپس مقدار 5% از آنها به محیط پایه معدنی حاوی سولفید سدیم (دو غلظت 0/004 mg/l و 0/06) انتقال یافته و روند تجزیه میکروبی با احتساب دو تکرار ، pH های 6 و 7 و دو سیستم (استفاده از هواده و عدم استفاده از هواده) و زمانهای صفر پنج، ده ، پانزده و بیست ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت(11، 14).

(فرم مورد استفاده باکتریها) 2× (غلظت مورد سولفید هیدروژن) 2× (تکرار) 2× (pH) 2× (استفاده از سیستم هواده یا عدم استفاده)2

با احتساب 5 زمان انکوباسیون ، در مجموع برای آزمایشات مربوط به تجزیه سولفید سدیم ، 160 مورد آزمایش انجام گرفت. پس از نتیجه گیری در فاز آزمایشگاهی، آکواریومهایی با حجم کوچک ساخته شده و پس از اضافه کردن 5 لیتر از آب استخر به آکواریوم و اندازه‌گیری فاکتورهای شیمیایی در آب ریخته شده، سولفید سدیم به مقدار 0/06 mg/l 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(10 مورد آزمایش). در مرحله سوم، ابتدا ونیرویی به مساحت $1/5×2 m^2$ و ارتفاع 1 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 4 روز قرار داده شد تا میزان SH_2 افزایش یابد. اندازه گیری pH و دما بصورت روزانه ولی غلظت SH_2 در روز چهارم اندازه گیری 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 SH_2 در زمان‌های مختلف مجدداً اندازه‌گیری شد.

پس از انجام آزمایش در ونیرو ، مساحت مشخصی از استخرخاکی را محصور کرده ($10×10m^2$) و تعداد ماهیان گرمابی در منطقه مورد نظر را افزایش داده تا میزان SH_2 در زمان کوتاهی افزایش یابد. نمونه برداری در روز دوم انجام گرفته و پس از مشخص شدن افزایش نسبی فاکتور مذکور، از سوسپانسیون میکروبی استفاده گردید. سوسپانسیون میکروبی را در حجمهای 200 میلی لیتر تهیه و قسمتی از آن را بصورت

اسپری در کنارهای آبندان پخش کرده و قسمت دیگر نیز از طریق لوله‌های پلیکا به زیر استخر تزریق گردید. برای اندازه گیری SH_2 در مراحل مختلف آزمایش از روش یدومتری استفاده شده و در نهایت با استفاده از فرمول ذیل میزان S^{2-} اندازه گیری گردید (11).

$$mg\ S^{-2}/l = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{\text{میلی لیتر نمونه}}$$

A= ml محلول ید،B = نرمالیته محلول ید، C = محلول تیوسولفات ml، D- نرمالیته محلول تیوسولفات

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور ترسیم جداول و نمودارها از نرم افزار Excel ، جهت تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS و به منظور وجود ارتباط معنی دار ما بین گروهها و درون گروهها به ترتیب از تستهای Anova و LSD استفاده شده و ارزش P در سطح 0/05 تعیین گردید.

یافته ها

نتایج آنالیز آزمایشگاهی نشان داد که از 153 نمونه رسوب، 102 نمونه (66/6%) دارای *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و 85 نمونه (55/5%) واجد *پاراکوکوس دنیتریفیکانس* بودند. از 153 نمونه آب مورد آزمایش، 81 نمونه(52/9%) از نظر *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و 73 نمونه (47/7%) از نظر *پاراکوکوس دنیتریفیکانس* مثبت بودند. در جدول 1 مهمترین تستهای انجام شده برای دو باکتری فوق آمده است.

جدول 1. مهمترین تستهای انجام شده برای جداسازی دو باکتری *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس و پارکوکوس دنیتریفیکانس*

ویژگی / گونه	حرکت	pH	احیای نیترات به نیتریت	احیای نیتریت به نیتروژن	دمای رشد درجه سانتی گراد	رشد در نمک 7%	رشد در نمک 10%	اوره آز
تیوباسیلوس دنیتریفیکانس	-	6-8	+	+	25-30	+	-	+
پاراکوکوس دنیتریفیکانس	-	7-9	+	+	25-35	+	+	-

نتایج نشان میدهد که استفاده از مخلوط تیوباسیلوس و پاراکوکوس به شکل تازه ، در حضور سیستم هواده و دو pH 6 و 7 ، میزان سولفید سدیم از 0/004 به 0/0028 (pH =6) و 0/0022(pH =7) و از غلظت 0/06 به 0/036 (pH =6) و 0/035 (pH =7) mg/l کاهش داشته است . بهنگام استفاده از سیستم هواده ، غلظت سولفید سدیم از 0/004 به صفر (pH =6) و 0/0012 (pH =7) و از غلظت 0/06 به 0/009 (pH =6) و 0/007 (pH =7) mg/l کاهش داشته است.

