16(2) 107-112, Summer 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The use of gamma radiation in creating a mutant sub strain of *Bacillus subtilis* with the ability to remove ammonium in cold conditions

Alireza Neissi* *, Hamed Majidi Zahed

Nuclear Agriculture research school, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran

Key Words

Ammonium
Heterotrophic nitrifying bacteria
Mutation
Temperature adaptation

Abstract

Introduction: The purpose of this research was gamma ray irradiation and identification of mutant sub strains of *Bacillus subtilis* with high ability to remove ammonium and their adaptability to cold and use in the cold-water fishes farming biofilter water for in laboratory conditions.

Material & methods: After obtaining the effective dose of 5.8 kGy of *Bacillus subtilis* strain, they were irradiated with gamma rays. After that, 200 colonies were randomly selected and numbered. Each of the colonies was incubated for 1 night in a liquid culture medium suitable for ammonia oxidizing bacteria at 30°C. Potential ammonium removal colonies were isolated and cultured separately. After the screening process, the selected strains were adapted to 15 and 9 degrees Celsius. The biofilter water of a RAS trout system was prepared and the ammonium concentration increased up to 35 mg/L. *Bacillus* sub-strain number 180 adapted to -9◦C and 15◦C with a dilution of 10^8 CFU/ml was added to the enriched biofilter water and ammonium concentration was evaluated over time.

Results: The growth chart showed that among the selected strains, sub-strains 180, 62, 45 and 31 had the highest growth. The results showed that strains 62 and 180 have the highest amount of ammonium removal compared to the control group and other sub strains. Also, the results show that the removal efficiency of ammonium in biofilter water containing biofilter microbiome for fish breeding using *Bacillus subtilis* sub strain 180 has increased both at 15 and 9 degrees.

Conclusion: Therefore, considering the increase in the biological capacity of sub-strain number 180 to remove ammonium at low temperatures, it is suggested to use it as an effective ammonium decreasing improver in RAS systems for cold water fish farming.

* Corresponding Author's email: aneissi@aeoi.org.ir
Received: 15 February 2023; Reviewed: 19 March 2023; Revised: 20 May 2023; Accepted: 17 June 2023
(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.2.14

مقاله پژوهشی

استفاده از پرتوتابی گاما در ایجاد زیرسویه موتانت باکتری *Bacillus subtilis* دارای توانایی حذف آمونیوم در شرایط سرمایی

علیرضا نیسی*، حامد مجیدی‌زاهد

پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

کلمات کلیدی

آمونیوم
باکتری‌های نیتریفیکانت هتروتروف
موتاسیون
سازگاری دمایی

چکیده

مقدمه: هدف از انجام این تحقیق پرتوتابی با پرتو گاما و شناسایی زیرسویه‌های موتانت باکتری *Bacillus subtilis* دارای توانایی بالای حذف آمونیوم و سازگاری آن‌ها به سرما و استفاده در آب بیوفیلترهای پرورش قزل‌آلا در شرایط سرمایی و آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: پس از به‌دست آوردن دز موثره ۵/۸ کیلوگری سویه باکتری *Bacillus subtilis* با پرتو گاما پرتوتابی شدند. پس از آن، ۲۰۰ کلونی به‌صورت تصادفی انتخاب و شماره‌گذاری شد. هر یک از کلونی‌ها به‌مدت ۱ شب در محیط کشت مایع مناسب برای باکتری‌های اکسیدکننده آمونیاک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلونی‌هایی بالقوه حذف آمونیوم جداسازی و به‌طور جداگانه کشت داده شدند. پس از مراحل غربالگری، سویه‌های انتخاب شده با دمای ۱۵ و ۹ درجه سانتی‌گراد سازگار شدند. آب بیوفیلتر یک سیستم قزل‌آلای *RAS* تهیه و غلظت آمونیوم تا ۳۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. باکتری باسیلوس زیرسویه شماره ۱۸۰ سازگار شده با دمای $^{\circ}C$۹- و $^{\circ}C$۱۵ با رقت 10^{8} *CFU/ml* به آب بیوفیلتر غنی شده اضافه شد و در طی زمان غلظت آمونیوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نمودار رشد نشان داد که از بین سویه‌های انتخاب‌شده زیرسویه‌های ۱۸۰، ۶۲، ۴۵ و ۳۱ دارای بیش‌ترین رشد بودند. نتایج نشان داد که سویه‌های ۶۲ و ۱۸۰ دارای بیش‌ترین میزان حذف آمنیوم می‌باشند نسبت به گروه شاهد و سایر زیرسویه‌ها می‌باشد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که کارایی حذف آمونیوم در آب بیوفیلتر حاوی میکروبیوم بیوفیلتر پرورش ماهی با استفاده از زیرسویه ۱۸۰ هم در دمای ۱۵ و هم ۹ درجه افزایش یافته است.

