Isolation and identification of sulfur oxidizing bacteria in agricultural soil and evaluating sulfur oxidation yield

Mahdi Sadeghi Pour Marvi
PhD student of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj, Iran, msadeghipour@ut.ac.ir
Ahmad Ali Pourbabaee *
Associate Professor of Microbiology, Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, pourbabaei@ut.ac.ir
Hosein Ali Alikhani
Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj, Iran, halikhan@ut.ac.ir
Ahmad Haidari
Professor of Mineralogy, Department of Soil Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj, Iran, ahaidari@ut.ac.ir
Zahra Manafi
Research and development office, Sarcheshmeh Copper Complex, Kerman, Iran, z.manafi@gmail.com

Abstract

Introduction: Sulfur oxidizing bacteria are important in agriculture. The aim of this study was to identify the sulfur oxidizing bacteria in Sarcheshmeh (Kerman, Iran) agricultural soil.

Materials and methods: Sampling was conducted from agricultural soil in Kerman province, Iran. After enrichment, samples were purified in the basic mineral culture containing sulfur as the only source of energy. Sulfur oxidation capability was evaluated based on the variation of pH and sulfate content and then strains of sulfur oxidizing were isolated and identified using morphological characteristics and phylogenic techniques. The best strains were selected and were evaluated for variation of pH and sulfate content by isolates in different pH and temperature.

Results: Six sulfur-oxidizing strains were isolated and identified which had similarity to *Thiobacillus* and *Starkeya* genous. Isolates of 103, 129, 190 and 158 were mesophyll and neutrophil, but isolates of 192 and 156 were thermophile and alkalophill. Of these isolates, isolate 103 was 99.86% similar to *Starkeya novella*, identified as superior isolate, due to the most sulfur oxidation capability in the synthetic mineral medium containing sulfur.

Discussion and conclusion: Isolate 103 was able to grow in neutral to slightly alkaline conditions with pH 7.5. Most of the growth of this isolate was at 30 ° C as aerobic. This isolate was facultative chemolithotroph and the results of this research showed capacity of the isolate for oxidizing sulfur, so that it could be used as a practical isolate in bio-fertilizers for neutral to alkaline and saline conditions in agriculture.

Key words: Soil, Sulfur Oxidizing Bacteria, *Thiobacillus*

* Corresponding author
Received: January 11, 2016/ **Accepted:** July 3, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱۱۳- ۱۲۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد در خاک کشاورزی و بررسی عملکرد اکسایش گوگرد

مهدی صادقی پور مروی: دانشجوی دکتری، بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، msadeghipour@ut.ac.ir
احمد علی پوربابایی *: دانشیار میکروبیولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، pourbabaei@ut.ac.ir
حسینعلی علیخانی: استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، halikhan@ut.ac.ir
احمد حیدری: استاد مینرالوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ahaidari@ut.ac.ir
زهرا منافی: مربی پژوهش بخش هیدرومتالورژی، مجتمع مس سرچشمه، شرکت ملی صنایع مس ایران، z.manafi@gmail.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد در کشاورزی، اهمیت زیادی دارند. هدف این پژوهش، شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد در شرایط خاک کشاورزی منطقهٔ مس سرچشمه کرمان بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از خاک کشاورزی در منطقهٔ مس سرچشمه کرمان انجام شد. بعد از غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط پایهٔ معدنی دارای گوگرد به‌عنوان تنها منبع انرژی، مجموعهٔ میکروبی حاصل، خالص‌سازی شد و توانایی اکسایش گوگرد براساس تغییر اسیدیته و سولفات مورد ارزیابی قرار گرفت؛ سپس جدایه‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و تکنیک‌های تبارزایی، جداسازی و شناسایی شدند. بهترین جدایه‌ها انتخاب شدند و تغییرات pH و سولفات توسط جدایه‌ها در درجه حرارت و pH مختلف بررسی شد.

نتایج: ۶ جدایهٔ اکسیدکنندهٔ گوگرد جداسازی و شناسایی شدند که با جنس‌های *تیوباسیلوس* و *استارکی* شباهت تبارزایی نشان دادند. چهار جدایهٔ ۱۰۳، ۱۲۹، ۱۹۰ و ۱۵۸، مزوفیل و خنثی‌دوست بودند؛ درحالی‌که دو جدایهٔ ۱۹۲ و ۱۵۶، میانه دوست و قلیادوست بودند. از میان این جدایه‌ها، جدایهٔ ۱۰۳ با ۹۹/۸۶درصد شباهت تبارزایی به سویهٔ *استارکی نوولا*، به‌علت بیشترین توانایی اکسایش گوگرد در محیط پایهٔ معدنی حاوی گوگرد، به‌عنوان جدایهٔ برتر شناسایی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: جدایهٔ ۱۰۳ قادر به رشد در شرایط خنثی تا نسبتاً قلیایی با اسیدیتهٔ ۷/۵ بود. بیشترین رشد این جدایه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و به‌صورت هوازی بود. این جدایه، کمولیتوتروف اختیاری بود و نتایج این پژوهش، نشان‌دهندهٔ ظرفیت بالای این جدایه برای اکسیدکنندگی گوگرد بود که می‌تواند به‌عنوان جدایه‌ای کاربردی در کودهای زیستی کشاورزی در شرایط خاک خنثی تا قلیایی و شور استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: خاک، باکتری اکسیدکنندهٔ گوگرد، *تیوباسیلوس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گوگرد، دهمین عنصر موجود در پوستهٔ زمین است که در ساختار اسید آمینه، به‌صورت گروه سولفیدریل و پل‌دی‌سولفیدی، در اقیانوس‌ها به‌صورت سولفات، در جو زمین به‌صورت گاز اکسید گوگرد و در سنگ و خاک، به‌صورت کانی سولفیدی وجود دارد (۱). pH خنثی تا قلیایی خاک‌های کشور، باعث عدمِ‌انحلال عناصر غذایی موجود در خاک، برای استفاده گیاه می‌شود و درنتیجه، استفاده از باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد، ضمن تأمین غذایی گیاه به گوگرد، با اسیدی کردن محیط، به افزایش فراهمی سایر عناصر غذایی و درنتیجه بهبود رشد گیاه می‌انجامد (۲)در این میان، استفاده از باکتری‌های بومی خاک، ضمن داشتن رقابت‌پذیری بالا، امکان سازگاری با شرایط اقلیمی محیط را بیشتر از گونه‌های غیربومی دارند و از این جهت، بیشتر مورد توجه هستند (۳) از طرفی، سینتیک پایین واکنش تبدیل گوگرد به سولفات، موجب شده است تا توجه خاصی به باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد معطوف شود؛ به‌طوری که کاربرد کود گوگرد به تنهایی، تأثیر معنی‌داری بر کشت گیاه در کشاورزی نداشته است (۴)بدین ترتیب، توصیه کودی گوگرد در کشاورزی، باید همراه با توصیه کاربرد مایهٔ تلقیح حاوی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد باشد تا تأثیر آن بر عملکرد گیاه معنی‌دار شود (۵)؛ از طرفی، عملکرد باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد نیز متفاوت است. برخی تندرشد هستند و توانایی اکسیدکنندگی بالایی دارند و برخی کندرشد هستند و توانایی اکسیدکنندگی پایینی دارند. به‌طور کلی، توانایی اکسیدکنندگی گوگرد در جدایه‌های گرمادوست و اسیددوست بیشتر از جدایه های خنثی‌دوست معتدل‌دوست است (۶)این توانایی متفاوت آنها در اکسیدکنندگی گوگرد، با ژن‌های موجود در ژنوم این میکروارگانیسم‌ها ارتباط دارد (۷). جنس‌های مختلفی توانایی اکسیدکنندگی گوگرد را دارند؛ به‌عنوان مثال *استارکی*[1]، *تیوباسیلوس*[2]، *اسیدی فیلوم*[3]، *اسیدیانوس*[4] و *سولفولوبوس*[5](۸).