جدول 2. میانگین غلظت سولفید سدیم در حضور مخلوط تیوباسیلوس و پاراکوکوس جدا شده از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی در دو pH 6 و 7 و زمانهای صفر تا بیست ساعت (شکل مورد استفاده باکتری : تازه)

نام فاکتور	هواده	غلظت (ppm)	pH	زمان (ساعت): صفر	پنج	ده	پانزده	بیست
سولفید سدیم	در حضور هواده	0/004	6	0/004	0/0041	0/0039	0/0035	0/0028
			7	0/004	0/0037	0/0031	0/0026	0/0024
		0/06	6	0/06	0/050	0/047	0/041	0/036
			7	0/06	0/052	0/043	0/040	0/035
سولفید سدیم	در غیاب هواده	/004	6	0/004	0/0032	0/0024	0/0018	0/001
			7	0/004	0/0025	0/0020	0/0016	0/0012
		0/06	6	0/06	0/045	0/031	0/023	0/009
			7	0/06	0/034	0/025	0/014	0/007

نتایج جدول 3 نشان می دهد که به هنگام استفاده از شکل لیوفیلیزه باکتریهای جدا شده در حضور سیستم هواده و دو pH 6 و 7 میزان سولفید سدیم از 0/004 به 0/0028 (pH =6) و 0/0024 (pH =7) و از غلظت 0/06 به0/036 (pH =6) و 0/035 (pH =7) mg/l کاهش داشته است. به هنگام استفاده از سیستم هواده ، غلظت سولفید سدیم از 0/004 به 0/001 (pH =6)و 0/0012 (pH =7) و از غلظت 0/06 به 0/009(pH =6)و 0/007 (pH =7)mg/l کاهش داشته است.

جدول 3. میانگین غلظت سولفید سدیم در حضور مخلوط تیوباسیلوس و پاراکوکوس جدا شده از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی در دو pH 6 و 7 و زمانهای صفر تا بیست ساعت (شکل مورد استفاده : لیوفیلیزه)

نام فاکتور	هواده	غلظت	pH	زمان(ساعت) صفر	پنج	ده	پانزده	بیست
سولفید سدیم	در حضور هواده	0/004	6	0/004	0/0041	0/0039	0/0035	0/0028
			7	0/004	0/0037	0/0031	0/0026	0/0024
		0/06	6	0/06	0/050	0/047	0/041	0/036
			7	0/06	0/052	0/043	0/040	0/035
سولفید سدیم	در غیاب هواده	0/004	6	0/004	0/0032	0/0024	0/0018	0/001
			7	0/004	0/0025	0/0020	0/0016	0/0012
		0/06	6	0/06	0/045	0/031	0/023	0/009
			7	0/06	0/034	0/025	0/014	0/007

نتایج آزمایشات انجام شده در آکواریوم، ونیرو و استخر پرورش ماهی: بهنگام استفاده از مخلوط باکتریهای جدا شده در آکواریوم مشخص گردید که بهنگام استفاده از سیستم هواده، غلظت سولفید سدیم از 0/06 به 0/034 mg/l و در غیاب سیستم هواده، از 0/06 به 0/027 mg/l کاهش یافته است (جدول 4).

قبل از استفاده از تیمارهای باکتریایی در ونیرو و استخر، ابتدا میزان pH و دما و همچنین غلظت سولفید سدیم در چهار روز اول اندازه‌گیری شده که میزان pH از 7/1 تا 9 و دما از 22 -25 o C در نوسان بوده و غلظت سولفید هیدروژن 0/01 mg/l بوده که این زمان بعنوان زمان صفر در نظر گرفته شده و پس از آن مخلوط دو باکتری اضافه گردید. غلظت فاکتور ذکر شده پس از بیست ساعت به ترتیب به 0/005 mg/l کاهش یافت.(جدول 5) .