بحث و نتیجه‌گیری: بنابراین، با توجه به افزایش ظرفیت زیستی زیرسویه شماره ۱۸۰ برای حذف آمونیوم د ردمای پایین استفاده از آن را به‌عنوان یک بهبود دهنده موثر در سیستم‌های RAS برای ماهیان سردابی پیشنهاد می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: aneissi@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت: ۲۶ بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۲۸ اسفند ۱۴۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ خرداد ۱۴۰۲
(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.2.14

مقدمه

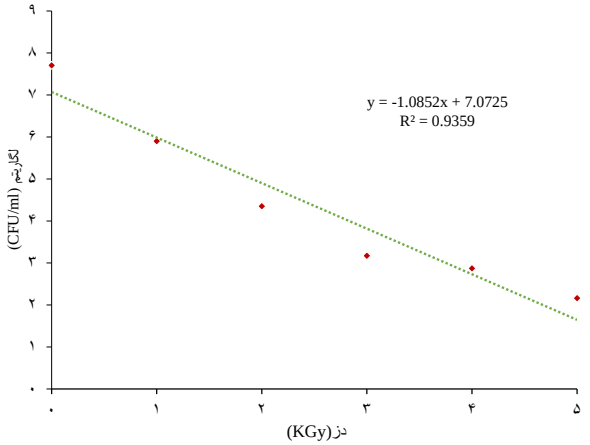
آبزی‌پروری به‌شدت در حال رشد است و از طرفی به‌علت محدودیت منابع آب شیرین در دسترس (۱، ۲)، بنابراین تلاش‌هایی برای سیستم‌های بازگشت مجدد آب در این صنایع شده است (۳، ۴). آمونیوم (NH4-N) جزء اصلی نیتروژن در فاضلاب این صنعت است و محتوای آن در پساب پرورش متراکم بسیار بالاست. حذف آمونیاک به‌عنوان عامل استرس‌زای محیطی و مانعی برای پرورش ماهیان در این سیستم‌ها دارای ارزش زیادی است (۵). فرآیند حذف NH4-N از بدنه‌های آبی تحت تأثیر تبخیر آمونیاک، نیتریفیکاسیون و احیای نیترات غیرهوازی به آمونیوم، اکسیداسیون بی هوازی آمونیاک، جذب گیاه و تجزیه میکروبی انجام می‌شود (۵). تصفیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها یکی از اقتصادی‌ترین و زیست محیطی‌ترین فرآیندها برای حذف NH4-N فاضلاب است (۶، ۷)، این فرآیند به دو شکل مختلف توسط باکتری‌های اتوتروف و هتروتروف (۸، ۹)، انجام می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد حذف آمونیوم و نیتریت در حضور سویه‌های هتروتروف با سرعت بیش‌تری انجام می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). از جمله باکتری‌های هتروتروفیک تجزیه‌کننده می‌توان به *Acinetobacterium baumanii*، *Candida rugosa*، *Candida krusei* و *Pichia farinosa* و *Bacillus* اشاره کرد که فعالیت آن‌ها در نیتریفیکاسیون به اثبات رسیده است (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶). جنس هتروتروفیک باسیلوس به‌عنوان جنس مطرح در فرآیند نیتروژن‌زدایی (۱۷) می‌توانند اشکال مختلف نیتروژن را از فاضلاب آبزیان حذف کنند. اعضای این جنس دارای دارای تنوع بسیار زیادی در آمونیفیکاسیون (۱۸)، نیتریفیکاسیون (۱۹) و نیترات‌زدایی (۲۰) می‌باشند. مطالعات نشان داده سویه‌های مختلف باسیلوس دارای کارایی مناسب حذف هتروتروفیک آمونیوم غیر یونیزه در آبزی‌پروری هستند، به طوری که کارایی سویه های *B. subtilis* (۲۱، ۲۲)، *B. megaterium* (۲۳) و *B. amyloliquefaciens* (۲۴) در این زمینه به اثبات رسیده است. انتخاب و افزایش کارایی سویه‌های مناسب با کارایی بالا همیشه دغدغه محققین بوده است (۲۵). بنابراین می‌توان کارهای متعددی برای افزایش بازده سویه های مختلف باکتریایی هم چون موتاسیون، دستکاری ژنتیکی و سازگاری محیطی انجام داد (۲۵، ۲۶). موتاسیون در واقع تغییر ساختار یک ژن با استفاده از تغییر در توالی DNA یک موجود زنده است. جهش می‌تواند ناشی از خطا در همانند سازی DNA در طول تقسیم سلولی، قرار گرفتن در معرض جهش‌زاها یا عفونت ویروسی باشد. استفاده از جهش‌زایی تصادفی برای اصلاح سویه‌ها به بهبود توانایی‌های کنترل زیستی و/یا سنتز متابولیت‌ها کمک می‌کند. جهش‌زاهای شیمیایی یا فیزیکی (اشعه ماوراء بنفش یا گاما) استفاده می‌شود (۲۷). پرتو گاما که از جمله پرتوهای یونیزان است با توجه به نفوذپذیری بالا و توان تاثیر روی ژنوم می‌تواند نقش به‌سزایی روی تولید سویه‌های موتانت داشته باشد (۲۵، ۲۸، ۲۹، ۳۰). دمای مناسب رشد برای اکثر گونه‌های هوازی هتروتروف مورد استفاده در بیوفیلترها بسیار بیش‌تر از دمای مطلوب برای پرورش ماهیان سردابی است، بنابراین، سازگاری میکروارگانیسم‌های مناسب موثر در حذف آمونیوم در دماهای پایین‌تر دارای اهمیت زیادی است (۳۱). بنابراین هدف از انجام این تحقیق پرتوتابی با پرتو گاما و شناسایی زیرسویه‌های موتانت باکتری *Bacillus subtilis* دارای توانایی بالای حذف آمونیوم و سازگاری آن‌ها به سرما و استفاده در آب بیوفیلترهای پرورش قزل آلا در شرایط سرمایی و آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

