

## 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:** Discharge of 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 chemolithoautotrophic haloalkaliphilic 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 obligate autotrophs, 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, Chemolithoautotrophic, 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. سویه *EMA* و بهینه‌سازی حذف تیوسولفات در شرایط شور و قلیایی

سهمیه مکمل‌موم: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، somayemakzum@gmail.com  
محمد علی آموزگار\*: استادیار 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 تصفیه 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 اکسیدکننده 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 شیمیولیتوتروفي 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 اتوتروفي جدایه‌ها، از کشت روی محیط نوترینت آگار استفاده شد و سویه‌های منتخب با تعیین توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. بهینه‌سازی رشد و فعالیت سویه 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 ۵ درصد نمک (سدیم کلرید یا سدیم سولفات) حاصل شد. در غلظت‌های بالاتر نمک، در حضور سدیم سولفات در مقایسه با سدیم کلرید، 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، نشان‌دهنده قابلیت کاربرد این باکتری‌ها برای تصفیه پساب سود مصرف‌شده است.

**واژه‌های کلیدی:** سود مصرف‌شده، بهینه‌سازی، تیمار زیستی، شیمیولیتوتروف، نمک‌قلیادوست گوگردی

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

## مقدمه

امروزه آلودگی محیط زیست یک معضل جهانی است و سازمان‌های محیط زیست، صنایع را ملزم به به‌کاربردن روش‌هایی برای کاهش مقدار آلاینده تولیدی، استفاده از روش‌هایی برای تصفیه پساب تولیدشده و پاکسازی محیط زیست کرده است (۱ و ۲). از آنجا که بیش از ۷۰ درصد 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<sup>۱</sup> 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 مصرف‌شده سولفیدی، شوری ۵-۱۲ درصد وزنی و مقدار بالای ترکیبات سولفیدی که از ۲-۳ درصد 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 فیزیکی تصفیه پساب سود مصرف‌شده که در حال حاضر بسیار استفاده می‌شود، روش اکسیداسیون با هوای مرطوب<sup>۲</sup> است. به‌دلیل هزینه مصرفی بالا برای ایجاد فشار و دمای بالای موردنیاز 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 تصفیه سود مصرف‌شده سولفیدی، تصفیه در راکتورهای هوازی و با کمک باکتری‌های اکسیدکننده ترکیبات گوگردی انجام می‌شود و در نهایت سولفید هیدروژن به گوگرد عنصری و یا سولفات تبدیل می‌شود. انجام واکنش در دما و فشار محیط، کاهش هزینه‌های مصرفی و تولید نکردن آلاینده‌های ثانویه را می‌توان از مزایای تیمار زیستی برشمرد (۵، ۹ و ۱۲). برای تیمار سود مصرف‌شده سولفیدی، بیشتر تجربیات مربوط به استفاده از گونه *Thiobacillus denitrificans* است. در این فرایند سود مصرف‌شده 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<sup>۳</sup> و همکاران باکتری‌های شیمیولیتوتروف اجباری نمک‌قلیادوست را کشف و بررسی کردند. این باکتری‌ها از دریاچه‌های سودای سبیری<sup>۴</sup> و کنیا<sup>۵</sup> جدا شده است که در آن کربنات / بیکربنات سدیم به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کند و شرایط بافوری را در pH قلیایی بین ۹ تا ۱۰/۵ ایجاد و حفظ می‌کند. این گروه از باکتری‌ها دارای سه جنس *Thioalkalimicrobium*، *Thioalkalivibrio* و *Thioalalkispira* هستند که از لحاظ تحمل نمک متفاوت هستند. سویه‌های جداشده از دریاچه‌های سودای سبیری دارای درصد G+C کم هستند (۴۸-۵۱ درصد مولی) در صورتی که سویه‌های *Thioalkalivibrio* در گروه باکتری‌های با درصد G+C بالا قرار می‌گیرند. این گروه‌های باکتریایی متعلق 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<sup>۶</sup> و با استفاده از دستگاه شعله‌سنجی<sup>۷</sup> در آزمایشگاه آنالیز دستگاهی بخش زمین‌شناسی دانشگاه تهران انجام شد.

غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی: برای غنی‌سازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکننده ترکیبات گوگردی، از محیط کشت مخصوص رشد باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست گوگردی با pH ۹/۸ و ۳/۶ درصد نمک که در جدول ۱ به آن اشاره شده است استفاده شد. در این محیط از سدیم تیوسولفات به‌عنوان منبع انرژی و الکترون و از سدیم کربنات/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 اتوتروفي جدید، از محیط مایع به محیط جامد اتوتروفي کشت مجدد داده شد. برای تهیه محیط کشت جامد از همان محیط کشت ذکر شده در جدول ۱ به‌همراه آگار (۱/۵ درصد آگار) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، محیط پایه معدنی و آگار به‌صورت جداگانه اتوکلاو شد و بعد از رسیدن به دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، در شرایط استریل به هم اضافه شد. این کار برای

کلاس گاما پروتئوباکتیریا هستند. گونه‌های *Thioalkalivibrio* با گروه شیمیولیتوتروف‌ها ارتباط دارند که با فاصله دور از باکتری‌های گوگردی بنفش جنس *Ectothiorhodospira* قرار گرفته‌اند در صورتی که جنس *Thioalkalimicrobium* به باکتری‌های گوگردی شیمیولیتوتروفي 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 آبی سمی است و چرخه حیات را به خطر می‌اندازد. در این مطالعه تلاش شد باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکننده 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 ۱۵ کیلومتری شمال شرقی شهر اراک در استان مرکزی واقع شده است (۱۹). بعضی از نواحی آن دارای خاک گوگردی و سیاه‌رنگ است و برای هدف موردنظر 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

ژن *16S rRNA* محصول PCR از طریق شرکت تکاپوزیست به شرکت ماکروژن<sup>۱</sup> در کره جنوبی ارسال شد. آنالیز فیلوژنتیک جدایه‌های منتخب و سویه‌های مشابه آنها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X, Bioedit و Mega 6 انجام شد و رسم درخت فیلوژنتیک مربوط به این سویه‌ها با استفاده از روش‌های Neighbor Joining, Maximum Likelihood و Maximum Parsimony انجام گرفت (۲۶-۲۹).

تعیین pH بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات: از میان سویه‌های توالی‌یابی شده، چون همه سویه‌ها متعلق به یک گروه باکتریایی بودند، به صورت تصادفی یک سویه انتخاب شد و pH بهینه رشد و حذف تیوسولفات تعیین شد. در سویه‌های *Thioalkalivibrio* با مصرف تیوسولفات و اکسیداسیون آن به گوگرد عنصری، کدورت رشد باکتری بعد از رسیدن به فاز لگاریتمی زیاد می‌شود که ناشی از ترشح گوگرد عنصری در محیط کشت بوده است. بعد از مصرف کامل تیوسولفات و رسیدن باکتری به انتهای فاز لگاریتمی، باکتری شروع به مصرف گوگرد تولیدشده می‌کند و کدورت محیط کشت کاهش می‌یابد. با توجه به آنچه گفته شد استفاده از منحنی رشد باکتری به روش کدورت‌سنجی منطقی به نظر نمی‌رسد و برای سنجش رشد باکتری باید از روش پروتئین‌سنجی استفاده کرد (۳۰). رشد باکتری در محدوده pH ۸ تا ۱۰/۵ براساس روش پروتئین‌سنجی تعیین شد و برای سنجش حذف سدیم تیوسولفات از روش تیتراسیون استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. برای ایجاد محیط با pH ۸، تنها سدیم بی‌کربنات به عنوان منبع کربن در نظر گرفته شد. برای تهیه محیط‌های فوق از معادله هندرسون-هاسلباخ و

جلوگیری از کارامله شدن آگار در دمای بالا و pH قلیایی صورت گرفت (۱۵-۱۸). برای مشخص کردن سویه‌های اتوتروف اجباری از اختیاری، بعد از خالص‌سازی روی محیط جامد اتوتروفي، نمونه‌ها در نوترینت آگار (آگار خالص محصول شرکت مرک)<sup>۸</sup> کشت داده شدند (۱۷).

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت

۲۰ گرم	سدیم کربنات	محیط پایه معدنی (۱ لیتر)
۱۰ گرم	سدیم بی‌کربنات	
۵ گرم	سدیم کلرید	
۱ گرم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات	
۲ میلی‌لیتر/لیتر	عناصر کم‌مقدار	
۵ میلی‌مولار	منیزیم کلرید	
۵ میلی‌مولار	پتاسیم نترات	
۴۰ میلی‌مولار	سدیم تیوسولفات ۵آبه	

شناسایی - کلنی‌ها از نظر رنگ و شکل در محیط جامد بررسی شدند. برای شناسایی اولیه باکتری از رنگ‌آمیزی گرم و تست KOH استفاده شد (۲۳ و ۲۴). شناسایی تکمیلی جدایه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی به روش مارمور<sup>۹</sup> انجام شد. PCR ژن *16S rRNA* با استفاده از پرایمرهای جهانی رفت و برگشت (پرایمر رفت F 27 با توالی AGAGTTTGATCMTGGCTCAG و دمای اتصال ۵۶/۳ و پرایمر برگشت R 1492 با توالی GGTTACCTTGTTACGACTT و دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (۲۵). محصول PCR بر ژل آگارز ۰/۷ درصد الکتروفورز شد و با استفاده از اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شد. به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی

سنجش رشد براساس پروتئین‌سنجی و حذف سدیم تیوسولفات براساس روش تیتراسیون انجام شد (۳۰).

