Isolation and identification of obligately chemolithoautotrophic, haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio* sp. strain EMA and optimizing its thiosulfate removal activity in haloalkaliphilic condition

Somaye Makzum
M.Sc. of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran, somayemakzum@gmail.com
Mohammad Ali Amoozegar *
Professor of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib
Assistant Professor of Biotechnology, Research institute of petroleum industry (RIPI), Tehran, Iran, dastgheibsmm@ripi.ir

Abstract

Introduction: Dischargeing hazardous pollutants of oil and gas industries such as spent caustic into the soil and water is an environmental concern for which biological treatment could offer a solution. To remove high levels of sulfur compounds in spent caustic waste, isolation of chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from Meighan wetland was considered in this study.

Materials and methods: For isolation of chemolithoautotroph haloalkaliphile sulfur-oxidizing bacteria, alkaline sulfur-respiring medium with sodium thiosulfate as the sole electron and energy source and sodium carbonate/bicarbonate as carbon source were utilized. To confirm that the purified isolates are obligated autotroph, their growth on nutrient agar medium was surveyed and selected strains were identified based on *16S rRNA* sequence analysis. The growth and activity of selected strain named EMA were optimized at various pHs and salt conditions by assessment of protein content and remained thiosulfate in the culture medium.

Results: Following enrichment, 10 chemolithoautotrophic, haloalkaliphilic sulfur-oxidizing strains were isolated. *16S rRNA* sequence analysis, showed that the strains belonged to the genus *Thioalkalivibrio.* The optimal growth and thiosulfate removal of the selected strain were obtained at pH 10 and 50 g/l of salt (sodium chloride or sodium sulfate). At higher salt concentrations, thiosulfate removal was higher in the presence of sodium sulfate, rather than sodium chloride.

Discussion and conclusion: high sulfur removal activity of the isolated haloalkaliphilic *Thioalkalivibrio* strains in extreme conditions with these bacteria could be promising for the biotreatment of spent caustic.

Key words: Spent caustic, Optimization, Biological treatment, Chemolithoautotrophe, sulfur-oxidizing bacteria

* Corresponding author
Received: June 3, 2014 / **Accepted:** July 4, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۲۹- ۱۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

جداسازی و شناسایی باکتری شیمیولیتوتروف اجباری *Thioalkalivibrio* sp. سویهٔ *EMA* و بهینه‌سازی حذف تیوسولفات در شرایط شور و قلیایی

سمیه مکظوم: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، somayemakzum@gmail.com
محمد علی آموزگار *: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
سید محمد مهدی دستغیب: استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، dastgheibsmm@ripi.ir

چکیده

مقدمه: ورود آلاینده‌های خطرناک صنایع نفت و گاز مانند سود مصرف‌شده به خاک و آب یک معضل زیست‌محیطی است و تصفیهٔ زیستی می‌تواند در این زمینه راهکار مناسبی باشد. با توجه به میزان بالای ترکیبات گوگردی در پساب سود مصرف‌شده، در این پژوهش جداسازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی از خاک تالاب میقان مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای جداسازی باکتری‌های نمک‌قلیادوست گوگردی از خاک تالاب میقان، از محیط کشت مخصوص شیمیولیتوتروفی استفاده شد که در آن تیوسولفات به‌عنوان منبع انرژی و الکترون و سدیم کربنات/بیکربنات به‌عنوان منبع کربن در نظر گرفته شد. برای تعیین اجباری یا اختیاری بودن رشد اتوتروفی جدایه‌ها، از کشت روی محیط نوترینت آگار استفاده شد و سویه‌های منتخب با تعیین توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. بهینه‌سازی رشد و فعالیت سویهٔ منتخب با نام *EMA*، در pHها و غلظت‌های مختلف نمک با کمک روش پروتئین‌سنجی و تیتراسیون تیوسولفات انجام شد.

نتایج: براساس آنالیز مولکولی، جدایه‌ها نزدیک‌ترین شباهت را به گونه‌های جنس *Thioalkalivibrio* نشان دادند. با توجه به نتایج به دست آمده، بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات در pH ۱۰ و غلظت ۵درصد نمک (سدیم‌کلرید یا سدیم‌سولفات) حاصل شد. در غلظت‌های بالاتر نمک، در حضور سدیم‌سولفات در مقایسه با سدیم‌کلرید، باکتری با سرعت بیشتری تیوسولفات را حذف کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: پتانسیل بالای حذف ترکیبات گوگردی از محیط توسط جدایه‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست در شرایط حاد، نشان‌دهندهٔ قابلیت کاربرد این باکتری‌ها برای تصفیهٔ پساب سود مصرف‌شده است.

واژه‌های کلیدی: سود مصرف‌شده، بهینه‌سازی، تیمار زیستی، شیمیولیتوتروف، نمک قلیادوست گوگردی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

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

امروزه آلودگی محیط زیست یک معضل جهانی است و سازمان‌های محیط زیست، صنایع را ملزم به به‌کاربردن روش‌هایی برای کاهش مقدار آلایندهٔ تولیدی، استفاده از روش‌هایی برای تصفیهٔ پساب تولیدشده و پاکسازی محیط زیست کرده است (۱ و ۲). ازآنجا که بیش از ۷۰درصد از میادین نفت و گاز کشور به‌صورت ترش است حذف ترکیبات گوگردی از نفت و گاز اهمیت زیادی دارد (۳). یکی از آلاینده‌های صنعتی که به‌دلیل ویژگی‌های خاص آن بسیار به آن توجه شده است پسابی به‌نام سود مصرف‌شده[1] است که در پالایشگاه گاز و صنایع پتروشیمی به‌دنبال شیرین‌سازی گاز ترش تولید می‌شود. در پالایشگاه‌های مختلف انواع متنوعی از سود مصرف‌شده تولید می‌شود که در این میان می‌توان پساب‌های فنولی و سولفیدی را نام برد. pH بالای ۱۲ سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی، شوری ۵-۱۲درصد وزنی و مقدار بالای ترکیبات سولفیدی که از ۲-۳درصد تجاوز می‌کند آن را در ردیف پساب‌های بسیار خطرناک قرار داده است. به‌دلیل ویژگی‌های ذکرشده، سود مصرف‌شده، پسابی سمی، بدبو و خورنده است و رهاسازی آن به محیط زیست خطرناک است و مخالف قوانین حفاظت از محیط زیست است و قبل از رهاکردن آن در محیط باید تحت تیمار قرار گیرد. امروزه روش‌های مختلف برای تیمار پساب‌های پالایشگاهی وجود دارد. یکی از روش‌های فیزیکوشیمیایی تصفیهٔ پساب سود مصرف‌شده که در حال حاضر بسیار استفاده می‌شود، روش اکسیداسیون با هوای مرطوب[2] است. به‌دلیل هزینهٔ مصرفی بالا برای ایجاد فشار و دمای بالای موردِنیاز برای انجام این فرایند و تولید آلاینده‌های ثانویه ناشی از کامل‌نبودن فرایند اکسیداسیون، روش‌های زیستی تیمار پساب مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴-۱۲). در روش زیستی تصفیهٔ سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی، تصفیه در راکتورهای هوازی و با کمک باکتری‌های اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی انجام می‌شود و درنهایت سولفیدهیدروژن به گوگرد عنصری و یا سولفات تبدیل می‌شود. انجام واکنش در دما و فشار محیط، کاهش هزینه‌های مصرفی و تولیدنکردن آلاینده‌های ثانویه را می‌توان از مزایای تیمار زیستی برشمرد(۵، ۹ و ۱۲). برای تیمار سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی، بیشتر تجربیات مربوط به استفاده از گونهٔ *Thiobacillus denitrificans* است. در این فرایند سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی نیاز دارد که با استفاده از آب رقیق شود و میزان یون سدیم و pH تعدیل شود. در روشی که اخیراً به آن توجه شده است برای اکسیداسیون ترکیبات گوگردی از باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست گوگردی استفاده می‌شود (۱۳ و ۱۴). در سال ۲۰۰۰ سوروکین[3] و همکاران باکتری‌های شیمیولیتوتروف اجباری نمک‌قلیادوست را کشف و بررسی کردند. این باکتری‌ها از دریاچه‌های سودای سیبری[4] و کنیا[5] جدا شده است که در آن کربنات/ بیکربنات سدیم به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کند و شرایط بافری را در pH قلیایی بین ۹ تا ۱۰/۵ ایجاد و حفظ می‌کند. این گروه از باکتری‌ها دارای سه جنس *Thioalkalimicrobium*، *Thioalkalivibrio* و *Thioalaklispira* هستند که ازلحاظ تحمل نمک متفاوت هستند. سویه‌های جداشده از دریاچه‌های سودای سیبری دارای درصدG+C کم هستند (۴۸-۵۱درصد مولی) درصورتی‌که سویه‌های *Thioalkalivibrio* در گروه باکتری‌های با درصدG+C بالا قرار می‌گیرند. این گروه‌های باکتریایی متعلق به