پرتوتابی به‌وسیله پرتو گاما: فرم لیوفلیز شده سویه باکتری *Bacillus subtilis* با شماره دسترسی IBRC-M 10997 از بانک میکروارگانیسم‌های مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای این منظور یک کلونی تازه از این باکتری به لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر *LB* براث منتقل و پس از انکوباسیون به‌مدت ۱ شب به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر *LB* براث اتوکلاو شده منتقل و در فاز رشد لگاریتمی از انکوباتور دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خارج شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ گرم به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و دو بار با محلول ۰/۶۵٪ NaCl استریل شده شسته شدند. سپس سوسپانسیون با محلول ۰/۶۵٪ NaCl تهیه و در مرحله بعد پرتوتابی با دزهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵، کیلوگری (KGy) ساعت شده از Co-60 توسط دستگاه گاماسل *Nordian* ۲۲۰ ساخت کانادا با دز ۰/۹۲ Gy/sec صورت گرفت و پس از تابش در این دزها، باکتری‌ها به‌صورت سریالی تا رقت 10^{-8} در نرمال سالین ۰/۶۵٪ رقیق شدند و روی محیط کشت مربوطه خود قرار گرفتند. تعداد کلنی‌ها شمارش شد و شرایط جهش‌زایی بهینه با توجه به میزان مرگ و میر ۸۰ تا ۹۰ درصد تعیین شد (۳۲). پس از این مرحله دز موثره ۵/۸-۵/۷ کیلوگری پیدا شد و باکتری‌ها در این دزها پرتوتابی شدند (شکل ۱).

جداسازی باکتری‌های حذف‌کننده آمونیوم: پس از پرتوتابی در دزهای موثره رقت‌سازی انجام و نمونه‌های باکتری به‌محیط کشت LB آگار منتقل شدند و از بین کلونی‌های مربوطه ۲۰۰ کلونی به‌صورت تصادفی انتخاب و شماره‌گذاری شد. هر یک از کلونی‌ها به‌مدت ۱ شب در محیط کشت LB براث در دمای ۳۰ درجه قرار داده شدند و سپس ۳ میلی‌لیتر از در ۴۷ میلی‌لیتر محیط مایع مناسب برای باکتری‌های اکسیدکننده آمونیاک (۳۳، ۳۴) در فلاسک‌های استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور بر دقیقه انکوبه

شدند. محیط کشت‌ها با افزودن ۳۳۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر پپتون به‌عنوان منابع کربن اصلاح شدند (۳۱). طی ۷ روز، آمونیوم سنجش و کلنی‌هایی بالقوه حذف‌کننده آمونیوم شناسایی شدند. برای کلنی‌های انتخاب‌شده، غلظت آمونیوم با استفاده از اسپکتروفتومتر پلین تست طبق پروتکل سازنده اندازه‌گیری و از بین این آن‌ها کلونی‌های کاندید برای سازگاری و حذف آمونیوم در دمای پایین انتخاب شدند.