هدف این پژوهش، بررسی عملکرد جدایه‌های مختلف اکسیدکنندهٔ گوگرد بود که بدین منظور به جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد از خاک کشاورزی اقدام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد، نمونه‌برداری از خاک کشاورزی محدودهٔ اطراف معدن مس سرچشمه کرمان انجام شد. ۱۴ نمونه خاک در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آزمایش های شیمیایی شامل اسیدیته و شوری خاک ها توسط دستگاه اسیدیته‌سنج و هدایتِ الکتریکی‌سنج مدل یونیکم[6] اندازه گیری شدند. غنی‌سازی نمونه ها روی محیط پایهٔ معدنی 9k که گوگرد به‌عنوان تنها منبع انرژی به آن اضافه شده بود، انجام شد (۹). محیط پایهٔ معدنی (گرم‌درلیتر) شامل K_2HPO_4 ۰/۵، KCl ۰/۱، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵، $Ca(NO_3)_2$ ۰/۰۱، $(NH_4)_2SO_4$ ۳ و $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۰۱ به‌همراه ۱ گرم‌درلیتر گوگرد بود. شرایط اسیدیتهٔ محیط کشت شامل ۳ تا ۹ و دمای محیط کشت ۲۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد تعیین شد تا شرایط برای جداسازی باکتری‌های اسیددوست و خنثی‌دوست (۱۰) و همچنین معتدل‌دوست و گرمادوست معتدل مهیا باشد (۱۱).

جداسازی کشت مخلوط میکروبی: یک گرم از نمونه‌های خاک با ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت 9k حاوی ۱ گرم گوگرد در لیتر، در داخل ارلن ۲۰۰میلی‌لیتری ریخته شد و به‌مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد در همزن با دور ۱۲۰ rpm گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، مقدار ۲۰۰ مایکرولیتر از محیط پیش کشت 9k ۲ هفته ای، به محیط کشت جدید منتقل گردید و گرماگذاری انجام شد. این عمل برای هر نمونه ۵ بار تکرار شد و درنهایت، محیط هایی با پتانسیل اکسیداسیون- احیا حداکثر و رشد میکروبی آن براساس میزان کدورت (جذب نور در طول‌موج ۶۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر)، جهت جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها انتخاب شد (۱۲).

خالص‌سازی: به‌منظور خالص‌سازی جدایه ها از کشت مخلوط میکروبی، رقت های متوالی تا 10^{-6} تهیه شد و به محیط کشت آگار 9k، منتقل گردید و به‌روش ریختن در پلیت[۷] و با استفاده از میلهٔ U شکل، در پلیت به‌طور یکسان پخش شد. پلیت ها به‌مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد گرمگذاری شدند و بعد از این مدت، کلنی‌های رشدکرده، در محیط کشت جدید دیگر به‌روش خطی، کشت داده شدند. در این مرحله بر مبنای تفاوت های ریخت‌شناسی کلنی‌ها از قبیل رنگ، شکل و اندازهٔ کلنی، خالص‌سازی جدایه ها انجام شد. به‌منظور اطمینان از خالص‌بودن نمونه‌ها ۵ مرحله تجدید کشت انجام شد (۱۳).

انتخاب جدایهٔ برتر: به منظور ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد توسط جدایه‌ها، کلنی‌های خالص‌سازی‌شده در مرحلهٔ قبل، به محیط کشت مایع پایهٔ معدنی 9k، منتقل شدند و بر مبنای تغییر اسیدیته و سولفات محیط، ارزیابی شدند. در این مرحله، بهترین جدایه از نظر توانایی اسیدی‌کردن محیط و همچنین تولید سولفات، انتخاب شد. سنجش سولفات به‌روش کدورت‌سنجی با کلرید باریم انجام گرفت.

بررسی تغییرات pH و سولفات توسط جدایه های مورد آزمایش: به‌منظور تعیین pH و درجه حرارت مناسب برای اکسایش گوگرد، تیمارهای دمایی ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد و همچنین تیمارهای اسیدیتهٔ ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹/۵ (۱۴) با دور شیکر ۱۲۰ rpm در محیط کشت پایهٔ معدنی 9k در ۳ تکرار اعمال شد. تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه های اکسیدکنندهٔ گوگرد: برای شناسایی مولکولی جدایه های موردنظر، از نشانگر *16SrRNA* استفاده شد. بدین منظور ابتدا زیست‌توده از جدایه‌ها تهیه شد و سپس با استفاده از کیت شرکت توپارژن[۸] مطابق دستورالعمل شرکت ذکرشده، به استخراج DNA اقدام شد. سنجش کیفی DNA، با الکتروفورز ژل آگاروز ۱درصد و سنجش کمی DNA، با استفاده از نانودراپ[۹] و با محاسبهٔ نسبت ۲۶۰/۲۸۰ nm انجام شد. PCR و تکثیر ژن مربوطه با استفاده از پرایمرهای ۲۷f (۳′-´۵AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-) و ۱۴۹۲r (۵´-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-۳′) انجام شد و تأیید آن به‌وسیلهٔ الکتروفورز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۵۰ مایکرولیتر انجام شد که ۵ مایکرولیتر بافر 1X PCR، ۵ مایکرولیتر بافر $MgCl_2$ با غلظت برابر ۲ میلی‌مولار، ۴ مایکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰۰ مایکرومولار، ۲/۵ مایکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت با غلظت ۰/۵ مایکرومولار، ۱

مایکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز U/µl ۰/۰۲، ۱ مایکرولیتر DNA و ۲۹ مایکرولیتر آب مقطر استفاده شد. برای تأیید PCR، از شاهد منفی در PCR استفاده شد که در شرایط مشابه و به جای DNA آب اضافه شده بود، استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرح زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخهٔ تکرارشونده شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتیگراد به‌مدت ۵۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲ دقیقه و پس از اتمام این ۳۰ چرخه، برای سنتز نهایی، مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در مرحلهٔ بعد، محصول PCR با استفاده از کیت فرمنتاز[10] و مطابق دستورالعمل شرکت گفته شده، کلون گردید و با استفاده از دستگاه سکوئنسر[11] (توسط شرکت ماکروژن کره) توالی یابی شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas ۲/۰۱ (Technelysium Pty Ltd) ویرایش شد و با استفاده از نرم‌افزار BLASTn با توالی‌های معتبر ثبت‌شده در پایگاه ژنی NCBI مقایسه شد و نزدیک‌ترین جدایه براساس مشابهت در توالی ژن *16SrRNA* شناسایی گردید. تحلیل تبارزایی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد (۱۵). در مرحلهٔ بعد، رسم درخت تبارزایی با استفاده از الگوریتم Neighbour Joining انجام شد (۱۶)

نتایج

مشخصات شیمیایی خاک‌های موردبررسی، در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین اسیدیتهٔ خاک ها ۷/۸۹ و هدایت الکتریکی خاک‌ها ۳/۱۸ دسی‌زیمنس بر متر بود. خاک موردآزمایش، اسیدیتهٔ خنثی تا نسبتاً قلیایی داشت و شور بود.

جدول ۱- مشخصات اسیدیته و شوری خاک‌های موردبررسی

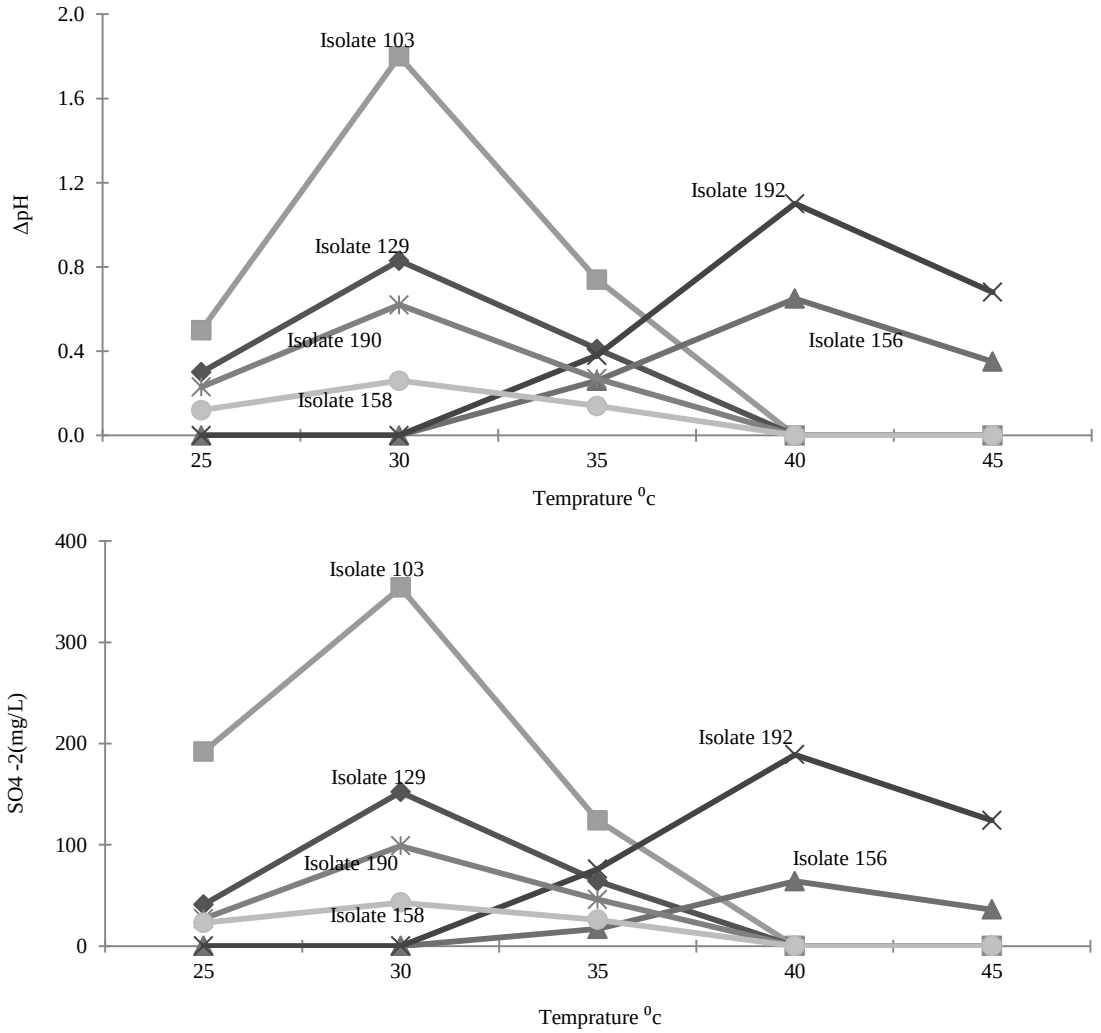
پارامتر	نمونه‌ها														میانگین
	۱S	۲S	۳S	۴S	۵S	۶S	۷S	۸S	۹S	۱۰S	۱۱S	۱۲S	۱۳S	۱۴S	
pH	۷/۸۹	۷/۸۴	۷/۸۴	۷/۸۹	۷/۸۹	۷/۸۶	۷/۸۹	۷/۸۹	۷/۸۹	۷/۹۷	۷/۹۹	۷/۹۲	۷/۸۷	۷/۸۹	۷/۸۹
EC(dS/m)	۳/۱۸	۳/۱۹	۳/۱۹	۳/۲۱	۳/۱۸	۳/۱۹	۳/۱۹	۳/۱۸	۳/۱۹	۳/۱۰	۳/۱۹	۳/۲۲	۳/۱۰	۳/۲۰	۳/۱۸

در مرحلهٔ غنی‌سازی، از محیط‌های کشت که به‌وسیلهٔ نمونه ها تلقیح شده بودند و کدورت ایجاد کرده بودند، ۶ جدایه با توانایی اکسایش گوگرد خالص‌سازی شد و توانایی آنها در شرایط یکسان محیط (اسیدیتهٔ ۷، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، ۱۲۰ rpm)، از نظر تغییر اسیدیته و تولید سولفات مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲) که از این میان، جدایهٔ ۱۰۳ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد و سویه‌های ۱۹۲ و ۱۵۶ گرچه قادر به رشد روی محیط کشت بودند، در شرایط دمایی و اسیدیتهٔ موجود (درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد و اسیدیتهٔ ۷/۵) قادر به اکسایش گوگرد و تغییر اسیدیته و سولفات محیط کشت نبودند که در مرحلهٔ بعدی آزمایش، شرایط بهینهٔ دما و اسیدیتهٔ آنها برای رشد و اکسایش گوگرد، تعیین شد.