کلاس گاماپروتئوباکتریا هستند. گونه‌های *Thioalkalivibrio* با گروه شیمیولیتوتروف‌ها ارتباط دارند که با فاصلهٔ دور از باکتری‌های گوگردی بنفش جنس *Ectothiorhodospira* قرار گرفته‌اند درصورتی که جنس *Thioalkalimicrobium* به باکتری‌های گوگردی شیمیولیتوتروفی نوتروفیل جنس *Thiomicrospira* نزدیک هستند و یک دودمان قلیادوست جدیدی را در این خوشه تشکیل می‌دهند (۱۵-۱۸). با وجود روش‌های مختلف فیزیکوشیمیایی، در پالایشگاه‌های کشور فقط به خنثی‌سازی سود مصرف شده بسنده می‌شود و اغلب پس از خنثی‌سازی نسبی و کاهش COD پساب به دریا تخلیه می‌شود. بسیار واضح است که رهاسازی ترکیبات بسیار خطرناک موجود در سود مصرف‌شده برای جانوران آبزی سمی است و چرخهٔ حیات را به خطر می‌اندازد. در این مطالعه تلاش شد باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی از خاک تالاب میقان جدا شود. این باکتری‌ها که توانایی رشد و تحمل شرایط موجود در سود مصرف‌شده را دارند، می‌توانند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای حذف ترکیبات گوگردی سود مصرف‌شده در نظر گرفته شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: تالاب میقان یک محیط شور است که در ۱۵کیلومتری شمال شرقی شهر اراک در استان مرکزی واقع شده است (۱۹). بعضی از نواحی آن دارای خاک گوگردی و سیاه‌رنگ است و برای هدف موردِنظر این مطالعه که جداسازی باکتری‌های گوگردی است مناسب بود. نمونه‌برداری از خاک تالاب میقان در آذرماه ۹۱ در ظروف نمونه‌برداری استریل انجام شد و به آزمایشگاه منتقل شد. میزان pH و نمک کل خاک با استفاده از روش گل اشباع تعیین شد. در این روش یک گرم از خاک در هاون چینی کوبیده شد سپس با استفاده از پمپ خلأ از صافی رد شد و برای آنالیز استفاده شد (۲۰-۲۲). آنالیز خاک تالاب میقان از نظر عناصر و یون‌های موجود در آن با روش جذب اتمی[۶] و با استفاده از دستگاه شعله‌سنجی[۷] در آزمایشگاه آنالیز دستگاهی بخش زمین‌شناسی دانشگاه تهران انجام شد.

غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی: برای غنی‌سازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی، از محیط کشت مخصوص رشد باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست گوگردی با pH ۹/۸ و ۳/۶درصد نمک که در جدول ۱ به آن اشاره شده است استفاده شد. در این محیط از سدیم‌تیوسولفات به‌عنوان منبع انرژی و الکترون و از سدیم‌کربنات/ بیکربنات به‌عنوان منبع کربن استفاده شد؛ علاوه بر این کربنات/ بیکربنات سدیم با خاصیت بافری بین ۹ تا ۱۰/۵، شرایط قلیایی مناسب را برای رشد باکتری‌های نمک‌قلیادوست موردنظر فراهم می‌کنند. ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر rpm ۱۵۰، به هم زده شد. بعد از یک ماه انکوبه شدن و سه بار کشت مجدد در محیط مایع اتوتروفی جدید، از محیط مایع به محیط جامد اتوتروفی کشت مجدد داده شد. برای تهیهٔ محیط کشت جامد از همان محیط کشت ذکرشده در جدول ۱ به‌همراه آگار (۱/۵درصد آگار) استفاده شد. برای تهیهٔ این محیط کشت، محیط پایهٔ معدنی و آگار به‌صورت جداگانه اتوکلاو شد و بعد از رسیدن به دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، در شرایط استریل به هم اضافه شد. این کار برای

جلوگیری از کاراملـه‌شـدن آگـار در دمـای بـالا و pH قلیایی صـورت گرفـت (۱۵-۱۸). بـرای مشـخص کـردن سـویه‌هـای اتـوتروف اجبـاری از اختیـاری، بعـد از خالص‌سازی روی محیط جامـد اتـوتروفی، نمونـه‌هـا در نوترینت آگار (آگار خالص محصـول شـرکت مـرک)[8] کشت داده شدند (۱۷).

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت

محیط پایه معدنی (۱ لیتر)	سدیم‌کربنات	۲۰ گرم
	سدیم‌بیکربنات	۱۰ گرم
	سدیم‌کلرید	۵ گرم
	دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۱گرم
عناصر کم‌مقدار		۲ میلی‌لیتر/لیتر
منیزیم‌کلرید		۵/ میلی‌مولار
پتاسیم‌نیترات		۵ میلی‌مولار
سدیم‌تیوسولفات ۵آبه		۴۰ میلی‌مولار

شناسایی- کلنی‌هـا از نظـر رنـگ و شـکل در محـیط جامـد بررسـی شـدند. بـرای شناسـایی اولیـهٔ بـاکتری از رنگ‌آمیزی گرم و تست KOH اسـتفاده شـد (۲۳ و۲۴). شناسایی تکمیلی جدایـه‌هـای منتخـب بـا تکثیـر و تعیـین تـوالی ژن *16S rRNA* انجـام گرفـت. اسـتخراج DNAژنومی به‌روش مارمور[9] انجام شد. PCR ژن *16S rRNA* با استفاده از پرایمرهای جهـانی رفـت و برگشـت (پرایمـر رفـت F 27 بـا تـوالی AGAGTTTGATCMTGGCTCAG و دمای اتصـال ۵۶/۳ و پرایمـر برگشـت R 1492 بـا تـوالی GGTTACCTTGTTACGACTT و دمای اتصـال ۵۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (۲۵). محصول PCR بـر ژل آگارز ۰/۷درصد الکتروفورز شد و با استفاده از اتیـدیوم برمایـد رنـگ‌آمیـزی شـد و توسـط دسـتگاه تـرانس ایلومیناتور مشاهده شد. به‌منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن*16S rRNA* محصـول PCR از طریـق شـرکت تکاپوزیست به شرکت ماکروژن[10] در کره جنوبی ارسال شد. آنالیز فیلوژنتیک جدایـه‌هـای منتخـب و سـویه‌هـای مشابه آنها با استفاده از نـرم‌افـزار Clustal X، Bioedit و Mega 6 انجام شد و رسم درخت فیلوژنتیک مربـوط بـه این سویه‌ها با استفاده از روش‌های Neighbor Joining، Maximum Parsimony و Maximum Likelyhood انجام گرفت (۲۶- ۲۹).