شکل ۱: تعیین دز موثره پرتو گامادر باکتری *Bacillus subtilis*

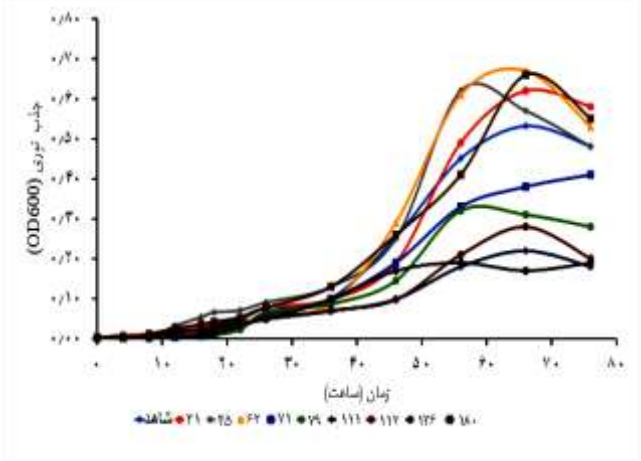
سازگاری با دمای سرد: پس از مراحل غربالگری، سویه‌های انتخاب شده در دماهای مختلف شامل دمای آزمایشگاه، دمای ۳۰ درجه، دمای ۱۵ و ۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ هفته سازگار شدند (۳۱). در مرحله بعد سویه‌ای که دارای بیش‌ترین سازگاری و توانایی حذف آمونیوم در دمای پایین را داشت انتخاب شد.

کاهش آمونیوم در آب حاوی بیوفیلتر در حضور و عدم حضور زیرسویه موتانت: آب از یک سیستم بیوفیلتر قزل‌آلای RAS تهیه شد. غلظت آمونیوم با افزودن محلول استوک سولفات آمونیوم به آب بیوفیلتر به ۳۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. ۳ میلی‌لیتر از باکتری باسیلوس زیرسویه شماره ۱۸۰ (۹°C− و ۱۵°C سازگار شده) با رقت 10^8 *CFU/ml* به ۴۷ میلی‌لیتر آب بیوفیلتر اضافه شدو به دمای ۱۵ و ۹ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس در طی زمان از آن‌ها نمونه‌برداری و غلظت آمونیوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری: نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با Arc sin تبدیل شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way-Anova) انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 17 در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel, 2007 در محیط ویندوز استفاده شد.

نتایج

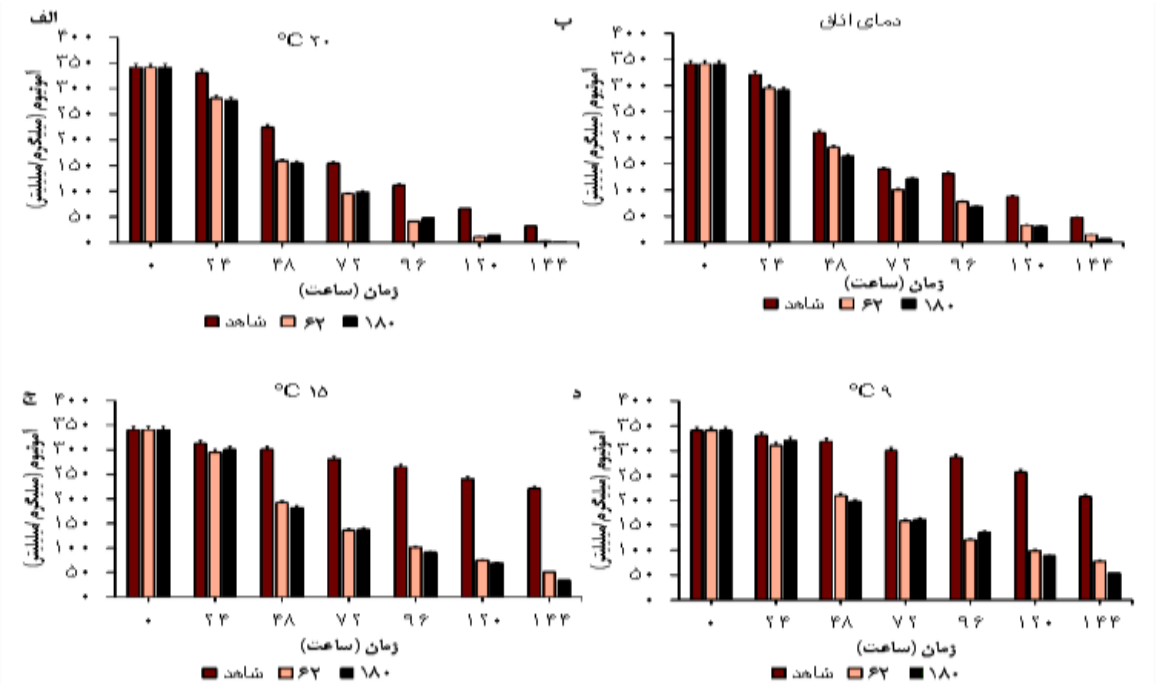
ارزیابی عملکرد رشد در زیرسویه‌های موتانت: نمودار رشد نشان داد که از بین سویه‌های انتخای شده زیرسویه‌های ۱۸۰، ۶۲، ۴۵ و ۳۱ دارای بیش‌ترین رشد نسبت به سویه اصلی و زیرسویه‌های موتانت بودند. هم‌چنین زیرسویه‌های ۱۳۶ و ۱۱۱ دارای کم‌ترین میزان رشد بودند (شکل ۲).