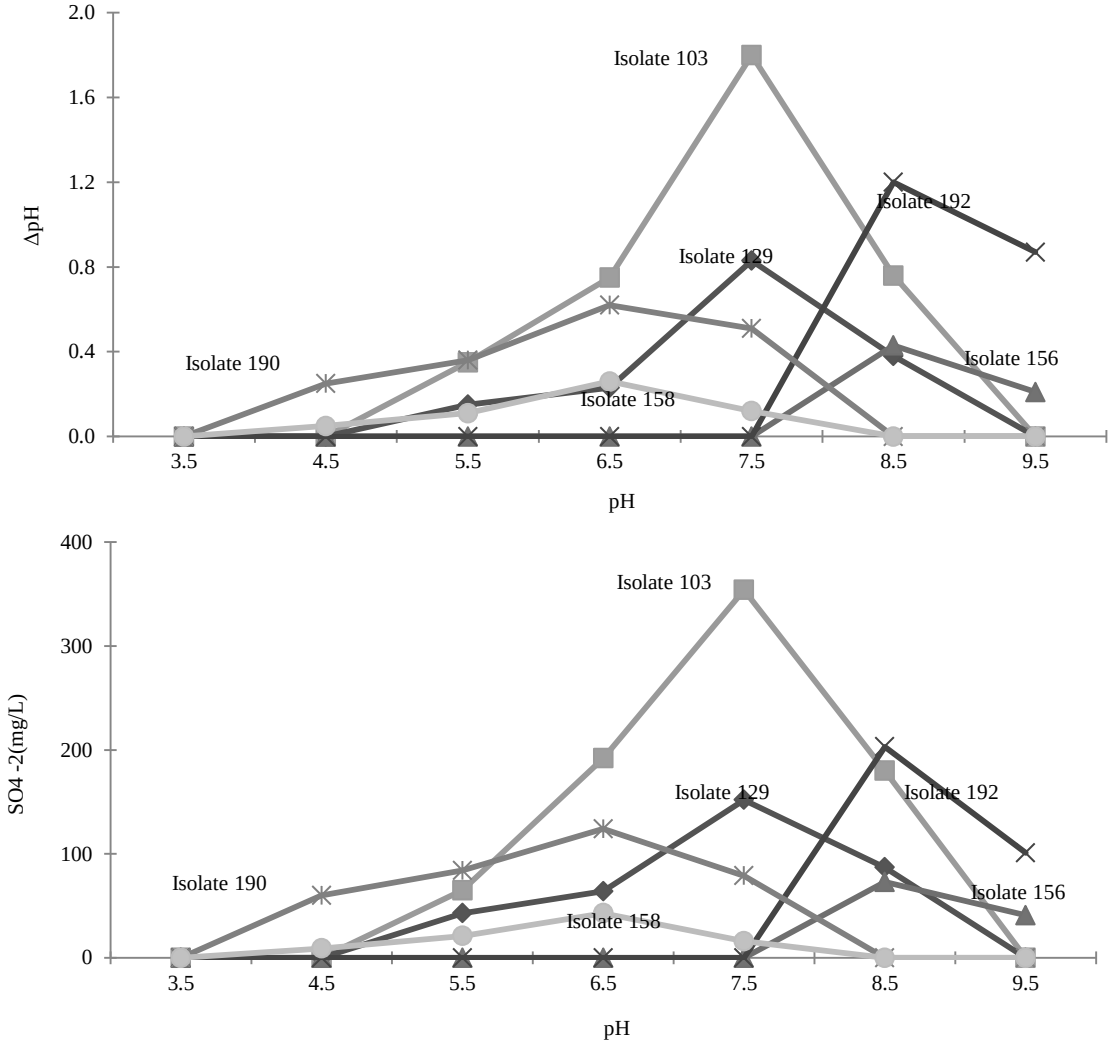
جدول ۲- توانایی جدایه‌ها برای تغییر اسیدیته و تولید سولفات در شرایط محیطی یکسان (اسیدیتهٔ ۷ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و ۱۲۰ rpm)

سویه	تغییرات pH	تغییرات سولفات (mg S/L)
۱۵۸	۰/۲۶	۴۳
۱۹۰	۰/۶۲	۹۹
۱۹۲	۰	۰
۱۵۶	۰	۰
۱۲۹	۰/۸۳	۱۵۲
۱۰۳	۱/۸۰	۳۵۴

بررسی تغییرات pH و سولفات برای جدایه‌های موردآزمایش (با هدف تعیین pH و درجه حرارت مناسب برای اکسایش گوگرد): در مرحلهٔ بعد، برای اینکه حداکثر توان اکسایش گوگرد توسط جدایه‌ها تعیین شود، تغییرات pH و سولفات برای جدایه های موردآزمایش به‌وسیلهٔ اعمال تیمارهای مختلف دمایی و اسیدیته طی مدت ۲ هفته تعیین شد (شکل ۱).



(الف) تغییرات pH و سولفات در اسیدیتهٔ ثابت (pH ۷/۵) توسط جدایه‌های مختلف در محیط کشت 9k در دماهای ۴۵-۲۵ درجه سانتیگراد



(ب) تغییرات pH و سولفات در درجه حرارت ثابت (۳۰ درجه سانتیگراد) توسط جدایه‌های مختلف در محیط کشت 9k در pH ۹/۵-۳/۵

شکل ۱- تغییرات pH و سولفات برای جدایه‌های موردآزمایش بعد از ۲ هفته (برای تعیین pH و درجه حرارت مناسب برای اکسایش گوگرد) توسط جدایه‌های مختلف در محیط کشت 9k در pH و درجه حرارت ثابت

براساس نتایج شکل ۱ (الف)، در شرایطی که اسیدیتهٔ محیط کشت ۷ باشد، جدایه‌های موردبررسی از نظر دمای بهینهٔ رشد به دو گروه تقسیم شدند؛ به‌طوری که جدایه‌های ۱۰۳، ۱۲۹، ۱۹۰ و ۱۵۸ در گروه مزوفیل (۳۰ درجه سانتیگراد) و جدایه‌های ۱۹۲ و ۱۵۶ در گروه میانه دوست (۴۰ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند. همچنین از شکل ۲ (ب) چنین بر می‌آید که جدایه‌های موردبررسی از نظر اسیدیتهٔ بهینهٔ رشد، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول که خنثی‌دوست بودند (اسیدیتهٔ ۷/۵) شامل جدایه‌های ۱۰۳، ۱۲۹، ۱۹۰ و ۱۵۸ بودند و گروه دوم که قلیادوست بودند (اسیدیتهٔ ۸/۵) شامل جدایه های ۱۹۲ و ۱۵۶ بودند. بدین ترتیب براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، چهار جدایهٔ ۱۰۳، ۱۲۹، ۱۹۰ و ۱۵۸، مزوفیل و خنثی‌دوست بودند؛ درحالی‌که دو جدایهٔ ۱۹۲ و ۱۵۶، میانه دوست و قلیادوست بودند.

ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد براساس میزان توانایی تغییر اسیدیتهٔ محیط کشت و تولید سولفات در این جدایه‌ها نشان داد (شکل ۱، الف و ب) در شرایط مزوفیل و خنثی‌دوست، جدایهٔ ۱۰۳ و در شرایط میانه دوست و قلیادوست، جدایه ۱۹۲ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان دادند. همچنین از میان دو جدایهٔ ۱۰۳ و ۱۹۲، جدایهٔ ۱۰۳ توانایی بیشتری برای اکسایش گوگرد داشت. دامنهٔ تغییرات اسیدیته در پژوهش حاضر حدود ۲ است که این نتیجه، با سایر پژوهش‌ها هم‌خوانی داشت (۱۷).

شناسایی مولکولی: نتایج تعیین توالی ژن *۱۶SrRNA* جدایه‌های موردنظر و مقایسهٔ شباهت آنها با داده‌های معتبر ثبت‌شده در پایگاه NCBI، در جدول ۳ نشان داده شده است.

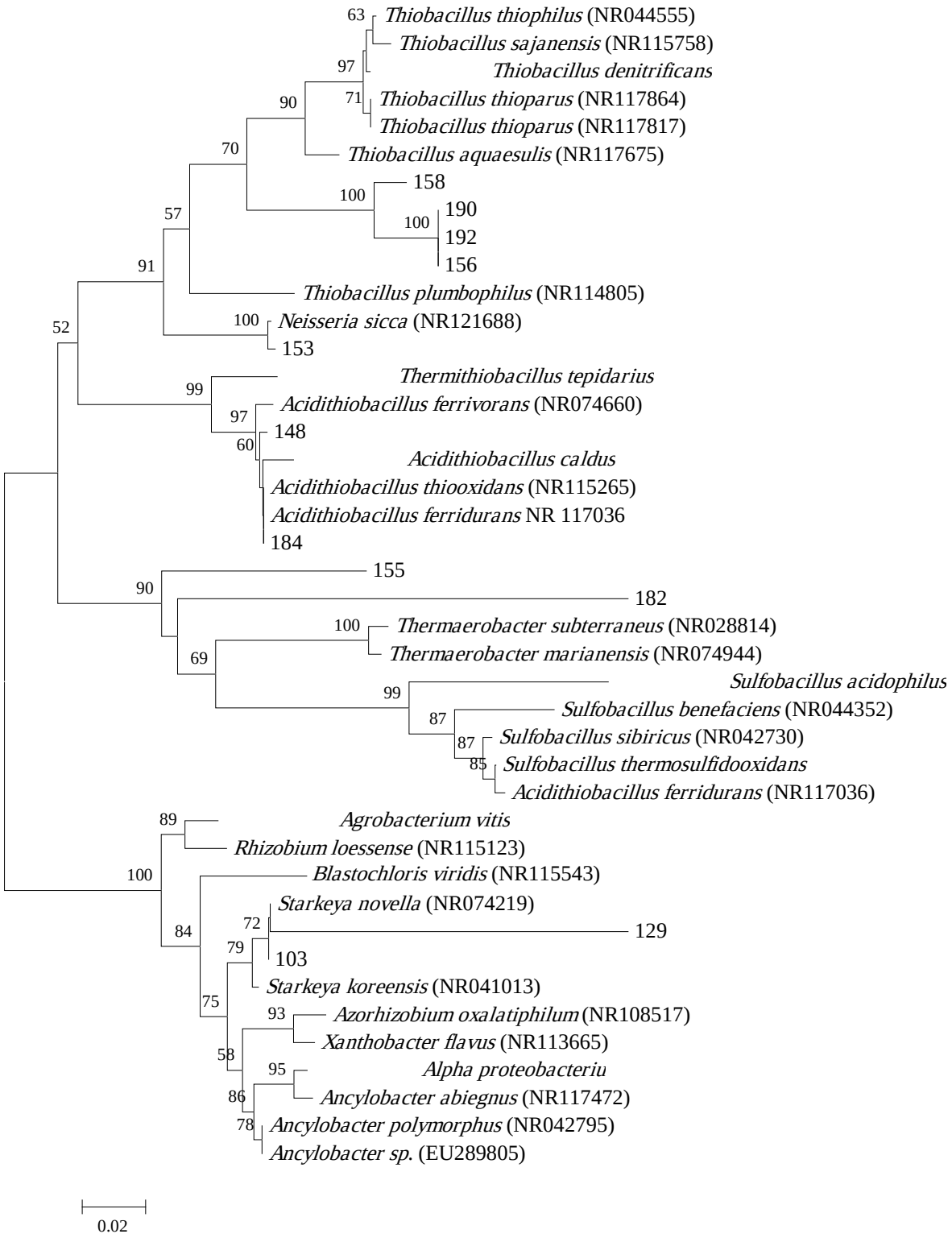
جدول ۳- مقایسهٔ میزان شباهت ژن *۱۶SrRNA* جدایه‌های موردآزمایش با سویه‌های استاندارد

نام جدایه	شماره دستیابی	درصد شباهت	سویهٔ استاندارد با بیشترین میزان شباهت	تاکسونومی
۱۵۸	KR020052	۹۳/۹	*Thiobacillus thiophilus NR 044555*	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Hydrogenophilales; Hydrogenophilaceae; Thiobacillus
۱۹۰	KR020051	۹۳/۹	*Thiobacillus thioparus NR 117817*	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Hydrogenophilales; Hydrogenophilaceae; Thiobacillus;
۱۹۲	KR020050	۹۹/۹	*Thiobacillus aquaesulis NR 117675*	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Hydrogenophilales; Hydrogenophilaceae; Thiobacillus
۱۵۶	KR020049	۹۴/۱	*Thiobacillus aquaesulis NR 117675*	
۱۲۹	KR020043	۹۵/۳	*Starkeya novella NR 074219*	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Starkeya; Starkeya novella
۱۰۳	CP002026	۹۹/۸۶	*Starkeya novella NR 074219*	