تعیین pH بهینهٔ رشد باکتری و حذف تیوسـولفات: از میان سویه‌های توالی‌یابی‌شده، چون همهٔ سویه‌ها متعلق به یک گروه باکتریـایی بودنـد، بـه‌صـورت تصـادفی یـک سویه انتخاب شد وpH بهینهٔ رشـد و حـذف تیوسـولفات تعیین شد. در سـویه‌هـای *Thioalkalivibrio* بـا مصـرف تیوسـولفات و اکسیداسـیون آن بـه گـوگرد عنصـری، کدورت رشد باکتری بعـد از رسـیدن بـه فـاز لگـاریتمی زیاد مـی‌شـود کـه ناشـی از ترشـح گـوگرد عنصـری در محـیط کشـت بـوده اسـت. بعـد از مصـرف کامـل تیوسولفات و رسیدن بـاکتری بـه انتهـای فـاز لگـاریتمی، باکتری شروع به مصـرف گـوگرد تولیدشـده مـی‌کنـد و کدورت محیط کشت کاهش می‌یابد. با توجـه بـه آنچـه گفتـه شـد اسـتفاده از منحنـی رشـد بـاکتری بـه‌روش کدورت‌سنجی منطقی به نظر نمی‌رسـد و بـرای سـنجش رشد باکتری باید از روش پـروتئین‌سـنجی اسـتفاده کـرد (۳۰). رشد باکتری در محـدودهٔ pH ۸ تـا ۱۰/۵ براسـاس روش پروتئین‌سنجی تعیـین شـد و بـرای سـنجش حـذف سدیم‌تیوسولفات از روش تیتراسیون استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سـانتی‌گـراد بـا دور شـیکر ۱۵۰ rpm گرماگـذاری شـد. بـرای ایجـاد محـیط بـا pH ۸، تنهـا سدیم‌بیکربنات به‌عنوان منبع کـربن در نظـر گرفتـه شـد. برای تهیهٔ محیط‌های فوق از معادلهٔ هندرسون-هاسلباخ و

pHمتر استفاده شد. نمونه‌برداری در ابتدای فاز تأخیر، با فاصلهٔ زمانی ۶ تا ۷ ساعت انجام شد و پس از آن در فاز لگاریتمی هر ۲ تا ۳ ساعت نمونه‌برداری شد و غلظت پروتئین و میزان حذف سدیم‌تیوسولفات آن سنجیده شد. (۳۰ و ۳۱).

- برای تعیین غلظت کمی پروتئین‌ها به‌روش برادفورد، یک میلی‌لیتر از محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور g۱۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و برای تخریب سلول و سنجش کل پروتئین سلول باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر سدیم‌هیدروکسید به پلیت سلولی اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور g۱۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی در یک کوت ریخته شد و ۱۰۰۰میکرولیتر معرف برادفورد به آن اضافه گردید. پس از هم‌زدن نمونه‌ها، جذب آنها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر در برابر نمونهٔ شاهد حاوی سدیم‌هیدروکسید و معرف برادفورد خوانده شد. براساس منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از غلظت‌های مختلف BSA، غلظت پروتئینی نمونه‌ها تعیین شد (۳۲- ۳۵).

- برای سنجش حذف سدیم‌تیوسولفات از روش تیتراسیون با محلول یدین ۱۰ میلی‌مولار و محلول نشاسته به‌عنوان معرف استفاده شد. براساس منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از غلظت‌های مختلف سدیم‌تیوسولفات، غلظت سدیم‌تیوسولفات باقیمانده در نمونه‌ها تعیین شد (۳۶ و ۳۷).

تعیین بهینهٔ رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید: بهینهٔ رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد (وزنی/ حجمی) نمک سدیم‌کلرید بررسی شد. سنجش رشد براساس پروتئین‌سنجی و حذف سدیم‌تیوسولفات براساس روش تیتراسیون انجام شد (۳۰).

تعیین بهینهٔ رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات: بهینهٔ رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد (وزنی/ حجمی) نمک سدیم‌سولفات بررسی شد. سنجش رشد و حذف تیوسولفات مطابق روش گفته‌شده در بالا انجام شد (۳۰).

نتایج

نمونه‌برداری: در این مطالعه، در نمونه‌برداری از تالاب میقان، مناطقی با خاک سیاه‌رنگ که با احتمال بیشتری بتوان باکتری‌های گوگردی را جدا کرد، مورد توجه قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری و انتقال به آزمایشگاه، pH و شوری آن اندازه‌گیری شد. pH خاک ۷/۶ و شوری آن ۰/۳درصد گزارش شد. در جدول ۲ آنالیز عناصر خاک تالاب میقان آورده شده است.

جدول ۲- آنالیز نمونهٔ خاک تالاب میقان

عناصر	مقدار (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
Na^{2+}	۱/۴۲
Mg^{2+}	۰/۱۸
K^{+}	۲
Ca^{2+}	۴۱۰
Fe^{2+}	۰/۷
Cl^{-}	۱۰۶۵
HCO_3^{-}	۶۱

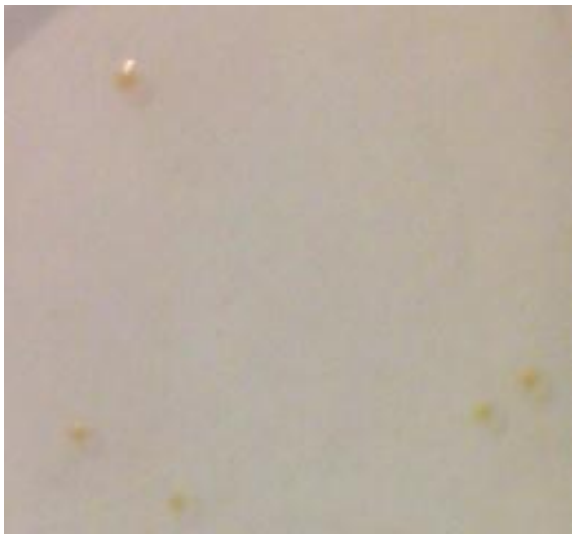
جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی: پس از خالص‌سازی متوالی در کشت جامد، ۱۰ سویه جدا شد. کلنی‌های جوان سویه‌های جداشده، در سطح پلیت

دارای گوگرد سفیدرنگ در سلول است که با پیرترشدن سلول، زردرنگ دیده می‌شود. برای اطمینان از شیمیولیتوتروف‌بودن سویه‌های جداشده، مجدداً در کشت مایع کشت داده شدند. سویه‌ها بعد از یک هفته انکوباسیون، توانایی رشد در محیط مایع با همان ترکیبات بیان‌شده در جدول ۱ را داشتند و همه، باکتری‌های شیمیولیتوترف اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی بودند. برای تعیین شیمیولیتوتروف اجباری یا اختیاری سویه‌ها، در پلیت نوترینت آگار کشت داده شدند که هیچ‌کدام توانایی رشد در نوترینت آگار را نداشته و شیمیولیتوتروف اجباری بودند.