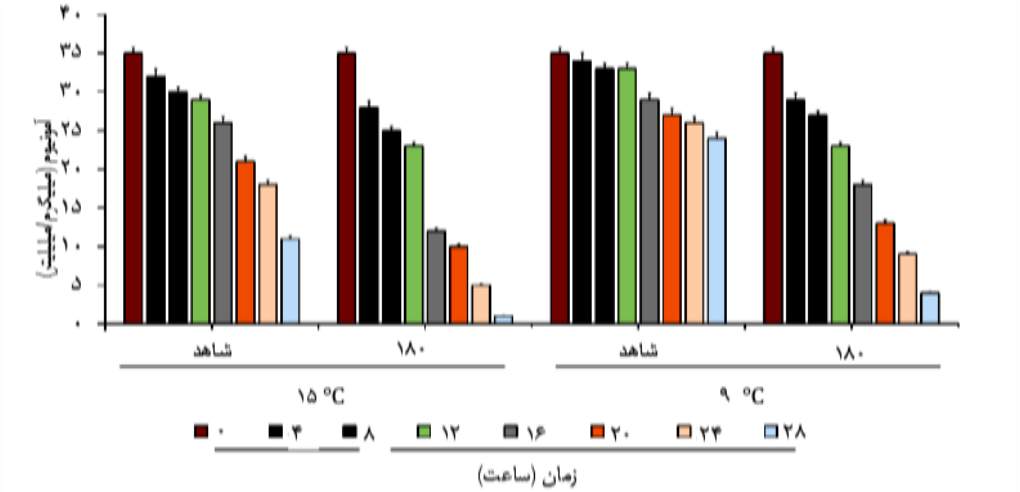
شکل ۲: نمودار رشد زیرسویه‌های باکتری باسیلوس پرتوتابی‌شده با گاما

حذف آمونیوم در دمای پایین: نتایج نشان داد که از بین سویه‌های مختلف سویه‌های ۶۲ و ۱۸۰ دارای بیش‌ترین میزان حذف آمنیوم می‌باشند. بعد از این‌که این سویه‌ها در سازگار و در برابر آمونیوم قرار گرفتند نتایج نشان داد که کارایی این زیرسویه‌ها اگر چه در دمای پایین کاهش یافته است ولی دارای توانایی حذف آمونیوم بالایی نسبت به گروه شاهد می‌باشند (شکل ۳).

فعالیت حذف آمونیوم در آب بیوفیلتر پرورش ماهی: این نتایج نشان داد که علی‌رغم افزایش غلظت آمونیوم حذف آن در هر دو گروه شاهد و زیرسویه ۱۸۰ اتفاق می‌افتد. هم‌چنین این نتایج نشان می دهد که کارایی حذف آمونیوم در آب بیوفیلتر حاوی میکروبیوم بیوفیلتر پرورش ماهی با استفاده از زیرسویه ۱۸۰ افزایش یافته است. این افزایش هم در دمای ۱۵ و هم ۹ درجه کاملاً مشهود و معنی‌دار است (شکل ۴).



شکل ۳: مقایسه حذف آمونیوم بین زیرسویه‌های شاهد، ۶۲ و ۱۸۰ در دماهای ۳۰ درجه، دمای اتاق، ۱۵ درجه و ۹ درجه سانتی‌گراد



شکل ۴: فعالیت حذف آمونیوم در آب بیوفیلتر پرورش ماهی حاوی ۳۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیوم با استفاده از زیرسویه شماره ۱۸۰ سازگار شده در دماهای ۱۵ درجه و ۹ درجه سانتی‌گراد

بحث

تجزیه‌زیستی به‌عنوان یک استراتژی پایدار برای بهبود کیفیت آب پساب‌های آبزی پروری و کاهش آلودگی بالقوه زیست محیطی پدیدار شده است. در این راستا میکروارگانیسم‌ها می‌توانند برای افزایش سرعت حذف آلاینده‌ها مفید باشند. چندین مطالعه اثربخشی تصفیه فاضلاب را با استفاده از میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد (۳۵، ۳۶، ۳۷). با این حال، بیش‌تر این مطالعات از باکتری‌های اتوتروفیک به عنوان عامل افزایش زیستی استفاده کردند. این در حالی است که با توجه به کارایی بالای باکتری‌های هترورتوف برای حذف آمونیوم استفاده از آن‌ها می‌تواند مفید باشد. این مطالعه، روی حذف آمونیوم توسط زیرسویه‌های موتانت باکتری *Bacillus subtilis* پرتوتابی شده با پرتو گاما متمرکز شده است. آبزیان در سیستم‌هایی با آب در حال گردش به طور متراکم رشد می‌کنند. افزایش تراکم جانوران در آب باعث افزایش غلظت آلاینده‌ها بالاخص آمونیوم می‌شود. بیوفیلترهای این سیستم‌ها که حاوی میکروارگانیسم‌های کلونیزه شده است، ظرفیت