براساس نتایج مشاهده‌شده در جدول ۲، دو جدایهٔ ۱۰۳ و ۱۲۹ به‌ترتیب ۹۹/۸۶ و ۹۵/۳درصد با سویهٔ *استارکی نوولا* شباهت تبارزایی داشتند و جدایه‌های ۱۹۰ و ۱۵۸ به‌ترتیب ۹۳/۹ و ۹۳/۹درصد با سویه‌های *تیوباسیلوس تیوپاروس*[۱۲] و *تیوباسیلوس تیوفیلوس*[۱۳] شباهت تبارزایی داشتند. دو جدایهٔ ۱۹۲ و ۱۵۶ نیز به‌ترتیب ۹۹/۹ و ۹۴/۱درصد با سویهٔ *تیوباسیلوس اکواسولیس*[۱۴] شباهت تبارزایی داشتند. همچنین، درخت تبارزایی جدایه‌های موردنظر براساس روش Neighbor-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA۶ ترسیم شد (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، استفادهٔ بهینه از باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد صنایع مختلف از قبیل فروشویی معادن فلزی، تصفیهٔ خانه‌های شهری و همچنین تهیهٔ کودهای زیستی در کشاورزی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. استفاده از این باکتری‌ها در کشاورزی علاوه بر تأمین گوگرد موردنیاز گیاه، با اسیدی‌کردن محیط، به جذب سایر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه نیز، کمک می‌کند و استفاده از این کودهای زیستی، ضمن افزایش عملکرد در گیاه، اثرات زیست محیطی منفی برخی کودهای شیمیایی را نیز در پی‌نخواهد داشت (۱۹، ۱۸، ۲)بدین ترتیب، نتایج حاصل از این پژوهش، می‌تواند برای تهیه کود زیستی کارگشا باشد که برای تحقیقات آتی، پیشنهاد می‌گردد.



شکل ۲- درخت تبارزایی جدایه‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد براساس روش Nighor-Joining منتج از آنالیز توالی‌های ژن *16S rRNA*. عدد نشان‌داده‌شده در گره‌ها، نشان‌دهندهٔ bootstrap ۱۰۰۰ است.

در این مطالعه، ۶ جدایه بررسی شد که دو جدایهٔ آن با سویهٔ *تیوباسیلوس اکواسولیس* (به‌ترتیب با ۹۹/۹ و ۹۴/۱درصد شباهت)، دو جدایهٔ دیگر با سویهٔ *استارکی نوولا* [15] (به‌ترتیب با ۹۹/۸۶ و ۹۵/۳درصد)، ۱ جدایه با سویهٔ *تیوباسیلوس تیوفیلوس* (با ۹۳/۹درصد) و ۱ جدایه نیز با سویهٔ *تیوباسیلوس تیوپاروس* (با ۹۳/۹درصد) شباهت تبارزایی نشان دادند. جدایه‌هایی که درصد شباهت تبارزایی آنها با سویه‌های شناخته‌شدهٔ قبلی، کمتر از ۹۹درصد بود احتمال دارد جدایه‌های جدیدی باشند که تأیید این مطلب، نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی دارد. در گزارش‌های دیگر نیز، این سویه‌های جنس تیوباسیلوس در خاک شناسایی شده بود (۲۰)و نتایج پژوهش حاضر، با نتایج دیگر پژوهش‌ها (۲۱)،دربارهٔ باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد از این جهت، هم‌خوانی نشان داد.

در طی فرآیند زیستی اکسایش گوگرد، محصولات متنوعی تولید می‌شود؛ ولی در هر حال محصول نهایی سولفات است (۲۲)که از این ترکیب در کنار شاخص تغییر اسیدیته، می‌توان در ارزیابی توان اکسایش گوگرد استفاده کرد. در این پژوهش نیز از توانایی تغییر اسیدیته و تولید سولفات برای ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد توسط باکتری‌ها، استفاده شد که این پارامترها، شاخص خوبی برای سنجش توانایی اکسایش گوگرد هستند (۲۳).

از میان این ۶ جدایه، جدایهٔ ۱۰۳ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد. جدایهٔ ۱۰۳، با ۹۵/۳درصد به سویهٔ *استارکی نوولا* شباهت تبارزایی داشت و بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را از میان تمامی جدایه‌ها نشان داد. این گونه که قبلاً *تیوباسیلوس نوولوس* [16] نام داشت (۲۴)و جنس وابسته به آن یعنی *تیوباسیلوس*، شناخته‌شده‌ترین جنس از باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد هستند که بیشتر در کلاس *بتاپروتئوباکتریا* قرار دارند و بیشترین مطالعات شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد نیز بر آنها انجام شده است (۲۴)؛ گرچه *تیوباسیلوس نوولوس* در کلاس آلفاپروتئوباکتریا قرار داشت (۲۴). در یک پژوهش، باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد، اسیدیتهٔ محیط را طی دو هفته تا ۸ واحد کاهش دادند و مقدار تولید سولفات تا ۲۰ میلی‌گرم گوگرد بر گرم گزارش شد (۲۵)که در پژوهشی دیگر، این مقادیر، میان ۱۰ تا ۴۰ میلی‌گرم گوگرد بر کیلوگرم خاک، طی مدت ۱۰ هفته گزارش شده بود (۲۶) براساس نتایج این پژوهش تغییرات سولفات و اسیدیته، کمتر از نتایج قبلی بود که می‌تواند به‌دلیل تفاوت در توانایی اکسایش گوگرد توسط باکتری‌ها باشد.

با وجود اینکه دربارهٔ گونه‌های مزوفیل *تیوباسیلوس* مطالعات زیادی صورت گرفته است، دربارهٔ گونه‌های ترموفیل آن مطالعات کمتری صورت گرفته است که از میان می‌توان به *تیوباسیلوس اکواسولیس* اشاره کرد (۲۷). در مطالعه‌ای (۲۸) باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد را *تیوباسیلوس تیوپاروس*، *تیوباسیلوس ورسوتوس* [17] و *تیوباسیلوس اکواسولیس* معرفی کردند که با نتایج پژوهش ما مشابهت داشتند.

براساس نتایج پژوهش حاضر، دو جدایهٔ ۱۰۳ و ۱۹۲ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان دادند که این آنالیز مولکولی نشان داد این دو جدایه به‌ترتیب ۹۹/۸۶ و ۹۹/۹درصد با *استارکی نوولا* و *تیوباسیلوس اکواسولیس* شباهت تبارزایی داشتند. همچنین براساس نتایج دیگری از پژوهش حاضر، از میان دو جدایهٔ ۱۰۳ و ۱۹۲، جدایهٔ ۱۹۲ شرایط سخت‌تر، یعنی دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و اسیدیتهٔ ۸/۵ را بهتر تحمل می‌کند که این نتایج نیز در دیگر پژوهش‌ها گزارش شده بود (۲ و ۲۹)؛ به همین دلیل این جدایه به‌عنوان یک باکتری میانه دوست و قلیادوست شناسایی شد. در پژوهش دیگری نیز،

تیوباسیلوس اکواسولیس به‌عنوان جدایهٔ برتر، انتخاب شده بود (۳۰).