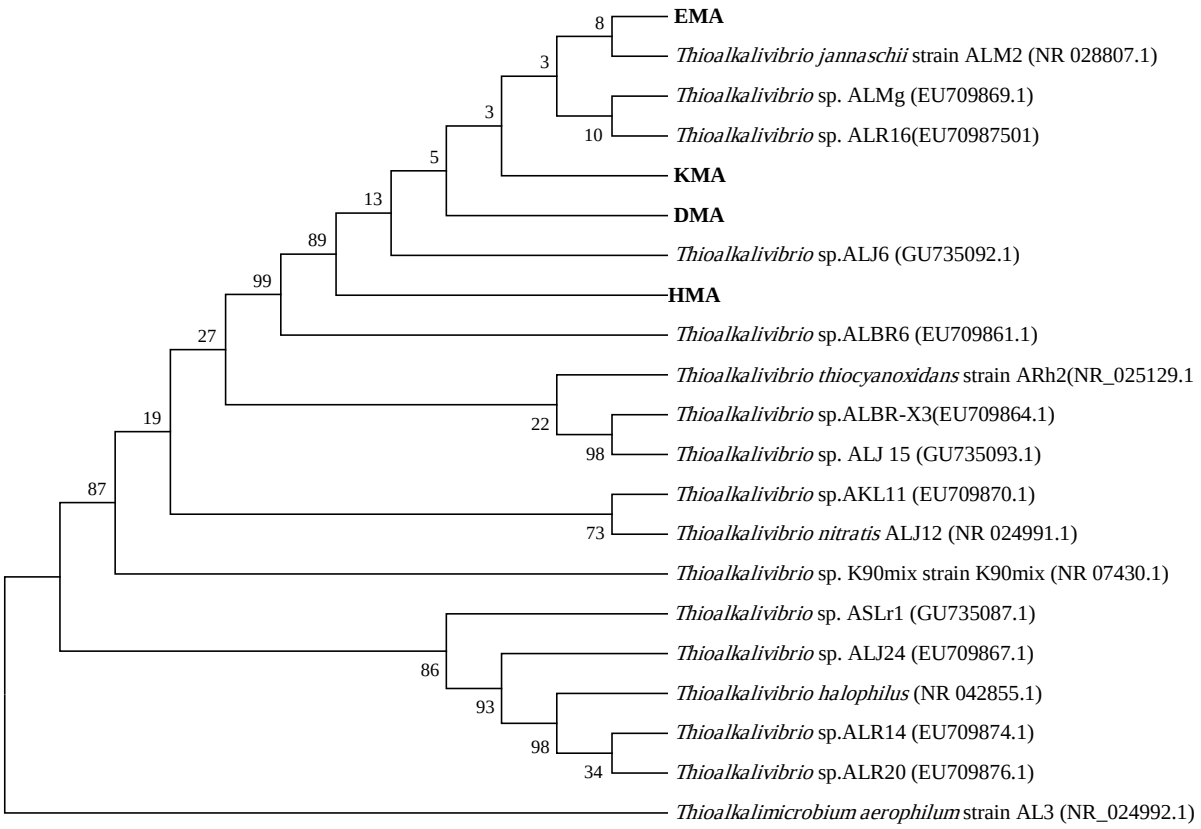
کلنی‌های جوان سویه‌های *Thioalkalivibrio* بر محیط دارای تیوسولفات با pH ۱۰ شفاف، سفید، صاف، منظم و برآمده هستند که رسوبات گوگردی سفیدرنگ دارند و ابتدا در مرکز و کناره‌های سلول دیده می‌شوند. کلنی‌های پیر کاملاً حاوی گوگرد هستند و زردرنگ دیده می‌شوند که شاید به‌دلیل یک تغییر در وضعیت فیزیکی گوگرد تولید شده باشد. کلنی باکتری در شکل ۱ نشان داده شده است. سلول‌های *Thioalkalivibrio* به‌صورت باسیل‌های کوتاه و گاهی خمیده بوده که با یک فلاژلهٔ قطبی حرکت می‌کنند و گلبول‌های گوگردی در پری‌پلاسم خود دارند.

از میان سویه‌های جداشده، به‌صورت تصادفی، ۴ سویهٔ *EMA*، *HMA*، *DMA* و *KMA* برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. پس از استخراج ژنوم، انجام PCRو تعیین توالی ژن *16S rRNA* ، توالی‌های به‌دست‌آمده هم‌تراز[11] و با میکروارگانیسم‌های موجود در بانک ژنی Eztaxon مقایسه شد. نتایج حاصل از هم‌ترازی سویه‌ها مشخص کرد که باکتری‌های ذکرشده، متعلق به جنس *Thioalkalivibrio* هستند و توالی به‌دست‌آمده بیشترین شباهت را به سویهٔ *Thioalkalivibrio versutus* نشان می‌دهند. سویهٔ *EMA*، *HMA*، *KMA* و *DMA* به‌ترتیب به‌میزان ۱۰۰، ۹۹، ۱۰۰ و ۱۰۰درصد به *Thioalkalivibrio versutus* شباهت دارند.

از توالی ژنی *16S rRNA* به‌دست‌آمده از جدایه‌های بررسی‌شده، درخت فیلوژنتیک به‌روش Neighbor Joining و ضریب بوت استرپ[12] صد و با استفاده از نرم‌افزار Mega 6 رسم شد. درخت فیلوژنتیک سویه‌های به‌دست‌آمده، در شکل ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود فاصلهٔ فیلوژنی سویه‌های موردنظر نسبت به برون گروه[13] آن که باکتری *Thioalkalimicrobium aerophilum* است مقایسه شده است. این باکتری یک جنس جدا را در باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی تشکیل می‌دهد.