معینی برای تصفیه آب، حذف آلاینده‌ها و استفاده مجدد از آن دارند (۳۵، ۳۸، ۳۹). بنابراین اگر راه حل موثرتری برای حذف آلاینده‌ها پیدا شود، می‌توان ظرفیت سیستم را افزایش داد که این فرآیند را اقتصادی‌تر و پایدارتر کند (۴۰، ۴۱، ۴۲). نیتریفیکاسیون در بیوفیلترهای RAS عمدتاً توسط باکتری‌های اتوتروف انجام می‌شود (۳۶، ۴۲، ۴۳). هنگامی که یک سیستم RAS شروع به کار می‌کند، می‌توان یک سویه هتروتروف را بدون ماهی به سیستم اضافه کرد (۴۴، ۴۵). بنابراین، با انتخاب باکتری‌های هتروتروفیک مناسب از افزایش عملکرد بهینه بیوفیلتر اطمینان حاصل کرد (۴۶). در طی پرورش ماهی، سیستم RAS به سمت باکتری‌های نیتریفیکنتی که با سیستم سازگار شده‌اند حرکت می‌کند. بیوفیلترها در این سیستم‌ها نقش اساسی دارند و رایج ترین جوامع میکروبی در این سیستم‌ها *Nitrospirae sp.*، *Bacteriodetes sp.*، *Proteobacteria sp.*، *Planctomycetes sp.*، *Rhizobiaceae*، و *Chloroflexi sp* که *Nitrosomonas sp.*، *Nitrospira sp* و *Nitrobacter sp* و *Bacillus* هستند (۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰). در این مطالعه به‌منظور مقایسه عملکرد زیرسویه انتخابی یعنی ۱۸۰ که در دمای پایین سازگار شده بود در دمای پایین به سویه‌های کلونیزه شده طبیعی، آب بیوفیلتر اضافه شدند. نتایج نشان‌دهنده اثر مثبت این زیرسویه بر حذف آمونیوم در آب بیوفیلتر بود. در این مطالعه یک استراتژی برای تقویت زیستی بیوفیلترهای RAS غنی شده با زیرسویه موتانت باکتری هتروتروف گزارش شد. با استفاده از این زیرسویه، با بهبود در حذف آمونیوم نسبت به جوامع رایج در بیوفیلترها در دمای ۹ و ۱۵ درجه سانتی گراد دست یافتیم (شکل ۴). بنابراین، این افزایش ظرفیت زیستی با استفاده از زیرسویه شماره ۱۸۰ باسیلوس سوبتیلیس سازگار شده به دمای تکثیر و پرورش ماهیان سردابی به‌عنوان یک بهبوددهنده موثر برای حذف آمونیوم در سیستم‌های RAS برای پرورش قزل‌آلا پیشنهاد می‌شود. اما قبل از استفاده از این زیرسویه باید کلونیزاسیون سطحی آن با استفاده از بیوفیلترهای مختلف بیش‌تر مورد مطالعه قرار گیرد تا کلونیزاسیون بهینه و اثربخشی آن‌ها به حداکثر برسد. هم‌چنین قبل از استفاده از این زیرسویه باید عملکرد آن در یک سیستم پرورشی در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1. **Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E. and Salari Joo H., 2013.** A review on aquaculture development in Iran. Ecopersia. 1(2): 159-178.
2. **Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A. and Zhou, Z., 2018.** Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Frontiers in microbiology. 9: 2429.
3. **Decamp, O., Conquest, L., Forster, I. and Tacon, A., 2002.** The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. World Aquaculture Society. 79-86
4. **Van Rijn, J., 2013.** Waste treatment in recirculating aquaculture systems. Aquacultural engineering. 53: 49-56.
5. **De Leão Serafini, R., Zaniboni-Filho, E. and Baldisserotto, B., 2009.** Effect of combined non-ionized ammonia and dissolved oxygen levels on the survival of juvenile dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier). Journal of the World Aquaculture Society. 40(5): 695-701.
6. **Foesel, B.U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L. and Cytryn, E., 2008.** Nitrosomonas Nm143 like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. FEMS microbiology ecology. 63(2): 192-204.
7. **Schreier, H.J., Mirzoyan, N. and Saito, K., 2010.** Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. Current opinion in biotechnology. 21(3): 318-325.
8. **Chen, J., Han, Y., Wang, Y., Gong, B., Zhou, J. and Qing, X., 2016.** Start-up and microbial communities of a simultaneous nitrogen removal system for high salinity and high nitrogen organic wastewater via heterotrophic nitrification. Bioresource technology. 216: 196-202.
9. **Chen, Q. and Ni, J., 2012.** Ammonium removal by Agrobacterium sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. Journal of bioscience and bioengineering. 113(5): 619-623.
10. **Clark, C. and Schmidt, E., 1966.** Effect of mixed culture on Nitrosomonas europaea simulated by uptake and utilization of pyruvate. Journal of bacteriology. 91(1): 367-373.
11. **Su, J.J., Yeh, K.S. and Tseng, P. W., 2006.** A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. Current microbiology. 53: 77-81.
12. **Robertson, L., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadioetomo, R. and Kuenen, J., 1989.** Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. Antonie van Leeuwenhoek. 56: 289-299.
13. **Chen, P., Li, J., Li, Q.X., Wang, Y., Li, S. and Ren, T., 2012.** Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. Bioresource technology. 216: 70-116.
14. **Jin, R. C., Xing, B.S. and Ni, W.M., 2013.** Optimization of partial nitritation in a continuous flow internal loop airlift reactor. Bioresource technology. 147: 516-524.
15. **Kindaichi, T., Ito, T. and Okabe, S., 2004.** Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology. 70(3): 1641-1650.
16. **Zhao, B., He, Y.L. and Zhang, X.F., 2010.** Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY. Environmental technology. 31(4): 409-416.
17. **Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S. P., Alikunj, A.A. and Abdulla, M.H., 2017.** Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. Journal of basic microbiology. 57(11): 922-932.
18. **Hui, C., Wei, R., Jiang, H., Zhao, Y. and Xu, L., 2019.** Characterization of the ammonification, the relevant protease production and activity in a high-efficiency ammonifier *Bacillus* amyloliquefaciens DT. International Biodeterioration & Biodegradation. 142: 11-17.
19. **Rout, P.R., Bhunia, P. and Dash, R.R., 2017.** Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using Bacillus cereus GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. Bioresource technology. 244: 484-895.
20. **Verbaendert, I., Boon, N., De Vos, P. and Heylen, K., 2011.** Denitrification is a common feature among