جدول 4 . میانگین غلظت سولفید هیدروژن در آکواریوم حاوی دو باکتری تیوباسیلوس و پاراکوکوس جدا شده از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی در زمانهای صفر تا بیست ساعت

نام فاکتور	هواده	غلظت اولیه	زمان (ساعت) صفر	پنج	ده	پانزده	بیست
سولفید هیدروژن	+	0/06	0/063	0/057	0/048	0/044	0/034
سولفید هیدروژن	–	0/06	0/055	0/046	0/042	0/036	0/027

نتایج استفاده از فرمولهای میکروبی در استخر پرورش ماهیان گرمابی نشان داد که غلظت سولفید هیدروژن از 0/02 (در روز دوم که بعنوان زمان صفر تلقی گردید) به 0/0034 mg/l کاهش یافته و تغییرات دما و pH نیز بین 23 تا 28 درجه سانتی‌گراد و 6/8 تا 8/2 در نوسان بود (جدول 5).

جدول 5. میانگین غلظت سولفید هیدروژن در ونیرو و استخر حاوی ماهی (کپور، فیتوفاگ و آمور) دو باکتری تیوباسیلوس و پاراکوکوس جدا شده از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی در زمانهای صفر تا بیست ساعت

نام فاکتور	مقیاس آزمایش	هواده	زمان (ساعت) صفر	پنج	ده	پانزده	بیست
سولفید هیدروژن	ونیرو	+	0/01	0/023	0/017	0/013	0/005
سولفید هیدروژن	استخر	+	0/02	0/017	0/01	0/0087	0/0034

جدول 6 . تغییرات سولفید هیدروژن در حضور و عدم حضور هواده پس از بیست ساعت ، میزان و درصد کاهش آنها و ارزش Pدر مقیاسهای مختلف

مقیاس مورد استفاده	فاکتور	غلظت اولیه(ppm)	پس از بیست ساعت	میزان کاهش	درصد کاهش	هواده	ارزش P
آکواریوم	سولفیدهیدروژن	0/06	0/034	0/026	%43/30	+	p>0/05
آکواریوم	سولفید هیدروژن	0/06	0/027	0/033	%55/00	-	p>0/05
ونیرو	سولفید هیدروژن	0/01	0/005	0/005	%50	+	p>0/05
استخر	سولفید هیدروژن	0/02	0/0034	0/016	%83/00	+	p>0/05

بحث

بهنگام 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 بوجود آمده که دارای اثرات سوء بر آبزیان مختلف می باشد. 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، سولفید سدیم، کاهش شیوع بیماری و افزایش بقاء و در نتیجه افزایش تولید می شوند. 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 اوزن، کلر، عوامل اکسید کننده وغیر 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 از آن مفید و موثر می باشد(۱۰،۱۴و 15). استفاده از میکروارگانیسمها به منظور کاهش آلاینده‌های مختلف از جمله SH_2 بایستی به عوامل مختلف از جمله نوع میکروارگانیسم ، دوز و روش مورد استفاده، دما، pH، سیستم هواده و غیره توجه نمود، زیرا فاکتورهای ذکر شده جزء فاکتورهایی هستند که در ارتباط مستقیم با افزایش و یا کاهش واکنش‌های تجزیه ای دارند. در این تحقیق فاکتورهای مذکور به نوعی در مراحل مختلف دخالت داده شده‌اند که در ذیل به آن اشاره می‌گردد. در این مطالعه از دو باکتری *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و *پاراکوکوس دنیتریفیکانس* استفاده گردید. باکتریهای مذکور از ایستگاههای نمونه برداری جدا شده و با استفاده از تستهای بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفتند. علت جستجو و انتخاب این دو باکتری در مزارع پرورش ماهیان گرمابی، توانایی رشد آنها در شرایط هوازی و بیهوازی، توانایی احیاء نیترات به نیتریت و در برخی موارد N_2 بوده است. بنابراین دو باکتری فوق، سویه های مناسبی از باکتریهای اکسیدکننده SH_2 بوده و می توانند بعنوان میکروارگانیسمهای مفید در کنار باکتریهای اکسیدکننده آمونیاک (نیترو باکترها و نیتروزوموناسها) و احیاء کننده نیترات و نیتریت (باسیلوسها و سودوموناسها) (بصورت سینرژیسم) مورد استفاده قرار گیرند (16- 18). امروزه در بسته های تجاری پروبیوتیک موسوم Alken Clear-Flo 1000 و Alken Clear-Flo 1002 از *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس*، *باسیلوس*، *نیتروزوموناس آروپیا* و *نیتروباکتر وینوگرادسکی* به منظور کاهش گازهای سمی و بهینه نمودن پرورش میگو استفاده می شود (8).