تعیین بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات: بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد (وزنی / حجمی) نمک سدیم سولفات بررسی شد. سنجش رشد و حذف تیوسولفات مطابق روش گفته شده در بالا انجام شد (۳۰).

### نتایج

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

جدول ۲- آنالیز نمونه خاک تالاب میقان

عناصر	مقدار (میلی گرم بر کیلوگرم)
Na <sup>2+</sup>	۱/۴۲
Mg <sup>2+</sup>	۰/۱۸
K <sup>+</sup>	۲
Ca <sup>2+</sup>	۴۱۰
Fe <sup>2+</sup>	۰/۷
Cl <sup>-</sup>	۱۰۶۵
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	۶۱

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

pH متر استفاده شد. نمونه برداری در ابتدای فاز تأخیر، با فاصله زمانی ۶ تا ۷ ساعت انجام شد و پس از آن در فاز لگاریتمی هر ۲ تا ۳ ساعت نمونه برداری شد و غلظت پروتئین و میزان حذف سدیم تیوسولفات آن سنجیده شد. (۳۰ و ۳۱).

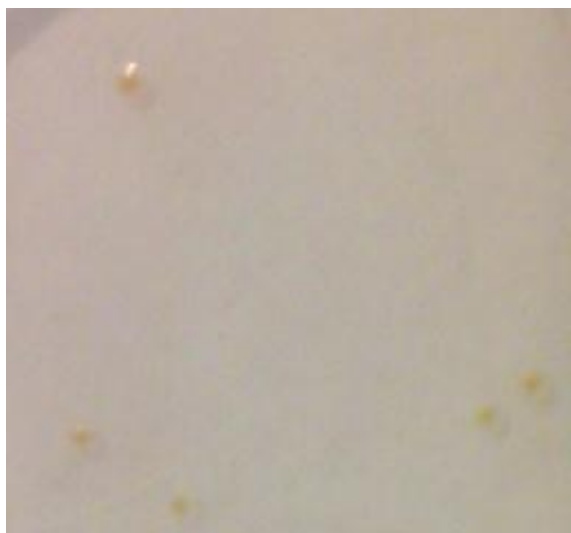
- برای تعیین غلظت کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد، یک میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و برای تخریب سلول و سنجش کل پروتئین سلول باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید به پلیت سلولی اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی در یک کوت ریخته شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد به آن اضافه گردید. پس از هم‌زدن نمونه‌ها، جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در برابر نمونه شاهد حاوی سدیم هیدروکسید و معرف برادفورد خوانده شد. براساس منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت‌های مختلف BSA، غلظت پروتئینی نمونه‌ها تعیین شد (۳۲-۳۵).

- برای سنجش حذف سدیم تیوسولفات از روش تیتراسیون با محلول یدین ۱۰ میلی‌مولار و محلول نشاسته به عنوان معرف استفاده شد. براساس منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت‌های مختلف سدیم تیوسولفات، غلظت سدیم تیوسولفات باقیمانده در نمونه‌ها تعیین شد (۳۶ و ۳۷).

تعیین بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید: بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵درصد (وزنی / حجمی) نمک سدیم کلرید بررسی شد.

توالی به‌دست‌آمده بیشترین شباهت را به سویه *Thioalkalivibrio versutus* نشان می‌دهند. سویه *EMA*، *HMA*، *DMA* و *KMA* به ترتیب به میزان ۱۰۰، ۹۹، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد به *Thioalkalivibrio versutus* شباهت دارند.

از توالی ژنی *16S rRNA* به‌دست‌آمده از جدایه‌های بررسی‌شده، درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor Joining و ضریب بوت استرپ<sup>۱۲</sup> 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 فاصله فیلوژنی سویه‌های موردنظر نسبت به برون‌گروه<sup>۱۳</sup> آن که باکتری *Thioalkalimicrobium aerophilum* است مقایسه شده است. این باکتری یک جنس جدا را در باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکننده ترکیبات گوگردی تشکیل می‌دهد.