members of the genus *Bacillus*. Systematic and Applied Microbiology. 34(5): 385-391.

21. **Cha, J.H., Rahimnejad, S., Yang, S.Y., Kim, K.W. and Lee, K.J., 2013.** Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against Streptococcus iniae and as water additives. Aquaculture. 402: 50-57.

22. **Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K. and Balcazar, J.L., 2014.** Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against Vibrio harveyi infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 36(1): 68-74.

23. **Hura, M.U.D., Zafar, T., Borana, K., Prasad, J.R. and Iqbal, J., 2018.** Effect of commercial probiotic *Bacillus megaterium* on water quality in composite culture of major carps. Int J Curr Agric Sci. 8: 268-273.

24. **Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y. and Li, Z., 2013.** Using Bacillus amyloliquefaciens for remediation of aquaculture water. SpringerPlus. 2: 1-5.

25. **Bove, P., Gallone, A., Russo, P., Capozzi, V., Albenzio, M. and Spano, G., 2012.** Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 96: 431-441.

26. **Abdelnour-Esquivel, A., Perez, J., Rojas, M., Vargas, W. and Gatica-Arias A., 2020.** Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 56: 88-97.

27. **Ibrahim, A.A., Aboshanab, K.M., Yassien, M.A. and Hassouna, NA., 2017.** Improvement of paromomycin production by *Streptomyces rimosus* subsp *paromomycinus* NRRL 2455 using gamma irradiation mutagenesis. Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University. 26-30.

28. **Ravi, A., Musthafa, K., Jegathammbal, G., Kathiresan, K. and Pandian S., 2007.** Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. Letters in applied microbiology. 45(2): 219-223.

29. **Tran, B.D., Nguyen, T.T., Hoang, D.S., Hoang, P.T., Nguyen, V.B. and Ta, B.T., 2016.** Screening streptomycin resistant mutations from gamma ray irradiated *Bacillus subtilis* B5 for selection of potential mutants with high production of protease. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology. 32(1S).

30. **Nam, J.H., Shin, J.H., Lee, J.Y. and Lee, D.H., 2017.** Effects of ionizing and ultraviolet radiation on microbial mutation and DNA damage. The Korean Journal of Microbiology. 53(1): 20-28.