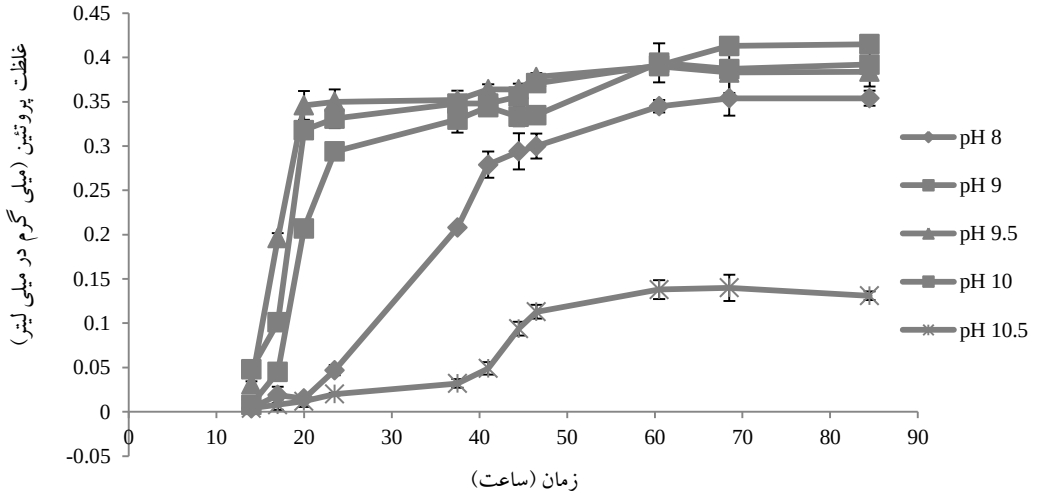


شکل ۱- کلنی باکتری سویهٔ *EMA*

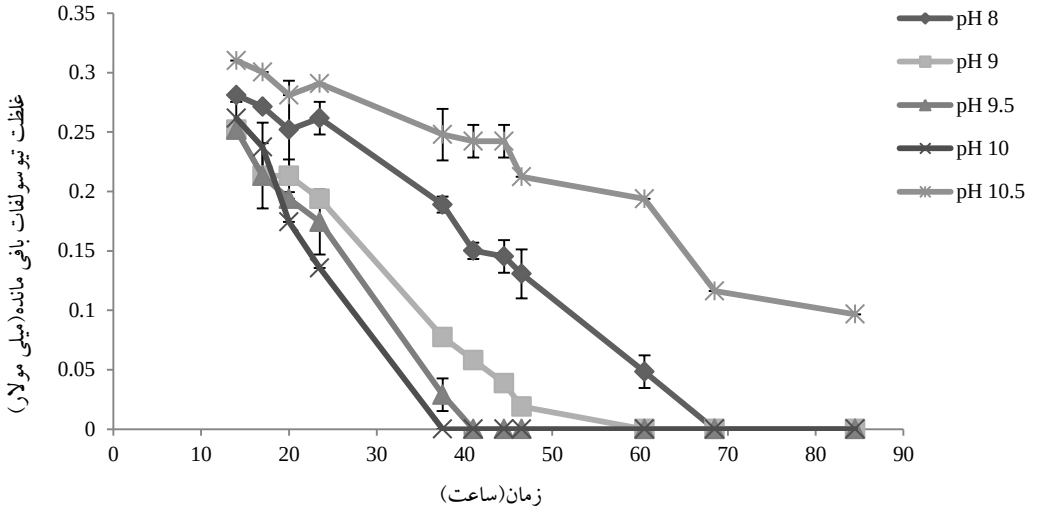


شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه‌های جداشده

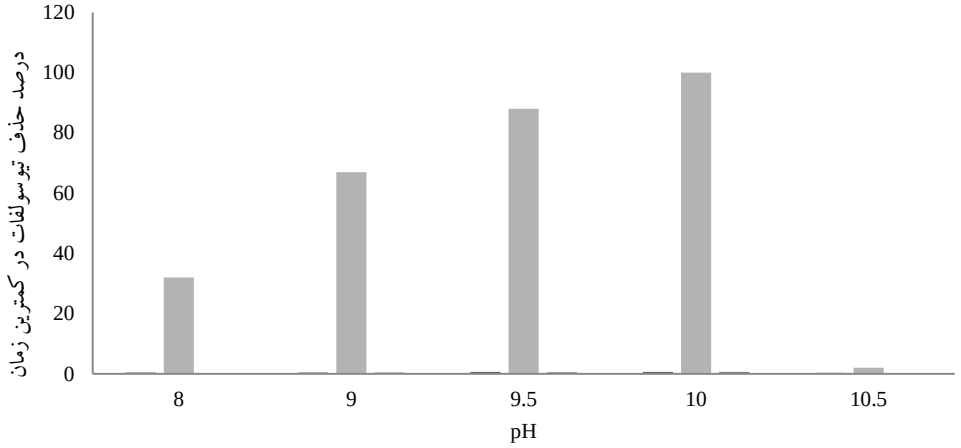
تعیین pH بهینهٔ رشد و حذف تیوسولفات: از میان سویه‌های توالی‌یابی‌شده، سویهٔ *EMA* برای ارزیابی فعالیت انتخاب شد و در محدودهٔ pH ۸ تا ۱۰/۵ رشد و حذف تیوسولفات از محیط بررسی شد. در شکل‌های ۳ و ۴ که رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در pHهای مختلف نشان می‌دهد مشاهده می‌شود که بیشترین میزان پروتئین تولیدشده مربوط به pH ۱۰ و کمترین آن مربوط به pH ۱۰/۵ است. بعد از pH ۱۰، سویهٔ *EMA* به‌ترتیب در pH ۹/۵، ۹ و ۸ بیشترین رشد را نشان داد. با حذف تیوسولفات به‌عنوان سوبسترا رشد باکتری زیاد می‌شود و بعد از اتمام تیوسولفات با مصرف گوگرد ترشح‌شده به محیط کشت، رشد ادامه می‌یابد و با مصرف کامل گوگرد رشد ثابت می‌شود. بازده رشد به صورت تولید پروتئین کل برحسب زمان تعریف شده است که در pH ۱۰ و ۱۰/۵ به‌ترتیب، ۰/۴۹ و ۰/۱۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد باکتری ۰/۰۹۳ بر ساعت اندازه‌گیری شد. باکتری در pH ۱۰ سریع‌تر از pHهای دیگر تیوسولفات سدیم را حذف کرده است و در ساعت ۳۷/۵ رشد میزان تیوسولفات به صفر رسیده است درحالی‌که در pH ۱۰/۵ در ساعت ۳۷/۵ رشد تنها ۲درصد از تیوسولفات محیط حذف شده است و درپایان ساعت ۸۴/۵ رشد، میزان حذف تیوسولفات ۶۸درصد است. در pHهای ۹/۵، ۹ و ۸ به‌ترتیب در ساعت رشدی ۴۱، ۶۰/۵ و ۶۸/۵ تیوسولفات به اتمام می‌رسد و میزان حذف تیوسولفات در ساعت ۳۷/۵ رشد به‌ترتیب ۸۸، ۶۷ و ۳۲ است. مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در pHهای مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل۳- تعیین بهینهٔ رشد در pHهای مختلف توسط سویهٔ *EMA*