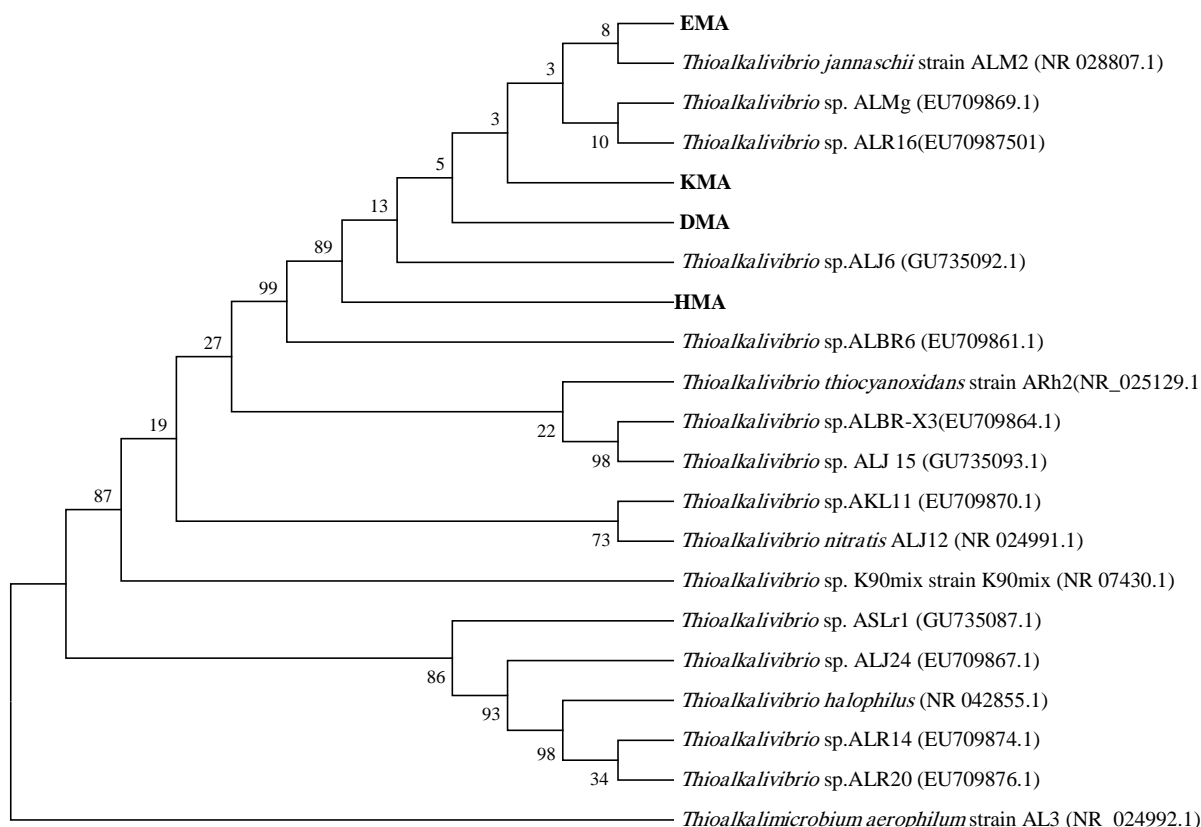


شکل ۱- کلنی باکتری سویه *EMA*

دارای گوگرد سفیدرنگ در سلول است که با پیرترشدن سلول، زردرنگ دیده می‌شود. برای اطمینان از شیمیولیتوتروف بودن 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 شیمیولیتوتروف اکسیدکننده ترکیبات گوگردی بودند. برای تعیین شیمیولیتوتروف اجباری یا اختیاری سویه‌ها، در پلیت نوترینت آگار کشت داده شدند که هیچ کدام 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 به دلیل یک تغییر در وضعیت فیزیکی گوگرد تولید شده باشد. کلنی باکتری در شکل ۱ نشان داده شده است. سلول‌های *Thioalkalivibrio* به صورت باسیل‌های کوتاه و گاهی خمیده بوده که با یک فلاژل قطبی حرکت می‌کنند و گلبول‌های گوگردی در پری‌پلاسم خود دارند.

از میان سویه‌های جداشده، به صورت تصادفی، ۴ سویه *EMA*، *HMA*، *DMA* و *KMA* برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. پس از استخراج ژنوم، انجام PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA*، توالی‌های به‌دست‌آمده هم‌تراز<sup>۱۱</sup> 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