آنزیم‌های مختلفی در اکسایش گوگرد دخیل هستند (۳۱). در *استارکی‌نوولا* آنزیم کلیدی cytochrome *c* از طریق مسیر TOMES[۱۸]، در اکسایش گوگرد دخالت دارد. تولید این آنزیم به‌وسیلهٔ بخشی از اپرون sox به‌نام soxAX انجام می‌گیرد (۳۲، ۳۳ و ۳۴). آنزیم اکسایش گوگرد در مزوفیل‌های اکسیدکننده گوگرد از قبیل *تیوباسیلوس تیوپاروس*، به دمای بالا حساس است و فعالیت خود را در این دماها از دست می‌دهد (۳۵ و ۳۶).بدین ترتیب، عدم‌رشد جدایهٔ ۱۰۳ در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتیگراد، ممکن است به‌دلیل کاهش فعالیت این آنزیم باشد.

یکی دیگر از دلایل تفاوت باکتری‌های اکسیدکنندهٔ گوگرد کلاس آلفا و بتا پروتئوباکتریا، مربوط به تنوع ژنی آنهاست (۳۲) ؛ به‌طوری که *آلفا پروتئوباکتریا*، اپرون کامل (sulfur oxidizing) sox را دارند؛ ولی *بتاپروتئوباکتریا*، اپرون sox را به‌طور ناقص دارند؛ یعنی ژن‌های کدکنندهٔ سولفور دهیدروژناز را ندارند و به جای آن سیستم احیای برگشتی سولفات[۱۹] را دارند (۳۷). در این پژوهش نیز، جدایهٔ ۱۰۳ (با ۹۹/۸۶درصد شباهت تبارزایی با *استارکی‌نوولا*) متعلق به آلفا پروتئوباکتریا بود ولی جدایهٔ ۱۹۲ (با ۹۹/۹درصد شباهت تبارزایی با *تیوباسیلوس تیوپاروس*) متعلق به بتا پروتئوباکتریا بود که این خود یکی دیگر از دلایل تفاوت عملکرد این دو باکتری بود.

با توجه به این نتایج و درنظرگرفتن این که دمای خاک کشاورزی در حد ۳۰ درجه سانتیگراد بود، در صورتی که اسیدیتهٔ خاک نیز در حد خنثی تا قلیایی باشد، کاربرد جدایهٔ ۱۰۳ برای تهیهٔ کود زیستی در کشاورزی، پیشنهاد می‌شود و از آنجایی که استفاده از جدایهٔ ۱۹۲، برای شرایط قلیایی و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد کاربرد دارد، استفاده از آن در دیگرصنایع مرتبط، پیشنهاد می‌شود.

در کشاورزی، فاکتورهای مختلفی از قبیل تعداد جمعیت میکروبی، تنوع جمعیت میکروبی، شرایط اقلیمی (از قبیل درجه حرارت، هوادهی، پتانسیل آب در خاک)، سطح ویژهٔ گوگرد در تماس با محیط، اندازهٔ ذرات، فراوانی باکتری‌های هترتروف موجود در محیط و فراوانی سوبسترای ترکیبات آلی و معدنی و نوع عملیات کشاورزی (۳۸، ۳۹ و ۴۰) در اکسایش گوگرد دخیل هستند. از آنجایی که پژوهش حاضر، از دیدگاه اکسایش مواد معدنی گوگردی مورد نظر بود، برای پژوهش‌های آتی، می‌توان نقش ترکیبات آلی در اکسایش گوگرد را نیز مورد توجه قرار داد.

در پژوهش حاضر، براساس نتایج شناسایی مولکولی و آزمایش های انجام‌شده، ۶ جدایهٔ اکسیدکنندهٔ گوگرد شناسایی شد که ۴ جدایهٔ آن (۱۰۳، ۱۲۹، ۱۹۰ و ۱۵۸)، مزوفیل و خنثی‌دوست بودند و به‌ترتیب ۹۹/۸۶، ۹۵/۳، ۹۳/۹ و ۹۳/۹درصد با سویه‌های *استارکی‌نوولا* ، *استارکی‌نوولا*، *تیوباسیلوس تیوپاروس* و *تیوباسیلوس تیوفیلوس* شباهت تبارزایی داشتند؛ درحالی‌که دو جدایهٔ دیگر (۱۹۲ و ۱۵۶)، میانه دوست و قلیادوست بودند و به‌ترتیب ۹۹/۹ و ۹۴/۱درصد با سویه‌های *تیوباسیلوس اکواسولیس* شباهت تبارزایی نشان دادند. از میان این ۶ جدایه، جدایهٔ ۱۰۳ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، با حمایت مالی شرکت ملی صنایع مس ایران (مجتمع مس سرچشمه، امور تحقیق و توسعه) انجام شد که بدین وسیله، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Benson SW. Thermochemistry and kinetics of sulfur-containing molecules and radicals. *Chemical Reviews* 1978; 78(1): 23- 43.

(2) Hussain SA., Ahmad K., Arif-un-Nisa Naqvi TK., Ahmed M., Nafees MH., Abass Q. The colossal influence of biological fertilization on medicinal and aromatic plants. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 2014; 5(5): 299-314.

(3) Havlin J., Beaton JD., Tisdale SL., Nelson WL. *Soil fertility and fertilizers: An Introduction to Nutrient Management*: 6th ed. Upper Saddle River, NewJersey: Pearson Prentice Hall; 2005: 515-205.

(4) Georgievskii V., Annenkov BN., Samokhin V. *Mineral nutrition of animals:* Studies in the Agricultural and Food Sciences. London: Elsevier; 2013: 459.

(5) Eriksen J. Soil sulfur cycling in temperate agricultural systems. *Advances in Agronomy* 2009; 102 (1): 55- 89.

(6) Hallberg KB., Lindström EB. Characterization of *Thiobacillus caldus sp*. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* 1994; 140(12): 3451- 6.

(7) Pronk J., Meulenberg R., Hazeu W., Bos P., Kuenen J. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic *thiobacilli*. *FEMS Microbiol Rev*. 1990; 75: (2-3): 293- 306.

(8) Friedrich CG., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67(7): 2873- 82.

(9) Liu J-Y., Xiu X-X., Cai P. Study of formation of jarosite mediated by *Thiobacillus ferrooxidans* in 9K medium. *Procedia Earth and Planetary Science* 2009; 1(1): 706- 12.