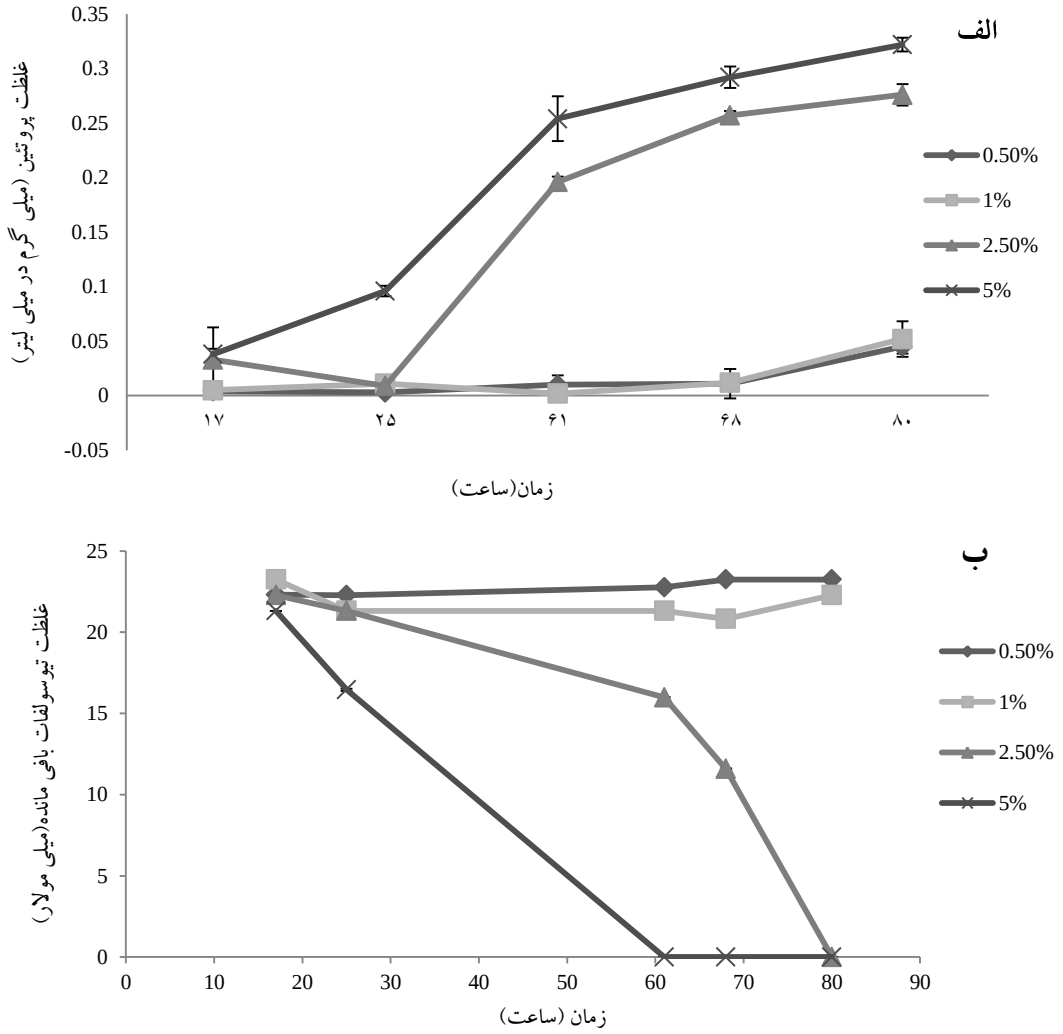


شکل ۴- تعیین بهینهٔ حذف تیوسولفات در pHهای مختلف توسط سویهٔ *EMA*

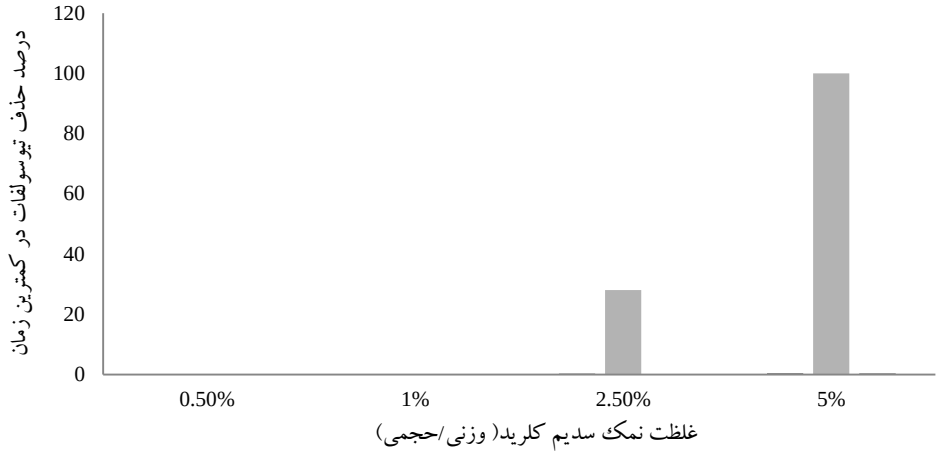


شکل ۵- مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در pHهای مختلف

تعیین بهینهٔ رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید: بهینهٔ رشد و حذف تیوسولفات از محیط توسط سویهٔ *EMA* در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد سدیم‌کلرید تعیین شد. شکل ۶ رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود باکتری در غلظت‌های ۰/۵ و ۱درصد سدیم‌کلرید در بازهٔ زمانی ۸۰ ساعت رشد نداشته است. سریع‌ترین رشد مربوط به غلظت ۵درصد سدیم‌کلرید بوده است و بازده رشد سویه در غلظت ۵ و ۲/۵درصد به‌ترتیب ۰/۴ و ۰/۳۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ساعت درصد بوده است. ضریب رشد ۰/۰۰۹۳ بر ساعت اندازه‌گیری شد. حذف تیوسولفات توسط باکتری در غلظت ۵درصد سریع‌تر از ۲/۵درصد بوده است؛ به‌صورتی که در غلظت ۵درصد، در ساعت ۶۰ رشد، تمام تیوسولفات حذف شده است. درحالی‌که در غلظت ۲/۵درصد تمام تیوسولفات در ساعت ۸۰ رشد حذف شده است و در ساعت ۶۰ رشد میزان حذف، ۲۸درصد است. در شکل ۷ مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید آورده شده است.

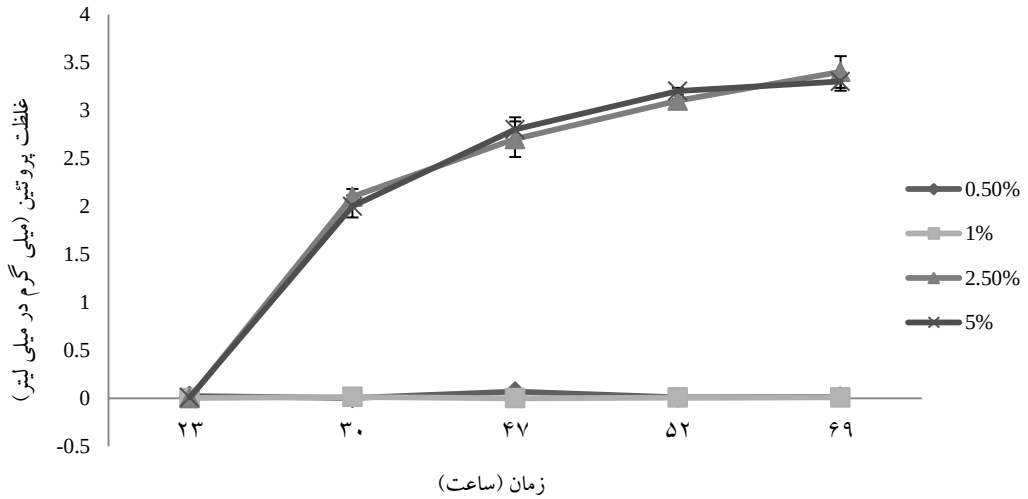


شکل ۶-تعیین بهینهٔ رشد توسط سویهٔ *EMA* (الف) تعیین بهینهٔ حذف تیوسولفات توسط سویهٔ *EMA* (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید

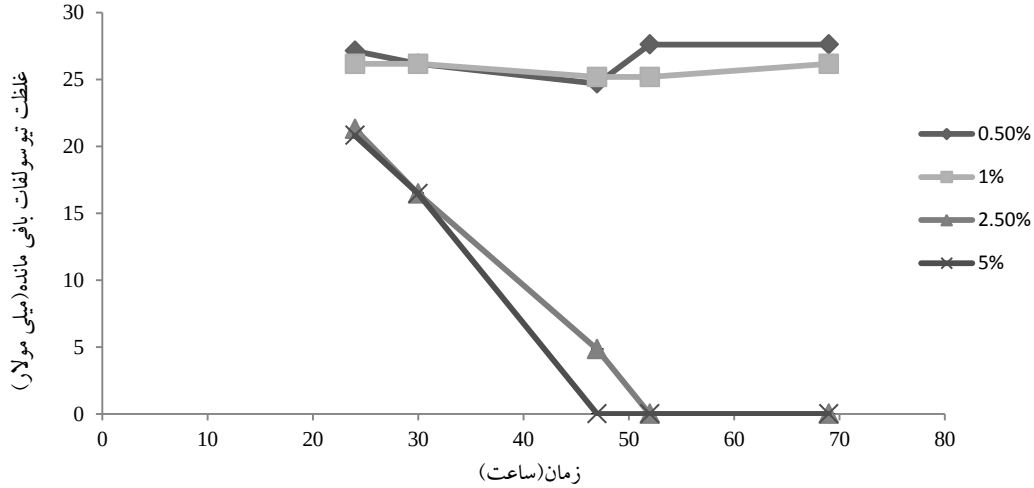


شکل ۷- مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید

الف

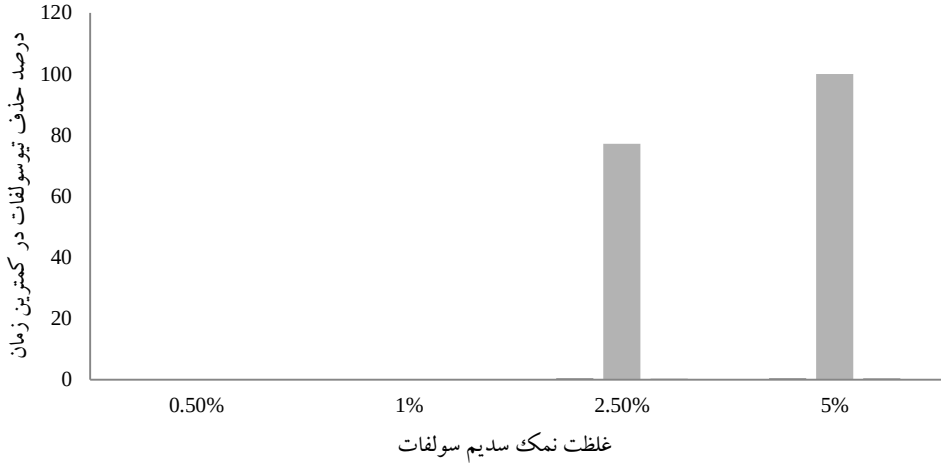


ب



شکل ۸- تعیین بهینهٔ رشد توسط سویهٔ *EMA* (الف) تعیین بهینهٔ حذف تیوسولفات توسط سویهٔ *EMA* (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات

تعیین بهینهٔ رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات: بهینهٔ رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد سدیم‌سولفات بررسی شد. درمورد نمک سدیم‌سولفات در غلظت ۰/۵ و ۱درصد رشد مشاهده نشد و در غلظت‌های ۲/۵ و ۵درصد نمک، هر دو تقریباً هم‌زمان شروع به رشد کردند. میزان پروتئین تولیدی نیز در هر دو غلظت ۲/۵ و ۵درصد با هم یکسان بود و باکتری بعد از زمان ۳۰ ساعت به فاز لگاریتمی رسید و بازده رشد سویه در غلظت‌های ۲/۵ و ۵درصد، ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد باکتری ۰/۰۲۳ بر ساعت تعیین شد. حذف کامل تیوسولفات در غلظت ۵ و ۲/۵درصد، به‌ترتیب در ساعت رشدی ۴۷ و ۵۲ انجام شد به‌طوری که میزان حذف تیوسولفات در غلظت ۲/۵درصد سدیم سولفات در ساعت رشدی ۴۷ و ۷۷درصد بوده است. شکل ۸ رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات نشان می‌دهد. در شکل ۹ مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات نشان داده شده است.



شکل ۹- مقایسهٔ ویژگی‌های رشدی سویهٔ *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به تولید حجم قابلِ‌توجهی از سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی در کشور، به جداسازی باکتری‌های بومی برای تیمار این پساب، توجه شد. در سال ۲۰۰۰، باکتری‌های شیمیولیتوتروف اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی را سوروکین و همکارانش کشف کردند. این باکتری‌ها که در دو جنس *Thioalkalivibrio* و *Thioalkalimicrobium* قرار گرفتند از دریاچه‌های سودای سیبری و کنیا جدا شدند. در این مطالعه چندین محیط غنی‌سازی از دریاچه‌های سودای مختلف استفاده شد (۱۷). در مطالعات بعدی که توسط سوروکین و همکارانش انجام گرفت ویژگی‌های این باکتری‌ها بیشتر بررسی شد و گونه‌های متنوعی از این گروه‌های باکتریایی جدا شد (۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۳۸). برای اولین بار در کشور در این پژوهش، باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی جداسازی و شناسایی شدند. در مطالعهٔ حاضر، جداسازی از تالاب میقان دارای خاک گوگردی با pH ۷/۶ انجام شد که منجر به جداسازی چهار سویه از جنس *Thioalkalivibrio* شد. به‌دلیل نبودِ دریاچه‌های سودا در ایران، جداسازی این باکتری‌ها از تالاب میقان می‌تواند نقطهٔ قوتی برای این پژوهش باشد. با توجه به رویکرد این

پژوهش که جداسازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف گوگردی برای استفاده از آنها در تصفیهٔ پساب سود مصرف‌شده است بهینه‌سازی رشد سویهٔ *EMA* و حذف تیوسولفات از محیط کشت ازنظر pH ۸ تا ۱۰/۵ و غلظت ۰/۵ تا ۵درصد سدیم کلرید و سدیم‌سولفات انجام شد. به‌منظور استفاده از سویهٔ جداشده در تصفیهٔ پساب سود مصرف‌شده باpH قلیایی، بالاترین pH که در آن باکتری بیشترین رشد و حذف تیوسولفات را داشته باشد به عنوان pH مطلوب در نظر گرفته شد. سویهٔ *EMA*، در pH ۱۰، با سرعت بیشتری تیوسولفات را حذف کرده است. اگرچه میزان پروتئین تولیدشده در pHهای ۹/۵ و ۹ تقریباً برابر با pH ۱۰ است؛ به‌دلیل سرعت بیشتر حذف تیوسولفات توسط باکتری، pH ۱۰ به‌عنوان بهینه در نظر گرفته شد. در پژوهش‌هایی که سوروکین و همکاران (۱۷ و ۳۹) انجام دادند pH ۱۰ به عنوان بهینه در نظر گرفته شد. به دلیل بالابودن میزان نمک سود مصرف‌شدهٔ بهینه‌سازی غلظت نمک سدیم کلرید و سدیم‌سولفات انجام شد. ازآنجاکه در مراحل خنثی‌سازی[۱۴] سود مصرف‌شده در صنعت از سولفوریک‌اسید استفاده می‌شود و درنهایت نمک سدیم‌سولفات تولید می‌شود، بهینه‌سازی رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم‌سولفات بررسی شد و مشخص شد که باکتری در غلظت های بالاتر نمک‌های سدیم‌سولفات و سدیم کلرید رشد سریع‌تری دارد به‌طوری که در غلظت ۰/۵ و ۱درصد نمک توانایی رشد را نداشته است؛ از طرف دیگر، در غلظت‌های بالاتر باکتری با سرعت بیشتری تیوسولفات را حذف می‌کند. در مطالعه‌ای که سوروکین و همکارانش بر سویهٔ *Thioalkalivibrio versutus strain ALJ 15* انجام دادند (۳۹) سینتیک رشد این سویه در کشت کموستات بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این باکتری توانایی رشد در pH قلیایی را دارد و در غلظت بالایی از نمک رشد می‌کند. توانایی رشد باکتری‌های قلیانمک‌دوست در pH قلیایی و غلظت نمک بالا نشان می‌دهد که این گروه از باکتری‌ها مکانیسم‌های ویژه‌ای دارند که آنها را قادر می‌سازد که در محیط‌های پلی‌اکستریم[۱۵] موجود بهترین رشد را داشته باشند. اکثر سویه‌های *Thioalkalivibrio* در شرایط کمبود اکسیژن و در هنگام اکسیداسیون تیوسولفات، گوگرد عنصری را به‌عنوان ترکیب واسطه به‌صورت درون‌سلولی یا برون‌سلولی تولید می‌کنند و سپس به سولفات اکسید می‌شود. در این باکتری‌ها گوگرد عنصری می‌تواند در هنگام کشت مایع یا جامد تولید شود درحالی‌که در شرایط اکسیژن بالا، تیوسولفات مستقیماً به سولفات اکسید می‌شود. در مطالعهٔ حاضر به‌دلیل استفاده از ارلن و تهیه‌نشدن اکسیژن کافی برای باکتری‌ها، تیوسولفات به گوگرد عنصری تبدیل می‌شود و پس از آن گوگرد به سولفات تبدیل می‌شود. افزایش ناگهانی پیک رشد به‌روش کدورت‌سنجی به‌دلیل تولید ناگهانی گوگرد و ترشح آن به محیط کشت بوده است. این باکتری بعد از مصرف گوگرد و کاهش پیک رشد و کاهش کدورت محیط کشت سولفات تولید می‌کند. اکثر مطالعات در تصفیه زیستی سود مصرف‌شده مربوط به استفاده از گونهٔ *Thiobacillus denitrificans* بوده است. عدم رشد در pH بالا و نیاز به آب فراوان برای رقیق‌سازی سود مصرف‌شده، باعث توجه دانشمندان به استفاده از باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست برای تصفیهٔ پساب سود مصرف‌شدهٔ سولفیدی شده است و مطالعاتی در این زمینه انجام شده است (۵ و ۹). با توجه به مزیت‌های روش جدید زیستی امید است که بتوان باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک قلیادوست اکسیدکنندهٔ ترکیبات گوگردی بومی را برای تصفیهٔ این پساب به کار برد.