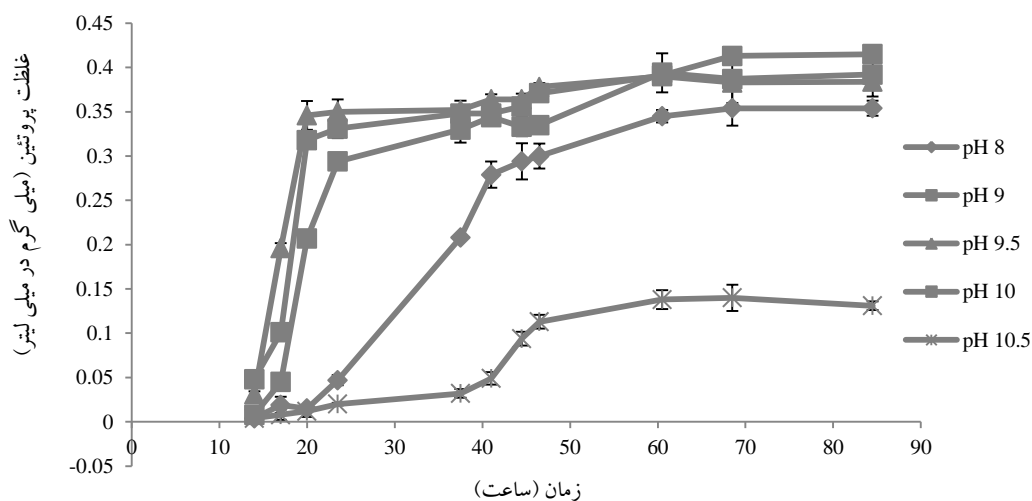


شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه‌های جدا شده

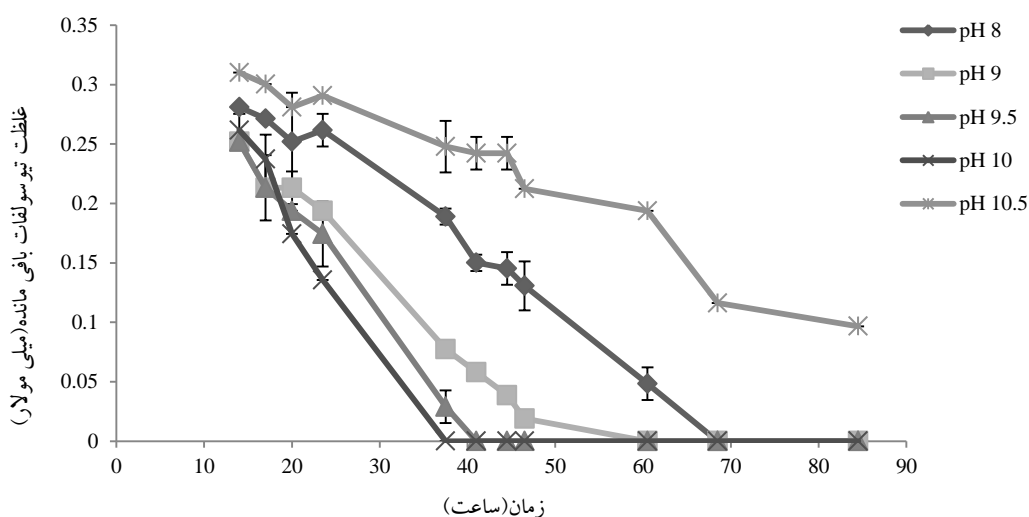
است که در pH ۱۰ و ۱۰/۵ به ترتیب، ۰/۴۹ و ۰/۱۵ میلی گرم/میلی لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد باکتری ۰/۰۹۳ بر ساعت اندازه گیری شد. باکتری در pH ۱۰ سریع تر از pH های دیگر تیوسولفات سدیم را حذف کرده است و در ساعت ۳۷/۵ رشد میزان تیوسولفات به صفر رسیده است در حالی که در pH ۱۰/۵ در ساعت ۳۷/۵ رشد تنها ۲ درصد از تیوسولفات محیط حذف شده است و در پایان ساعت ۸۴/۵ رشد، میزان حذف تیوسولفات ۶۸ درصد است. در pH های ۹/۵، ۹ و ۸ به ترتیب در ساعت رشدی ۴۱، ۶۰/۵ و ۶۸/۵ تیوسولفات به اتمام می رسد و میزان حذف تیوسولفات در ساعت ۳۷/۵ رشد به ترتیب ۸۸، ۶۷ و ۳۲ است. مقایسه ویژگی های رشدی سویه *EMA* در pH های مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است.