(10) Garrity GM., Bell JA., Lilburn T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. *Acidithiobacillales* ord. nov. Verlag US: Springer; 2005. 2 (B): 60- 63.

(11) Nemati M., Harrison SA. comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. *Minerals Engineering* 2000; 13(1): 19- 24.

(12) Valdebenito-Rolack EH., Araya TC., Abarzua LE., Ruiz-Tagle NM., Sossa KE., Aroca GE., Urrutia HE. Thiosulphate oxidation by Thiobacillus thioparus and Halothiobacillus neapolitanus strains isolated from the petrochemical industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 2011; 14 (1): 7-8.

(13) Øvreås L., Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 1998; 36(3- 4): 303- 15.

(14) Nowaczyk K., Domka F. Kinetic Model of CuS Oxidation by. *Polish Journal of Environmental Studies* 2000; 9 (3): 195-201.

(15) Thompson JD., Gibson T., Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* 2002; 2 (1): 2- 3.

(16) Hiraishi A., Nagashima KV., Matsuura K., Shimada K., Takaichi S., Wakao N. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1998; 48(4): 1389-98.

(17) White C., Shaman AK., Gadd GM. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nature Biotechnology* 1998; 16(6): 572- 5.

(18) Pasricha N., Abrol Y. Food production and plant nutrient sulphur. *Sulphur in Plants.* Netherlands: Springer; 2003: 29- 44.

(19) Kashirad A., Bazargani J. Effect of sulfur on pH and availability of phoshorus in calcareous soils, influence of sulfur and nitrogen on yield and chemical composition

of corn. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 1972; 131(1): 6- 13.

(20) Brito EM., Piñón-Castillo HA., Guyoneaud R., Caretta CA., Gutiérrez-Corona J F., Duran R. Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97(1): 369- 78.

(21) Kappler U., Davenport K., Beatson S., Lucas S., Lapidus A., Copeland A. Complete genome sequence of the facultatively chemolithoautotrophic and methylotrophic alpha proteobacterium *Starkeya novella* type strain (ATCC 8093T). *Standards in Genomic Sciences* 2012; 7(1): 44.

(22) Alam M., Pyne P., Mazumdar A., Peketi A., Ghosh W. Kinetic enrichment of ^{34}S during proteobacterial thiosulfate oxidation and the conserved role of SoxB in SS bond breaking. *Applied and Environmental Microbiology* 2013; 79(14): 4455- 64.

(23) Bardsley C., Lancaster J. Determination of reserve sulfur and soluble sulfates in soils. *Soil Science Society of America Journal* 1960; 24(4): 265- 8.

(24) Kelly DP., McDonald IR., Wood AP. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the alpha-subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50(5): 1797- 802.

(25) Okabe S., Odagiri M., Ito T., Satoh H. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73(3): 971- 80.

(26) Riffaldi R., Saviozzi A., Cardelli R., Cipolli S., Levi-Minzi R. Sulphur mineralization kinetics as influenced by soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 2006; 43(2): 209- 14.

(27) McDonald IR., Kelly DP., Murrell JC., Wood AP. Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. *Archives of Microbiology* 1996; 166(6): 394- 8.

(28) Kelly DP., Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus gen. nov.*, *Halothiobacillus gen. nov*. and *Thermithiobacillus gen*. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50(2): 511- 6.

(29) Robertson LA., Kuenen JG. *The genus Thiobacillus*. *The Prokaryotes*: New York: Springer; 2006: 812- 27.

(30) Wood AP., Kelly DP. Isolation and physiological characterisation of *Thiobacillus thyasiris sp*. nov., a novel marine facultative autotroph and the putative symbiont of *Thyaspira flexuosa*. *Archives of Microbiology* 1989; 152(2): 160- 6.

(31) Kappler U., Bacterial sulfite-oxidizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2011; 1807(1): 1- 10.

(32) Rzhepishevska O. *Physiology and Genetics of Acidithiobacillus species: Applications for Biomining*. Umea university, Sweden. 2008; 1- 73.

(33) Kappler U., Aguey-Zinsou K-F., Hanson GR., Bernhardt PV., McEwan AG. Cytochrome c551 from Starkeya novella characterization, spectroscopic properties, and phylogeny of adiheme protein of the soxAX family. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(8): 6252- 60.

(34) Dambe T., Quentmeier A., Rother D., Friedrich C., Scheidig AJ. Structure of the cytochrome complex soxXA of Paracoccus pantotrophus, a heme enzyme initiating chemotrophic sulfur oxidation. *Journal of Structural Biology* 2005; 152(3): 229- 34.

(35) Middaugh C., MacElroy R. The Effect of Temperature on Ribose-5-phosphate Isomerase from a Mesophile, *Thiobacillus thioparus*, and a Thermophile, *Bacillus*

caldolyticus. *Journal of Biochemistry* 1976; 79(6): 1331- 44.

(36) Lyric RM., Suzuk I. Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. I. Survey of enzymes and properties of sulfite: cytochrome c oxidoreductase. *Canadian Journal of Biochemistry* 1970; 48(3): 334-43.

(37) Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; 33(6): 999-1043.

(38) Attoe O., Olson R. Factors affecting rate of oxidation in soils of elemental sulfur and that added in rock phosphate-sulfur fusions. *Soil Science* 1966; 101(4): 317- 25.

(39) Germida J., Janzen H. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. *Fertilizer Research* 1993; 35(1- 2): 101- 14.

(40) Salmanian N., Ebrahimipour G., Ghasemi M., Fakhari J. Isolation and characterization of a Facultative chemolithotrophic sulphur and iron oxidizing bacterium from Ardabil acidic springs. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1(1): 1- 10.

[1]- *Starkeya*
[2]- *Thiobacillus*
[3]- *Acidiphilium*
[4]- *Acidianus*
[5]- *Sulfolobus*
[6]- Conductronic Unicam 2000 pH/EC meter
[7]- Pour plate method
[8]- TOP General Genomic DNA Purification Kit,(mini-prep), Topaz Gen Research, Iran.
[9]- NanoDrop 2000c spectrophotometry (Thermo Scientific, USA)
[10]- InsTAclone PCR Cloning Kit, (Fermentas, USA)
[11]- ABI 3730 capillary sequencer
[12]- *Thiobacillus thioparus*
[13]- *Thiobacillus thiophilus*
[14]- *Thiobacillus aquaesulis*
[15]- *Starkeya novella*
[16]- *Thiobacilluc novellus*
[17]- *Thiobacillus versutus*
[18]- Thiosulfate-Oxidizing Multi-Enzyme System, TOMES
[19]- Reverse-acting sulfate-reducing systems