References

(1) Eugene L M. Environmental microbiology: from genomes to bio geochemistry.1rd ed. United State: *Blackwell publishing*; 2008.

(2) Lloyd JR., Lovley DR. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current opinion in biotechnology* 2001; 12(3): 248-253.

(3) Moosavi Hejazi AS., Saadat Akefi A., Feizi Y., Naiini J., Editors. *Understanding the principles of gas processing*. 1rd ed. Tehran: Internal publication of Iran Gas Company; 1388.

(4) Gadekar S., Nemati M., Hill GA. Bach and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: reaction kinetics and stoichiometry. *Water research* 2006; 40(12): 2436-2446

(5) Graaff M., Klok j., Bijmans M., Muyzer G., Janssen A. Application of a 2-step process for the biological treatment of sulfidic spent caustics. *Water research* 2012; 4(6): 723-730.

(6) Ravichandra P., Gopal M., Annapurna J. Biological treatment of toxic petroleum spent caustic in fluidized bed bioreactor using immobilized cells of *Thiobacillus* RAI01. *Applied biochemistry and biotechnology* 2008; 151(2-3): 532–546.

(7) Jeung JP., So-Ra P., Dong-Jin J., Jeong-Keun A., Im-Gyu B., Tae-Joo P. Application of spent sulfidic caustics for autotrophic denitrification in a MLE process and their microbial characteristics by fluorescence in situ hybridization. *Korean Journal of Chemical Engineering* 2008; 25(3): 542-547

(8) Rebocas MV., Massa ACG., Vinicio M. Analysis of effluent from caustic treatment plants. *Institute Colombia del Petroleo* 2006; 3(2): 163-170

(9) Graaff M., Bijmans FM., Abbas B., Euverink G., Muyzer G., Janssen A. Biological treatment of refinery spent caustics under halo-alkaline conditions. *Bioresource Technol*ogy 2011; 102(15): 7257-64

(10) Alnaizy R. Economic analysis for wet oxidation processes for the treatment of mixed refinery spent caustic. *Environmental Progress* 2008; 27(3): 295–301

(11) Conner JA., Beitle RR., Duncan K., Kolhatkar R., Sublette K. Biotreatment of refinery spent sulfidic caustic using an enrichment culture immobilized in a novel support matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2000; 84–86(1-9): 707–719.

(12) Heidarinasab A., Hashemi SR. A Study of biological treatment of spent sulfidic caustic. *International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences* 2011; 418-421.

(13) Buisman CJN., speert P., Hof A., Janssen ALJ., Hagen R., Lettinga G. Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotechnology and Bioengineering* 1991; 38(8): 813-820.

(14) Janssen AJ., Sleyster R., Vander C., Jochemsen A., Bontsema J., Lettinga G. Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 1995; 47(3): 327-333.

(15) Sorokin D., Lysenko A., Mityushina L., Tourova T., Jones B., Rainey A., et al. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov.and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51(2): 565–580

(16) Sorokin D., Tourova T., Schmid M. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Archives of microbiology* 2001; 176(3): 170–177.

(17) Sorokin D., Robertson L., kuenen JG. Isolation and characterization of alkaliphilic, chemolithoautotrophic, sulphur-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 77(3): 251–262.

(18) Salamia N., Ebrahimipour Gh., Ghasemi SM. 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.

(19) Sorokin DY., Tourova T., KolganivaT. *Thioalkalispira microaerophila* gen. nov., sp. Nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52(6): 2175-82.

(20) Abdi L, Rahim Pour Bonab H., Yousefi Rad M. Quality and chemical changes saline Arak Meighan wetland associated with Incoming water surrounding area. *The first national conference on combating desertification and sustainable development of desert wetlands.* Arak, Iran; 1389.

(21) Bordi M. *Soil physics*. 1st ed. Tehran: University of Tehran; 1379.

(22) Bozorgmehr A. *Fundamental soil physics*. 1st ed. Ahvaz: University of Shahid Chamran; 1380.

(23) Murray R., Stackebrandt E. Taxonomic note: implementation of the Provisional status Candidates for incompletely described prokaryotes. *International journal of systematic bacteriology* 1995; 45(1): 186.

(24) Baron F., Finegold S. *Diagnostic Microbiology*. 8rd ed. Houston, Texas: The CV Mosby Company; 1990.

(25) Primrose SB., Twyman RM. *Principles of gene manipulation and genomics*. 7rd ed. USA: Blackwell Publishing; 2006.

(26) Benson D., Karsch-Mizrachi IA. Gene Bank. *Nucleic acids research* 2008; 36(1): D25-D

(27) Thompson J., Gibson T. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 1997; 25(24): 4876.

(28) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39(4): 783-791

(29) Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 1985; 39(4): 1-15

(30) Banciu HL., Sorokin DY., Tourova TP., Galinski EA., Muntyan MS., Kuenen JG., et al. 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* 2008; 12(3): 391–404

(31) Sorokin DY., Kuenen JG. Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS microbiology reviews* 2005; 29(4): 685-702.

(32) Reddy CA., Beveridge T., Breznak J., Marzluf G., Schmidt T., Snyder L. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC: American society of Microbiology; 1994.

(33) Jansson J., Editor. *Protein purification: principles, high resolution methods and applications*. 3 rd ed. Canada: *Johns Wiley and Sons, Inc*.; 2011.

(34) Sheehan D. *Methods in molecular biology: in protein purification protocols*. Totowa, NJ: human Press Inc.; 1996: 269-275.

(35) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72(1-2): 248-254.

(36) Sorbo B. A colorimetric method for the determination of thiosulphate. *Biochimica et*

Biophyicas Acta 1957; 23: 412-416.

(37) Kolthoff IM., Sandell EB., Meehan EJ., Bruckenstein S. Quantitative Chemical Analysis. *Macmillan* 1969; 857.

(38) Sorokin DY., Gorlenko VM., Tourova TP., Tourova TP., Tsapin AI., Nealson KH., et al. *Thioalkalimicrobium cyclicum* sp. nov. and *Thioalkalivibrio jannaschii* sp. nov., novel species of halo alkaliphilic, obligatory chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from hyper saline alkaline Mono Lake (California). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52: 913-920

(39) Banciu HL., Sorokin DY., Kleerebezem R., Muyzer G., Galinski EA., Kuenen JG. Growth kinetics of halo alkaliphilic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio versutus* strain ALJ 15 in continuous culture. *Extremophiles* 2004; 8: 185–192

[1]- Spent caustic
[2]- Wet air oxidation
[3]- Sorokin
[4]- Siberian
[5]- Kenyan
[6]- Atomic absorption
[7]- Flame photometry
[8]- Merck
[9]- Marmur
[10]- macrogen
[11]- alignment
[12]- Boot Strap
[13]- Out group
[14]- neutralization
[15]- Poly extreme