31. **Neissi, A., Rafiee, G., Farahmand, H., Rahimi, S. and Mijakovic, I., 2020.** Cold-resistant heterotrophic ammonium and nitrite-removing bacteria improve aquaculture conditions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Microbial ecology. 80: 266-277.

32. **Wang, Y., Wang, J., Zhang, X., Tong, Y. and Yang, R., 2021.** Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher nattokinase production through ultraviolet combined 60Co-γ ray mutagenesis. Lwt. 147: 111652.

33. **Bollmann, A., French, E. and Laanbroek, H.J., 2011.** Isolation, cultivation, and characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations. Methods in enzymology. 486 p. Elsevier. 55-88.

34. **Verhagen, F.J. and Laanbroek, H.J., 1991.** Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemo stats. Applied and Environmental Microbiology. 57(11): 3255-3263.

35. **John, E.M., Krishnapriya, K. and Sankar, T., 2020.** Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium. Aquaculture. 526: 735390.

36. **Hui Liang, D., Hu, Y., Liang, D., Chenga, J. and Chena, Y., 2021.** Bioaugmentation of Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) with Achromobacter JL9 for enhanced sulfamethoxazole (SMX) degradation in aquaculture wastewater. Ecotoxicology and Environmental Safety. 207: 111258.

37. **Patil, P.K., Antony, L., Avunje, S., Viswanathan, B., Lalitha, N. and Jangam, A.K., 2021.** Bioaugmentation with nitrifying and denitrifying microbial consortia for mitigation of nitrogenous metabolites in shrimp ponds. Aquaculture. 541: 736819.

38. **Khater, E., 2012.** Simulation model for design and management of water recirculating systems in aquaculture. Agricultural Engineering Department, Faculty of Agriculture, Moshtohor, Benha University: Moshtohor, Egypt.

39. **De Prisco JA., 2020.** An investigation of some key physico-chemical water quality parameters of an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system operating recirculation methodology in the Western Cape of South Africa: Faculty of Scienc.

40. **Tomasso, J., 1994.** Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Reviews in Fisheries Science. 314-291.

41. **Van Wyk, P. and Scarpa, J., 1999.** Water quality requirements and management. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. 141-162.

42. **Fotedar, R., 2016.** Water quality, growth and stress responses of juvenile barramundi (*Lates calcarifer* Bloch), reared at four different densities in integrated recirculating aquaculture systems. Aquaculture. 458: 113-120.

43. **Losordo, T.M., Masser, M.P. and Rakocy, J., 1998.** Recirculating aquaculture tank production systems. Overview of Critical Considerations SRAC Publication. 451 p.

44. **Ebeling, J.M. and Timmons, M.B., 2010.** Recirculating aquaculture: Cayuga Aqua Ventures.

45. **Wongkiew, S., Hu, Z., Chandran, K., Lee, J.W. and Khanal, S.K., 2017.** Nitrogen transformations in aquaponic systems: A review. Aquacultural Engineering. 76: 9-19.

46. **Hashemi-panah, A., Rafiee, G.R., Nikbakht, E. and Bozorgi, S., 2018.** The effect of enriched Artemia with two probiotics, Bacillus *subtilis* and Pediococcus pentosaseus on growth, survival and carcass composition indices in western white leg shrimp post larva (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Animal Environment. 10(2): 239-244.

47. **Neissi, A., Rafiee, G., Farahmand, H., Rahimi, S. and Mijakovic, I., 2020.** Improvement of waterborne using *Dyadobacter* sp. (No. 68) and *Janthinobacterium* sp. (No. 100) bacteria and comparing the hematological indices in a recirculating rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture system. Journal of Animal Environment. 12(4): 353-358. (In Persian)

48. **Urakawa, H., Tajima, Y., Numata, Y. and Tsuneda, S., 2008.** Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. Applied and environmental microbiology. 74(3): 894-900.

49. **Hüpeden, J., Wemheuer, B., Indenbirken, D., Schulz, C. and Spieck, E., 2020.** Taxonomic and functional profiling of nitrifying biofilms in freshwater, brackish and marine RAS biofilters. Aquacultural Engineering. 90: 102094.

50. **Brailo, M., Schreier, H.J., McDonald, R., Maršić Lučić, J., Gavrilović, A. and Pećarević, M, 2019.** Bacterial community analysis of marine recirculating aquaculture system bioreactors for complete nitrogen removal established from a commercial inoculum. Aquaculture. 503: 198-206.

51. **Devi, R., and Priya L., 2024.** The Mechanism of Drug–Drug Interactions: A Systematic Review. Clinical Journal for Medicine, Health and Pharmacy. 2(3): 32-41.

52. **Cutting, S.M., 2011.** *Bacillus* probiotics. Food microbiology. 28(2): 214-220.