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 3 مک فارلند (ضریبی از 10^8) بوده که بمقدار 5% به محیط پایه اضافه می گردد. در اکثر بسته های پروبیوتیک نظیر پروبیوتیک Alken-Murray از دوزهای فوق استفاده می گردد(8 ،17). باکتریهایی که در این غلظت مورد استفاده قرار می گیرند اولا دارای تعداد مشابه باکتریهای طبیعی استخر پرورش ماهی بوده

ثانیا فاقد عوارض جانبی و بیماریزایی برای آبزیان بوده و ثالثا رشد و تکثیر باکتریهای مفید را تقویت کرده و باعث بهینه نمودن محیط استخر می گردند(14، ۱۷،۱۸). در این مطالعه دوز مورد استفاده دو باکتری *تیوباسیلوس و پاراکوکوس* معادل 3 مک فارلندو بمقدار 5% بوده است. در استفاده از پروبیوتیک از روشهای مختلفی استفاده شده که می توان به شکل تازه و لیوفیلیزه اشاره نمود(4 ،18). 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 می شود. در این تحقیق ، باکتریهای شاخص به دو شکل تازه و لیوفیلیزه مورد استفاده قرار گرفته و نتایج نشان داد که ارتباط معنی داری بین فرمهای ذکر شده وجود ندارد. Austin در سال 1995 گزارش کرد که استفاده از سویه *ویبریو آلژینولیتیکوس* بشکل لیوفیلیزه باعث کاهش باکتریهای بیماریزا نظیر *ویبریو اوردالی*، *ویبریو آنگوئیلاروم*، *آئروموناس سالمونیسیدا* و *یرسینیا راکری* می‌گردد (5). در مطالعات انجام شده توسط Rengpipat و همکارانش در سال 2000 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 حد5-6mg/l ، 7/9-8/2 ،0-0/5mg/l ،0-1/2 mg/l ،0-2/5 mg/l و 2-3 mg/l نگه داشته است(15). 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. دو باکتری مورد استفاده هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بیهوازی قادر به تجزیه سولفید سدیم می باشند. Gatesoupe و همکارانش در سال 1999 گزارش کردند که بهنگامیکه باکتریهای فتوسنتتیک نظیر رودوموناس به آب مزرعه پرورش ماهی اضافه گردد باعث حذف آمونیاک، SH_2 ، اسیدهای آلی و سایر مواد مضر شده و کیفیت آب را افزایش داده و به متعادل نمودن pH کمک می کنند(8). برای مهیا نمودن شرایط رشد باکتری نیاز به فاکتورهای مختلف نظیر دما و pH می باشد. 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 می باشد. باکتریهای اکسید کننده سولفید سدیم بطور معمول در دمای 25 - 35 درجه سانتی گراد قادر به رشد بوده ولی pH اپتیمم برای رشد اکثر گونه های این گروه 2 تا 3 می باشد. دو گروه از باکتریهای جدا شده که قادر به رشد در pH های بالاتر بوده (6 تا 9)، باعث تقویت رشد باکتریهای نیتریفیه کننده شده ، در فرآیند دنیتریفیکاسیون دخالت داشته و در شرایط هوازی و بیهوازی قادر به رشد می باشند(17- 20). هیچگونه اختلاف معنی داری بینpH های مورد استفاده در سایر موارد مشاهده نشده است. باکتریها بر اساس نیاز به اکسیژن به گروههای مختلفی تقسیم بندی شده که می توان به هوازی اجباری، هوازی اختیاری، بیهوازی اختیاری، بیهوازی اجباری و غیره 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 سولفید سدیم 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 معنی دار بوده است. این امر بدلیل توانایی رشد دو باکتری جدا شده در حالتهای هوازی و بیهوازی می باشد.

تغییرات میزان SH_2 در آکواریوم ، ونیرو و استخر معنی دار 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 می باشند. 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، می توان پیش بینی نمود که باکتری با گذشت زمان قادر به کاهش املاح معدنی اضافه شده گردد(8 ، ۱۰،۲۱، 22). تغییرات کلی فاکتورهای مورد بررسی در فاز آزمایشگاهی دارای اختلاف معنی دار بوده است ($P < 0/001$).

در تهیه تیمارهای مختلف در آکواریوم ، از آب استخر استفاده شده و املاح معدنی سولفید سدیم با غلظت مشخص به آن اضافه گردید. نتایج نشان داد که میزان SH_2، کاهش یافته

است. نتیجه فوق نشان می دهد که باکتریهای اکسیدکننده در حضور باکتریهای طبیعی استخر قادر به کاهش گازهای سمی بوده و بعبارت دیگر هیچ گونه اثر آنتاگونیسمی بر علیه یکدیگر نشان نمی دهند. 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 می دهند (8، 17، 18، 24،23).