تعیین pH بهینه رشد و حذف تیوسولفات: از میان سویه های توالی یابی شده، سویه *EMA* برای ارزیابی فعالیت انتخاب شد و در محدوده pH ۸ تا ۱۰/۵ رشد و حذف تیوسولفات از محیط بررسی شد. در شکل های ۳ و ۴ که رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در pH های مختلف نشان می دهد مشاهده می شود که بیشترین میزان پروتئین تولید شده مربوط به pH ۱۰ و کمترین آن مربوط به pH ۱۰/۵ است. بعد از pH ۱۰، سویه *EMA* به ترتیب در pH ۹/۵، ۹ و ۸ بیشترین رشد را نشان داد. با حذف تیوسولفات به عنوان سوبسترا رشد باکتری زیاد می شود و بعد از اتمام تیوسولفات با مصرف گوگرد ترشح شده به محیط کشت، رشد ادامه می یابد و با مصرف کامل گوگرد رشد ثابت می شود. بازده رشد به صورت تولید پروتئین کل بر حسب زمان تعریف شده

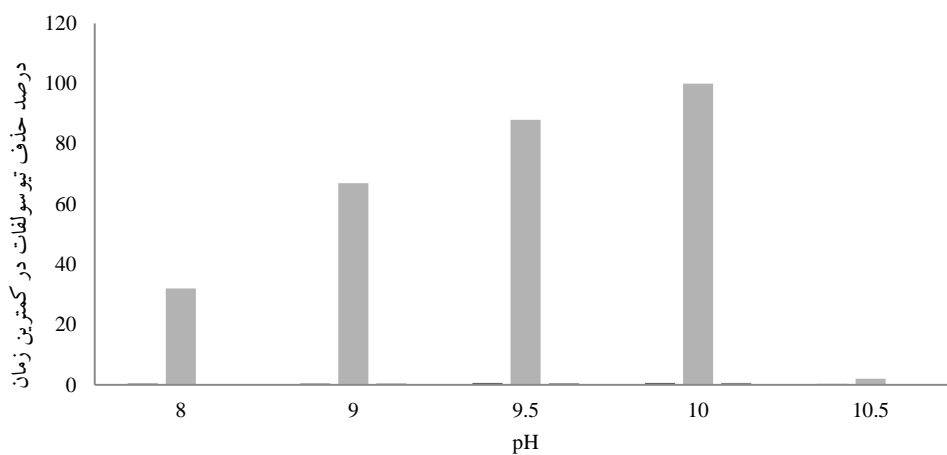




شکل ۳- تعیین بهینه رشد در pHهای مختلف توسط سویه EMA



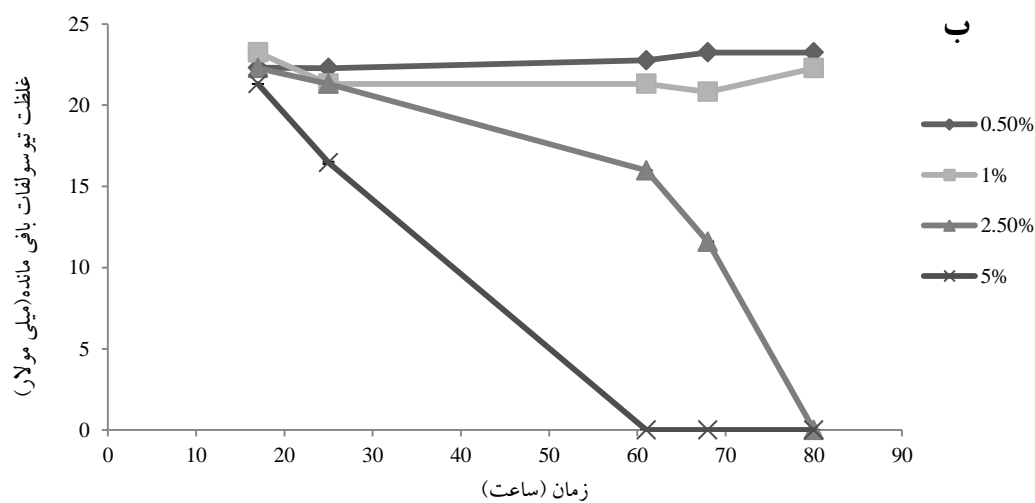
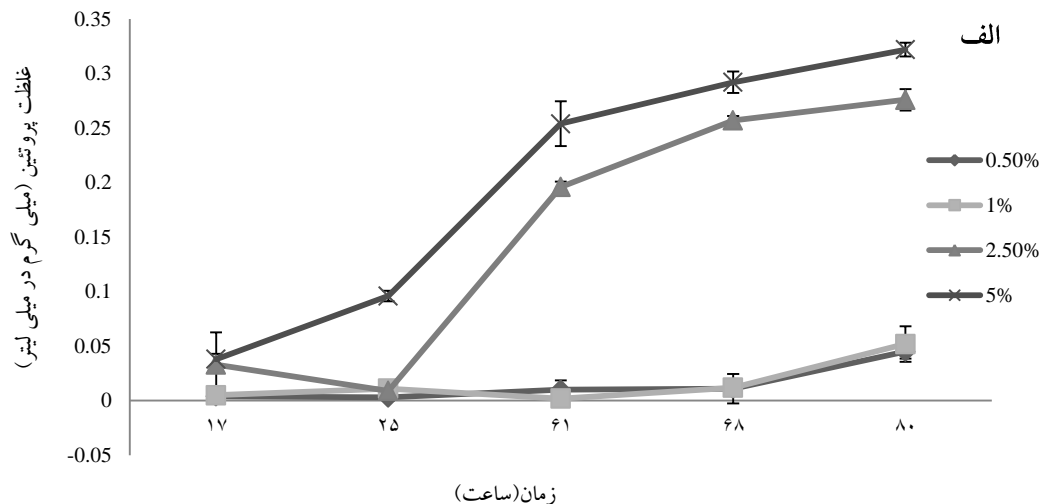
شکل ۴- تعیین بهینه حذف تیوسولفات در pHهای مختلف توسط سویه EMA