نتیجه گیری

با توجه به توانایی باکتریهای جداشده (*تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* و *پاراکوکوس دنیتریفیکانس*) ، می توان از آنها بعنوان باکتریهای پروبیونت، در کنار باکتریهای شرکت کننده در فرآیند نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون استفاده کرده و بصورت ترکیبی مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از موسسه تحقیقات شیلات ایران که کلیه حمایت مالی، آزمایشگاهی وعلمی این تحقیق را در قالب پروژه فراهم آورده کمال سپا سگزاری به عمل می آید.

References

1- Ghoroghi A. Probiotic *use in human nutrition, animal and fish breeding*. Fishery Research Institute of Iran, the biotechnology sector. 2001.

2- Department of Statistics, Office of Fisheries Development Plan of Iran. Fishery Statistical Yearbook of Iran, Iranian Fisheries Development Project Office. 2004.

3- Fazli H. *Optimization Bbndanhay Mazandaran province*. Management and Planning.2002.

4- Ashraf A. *Probiotics in fish farming evaluation of a condidate bacterial mixture*. Ph.D thesis, Vattenbruk sinstitutionen, Slu. 2000. 901 83 Umca: P: 1-18.

5- Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, Effendi I, Griffith D R W. l. *A probiotic strain of vibrio alginolyticus effective in reducing diseases caused by Aeromonas salmonicide, vibrio anguillarum and vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 1995. 18, 93-96.

6- Fuller R. *History and development of probiotics*. 1992. In: Fuller, R. (Ed.), Exrlich Karl F, Biology filtration and aquaculture health maintenance.1995. File: III A\1 Biological filtration part 20.

7- Fuller R. *Problems and prospects*. In: Fuller, R. (Ed.), probiotics. The scientific basis. Chapman & Hall, London, UK, pp. 1992.377-386.

8- Holzapfel WH, Schillinger U. *Introduction to per and probiotics. Food Research International*. 2002. 35, pp: 109-116. Kall, F.

9- 9 - Klaenhammer TR, Kullen M J. *Selection and design of probiotics. International Journal of food Microbioloy*. 1999. Volume 50, Issues 1–2, Pages 45–57.

10- 10-Gatesoupe F J. *The use of probiotics in aquaculture: a review Aquaculture*. 1999.180: 147-165.

11- 11-Hamnes W, weiss P.*The genera lactobacillus and cornobacterium*. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 1992. Vol. II. Springer, New York, pp. 1536-1594.

12- Karl F, Ehrilch HP. *Bacterial quantification and Assessment of Heterotrophic and Nitrifying Bacteria in cycle Biological Supplement*. 1993.

13- 13- Garrity G M, Bell JA, Lilburn TG. *Bergey,s manual of systematic bacteriology* , second edition.Release 5.0 . 2004.

14- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasaveta P. *Immunity enhancement in black tiger shrimp (Penacus monodon) by a probiont bacterium (Bacillus spp.)*. Aquaculture. 2000.191, 271-288.

15- 15-Montes A J, Pugh D E. *The use of probiotics in food – animal practice*. Vet. Med. 1993.88, 282-288.

16- Naida A S. *Clemens R A. Probiotics CRC press*. 2000. P; 432-457.

17- Skano Y, Kerkhof L. *Biofilter microbes*. final project (Rpbert, University of Minnesoata Contract Number 417121). 1999.

18- Verstraete W. *Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture.American Society for Microbiology*, vol .2000. 64 No.4 655-671.

19- Xiang-Hong W, Jun L, Wei-Shang J, Huai-Shu X. *Application of probiotics in Aquaculture*. 1999.Ocean University of Qingdao, China.

20- Cytryn E, Minz D, Gelfand I, Neori A, Gieseke A, Beer D, and Rijn J v. *Sulfide-Oxidizing Activity and Bacterial Community Structure in a Fluidized Bed Reactor from a Zero-Discharge Mariculture System*. Environmental Science & Technology.2005.
21- Sorokin DY, Tourova1 TP, Lysenko A M, Muyzer G . *Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. Journal of microbiology*. 2006.
22- García L B C, Blanco GG, Meraz M. *Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a down-flow fluidized bed reactor*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2008.Volume 83, Issue 3, pages 260–268.
23- Rabaey K, Sompel KV, Maignien L, Boon N, Aelterman P, Clauwaert P, et al .*Microbial Fuel Cells for Sulfide Removal*. Environmental Science & Technology.2006.
24- Bosch P L, Sorokin F DY, Buisman CJN, Janssen A J H. *The effect of pH on thiosulfate formation in a biotechnological process for the removal of hydrogen sulfide from gas streams*. Environmental Science & Technology.2008.