شکل ۵- مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در pHهای مختلف

میلی گرم/میلی لیتر ساعت درصد بوده است. ضریب رشد  $0.0093$  بر ساعت اندازه‌گیری شد. حذف تیوسولفات توسط باکتری در غلظت ۵ درصد سریع‌تر از  $2/5$  درصد بوده است؛ به صورتی که در غلظت ۵ درصد، در ساعت ۶۰ رشد، تمام تیوسولفات حذف شده است. در حالی که در غلظت  $2/5$  درصد تمام تیوسولفات در ساعت ۸۰ رشد حذف شده است و در ساعت ۶۰ رشد میزان حذف،  $2/8$  درصد است. در شکل ۷ مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید آورده شده است.

تعیین بهینه‌رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید: بهینه‌رشد و حذف تیوسولفات از محیط توسط سویه EMA در غلظت‌های  $0/5$  تا ۵ درصد سدیم کلرید تعیین شد. شکل ۶ رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود باکتری در غلظت‌های  $0/5$  و ۱ درصد سدیم کلرید در بازه زمانی ۸۰ ساعت رشد نداشته است. سریع‌ترین رشد مربوط به غلظت ۵ درصد سدیم کلرید بوده است و بازده رشد سویه در غلظت ۵ و  $2/5$  درصد به ترتیب  $0/4$  و  $1/34$

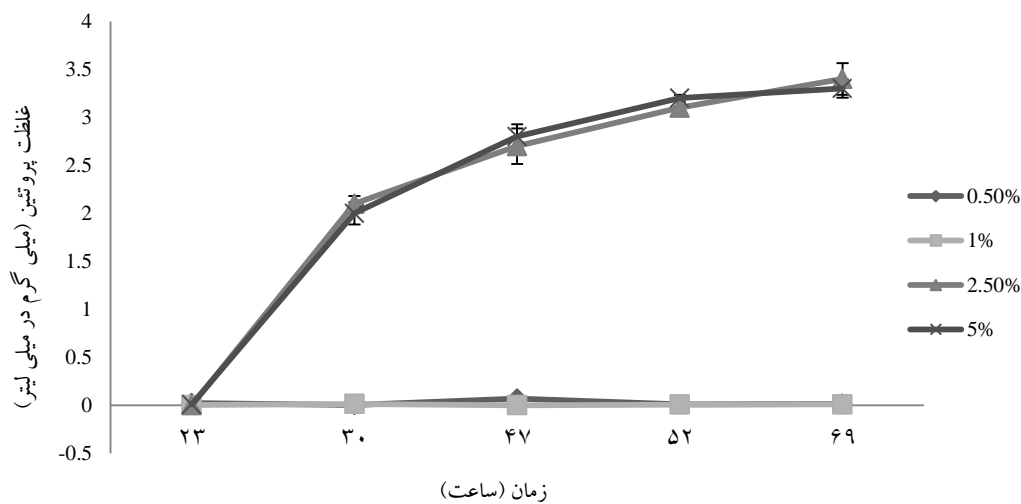


شکل ۶- تعیین بهینه‌رشد توسط سویه EMA (الف) تعیین بهینه‌حذف تیوسولفات توسط سویه EMA (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید

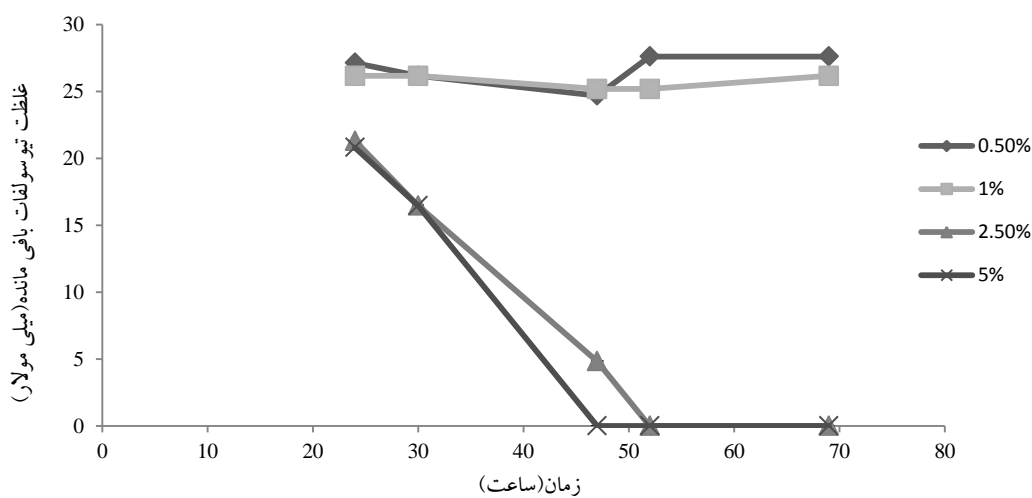


شکل ۷- مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید

الف

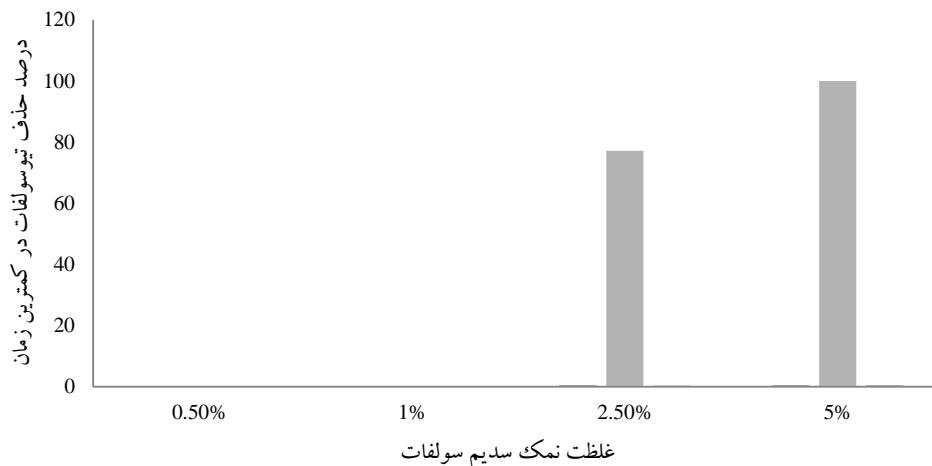


ب



شکل ۸- تعیین بهینه رشد توسط سویه *EMA* (الف) تعیین بهینه حذف تیوسولفات توسط سویه *EMA* (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات

باکتری ۰/۰۲۳ بر ساعت تعیین شد. حذف کامل تیوسولفات در غلظت ۵ و ۲/۵ درصد، به ترتیب در ساعت رشدی ۴۷ و ۵۲ انجام شد به طوری که میزان حذف تیوسولفات در غلظت ۲/۵ درصد سدیم سولفات در ساعت رشدی ۴۷ و ۷۷ درصد بوده است. شکل ۸ رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات نشان می‌دهد. در شکل ۹ مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات نشان داده شده است.



شکل ۹- مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات

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 اکسیدکننده ترکیبات گوگردی جداسازی و شناسایی شدند. در مطالعه حاضر، جداسازی از تالاب میقان دارای خاک گوگردی با pH ۷/۶ انجام شد که منجر به جداسازی چهار سویه از جنس *Thioalkalivibrio* شد. به دلیل نبود دریاچه‌های سودا در ایران، جداسازی این باکتری‌ها از تالاب میقان می‌تواند نقطه قوتی برای این پژوهش باشد. با توجه به رویکرد این

تعیین بهینه رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات: بهینه رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵ درصد سدیم سولفات بررسی شد. در مورد نمک سدیم سولفات در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد رشد مشاهده نشد و در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد نمک، هر دو تقریباً هم‌زمان شروع به رشد کردند. میزان پروتئین تولیدی نیز در هر دو غلظت ۲/۵ و ۵ درصد با هم یکسان بود و باکتری بعد از زمان ۳۰ ساعت به فاز لگاریتمی رسید و بازده رشد سویه در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد، ۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به تولید حجم قابل توجهی از سود مصرف‌شده سولفیدی در کشور، به جداسازی باکتری‌های بومی برای تیمار این پساب، توجه شد. در سال ۲۰۰۰، باکتری‌های شیمیولیتوتروف اکسیدکننده ترکیبات گوگردی را سوروکین و همکارانش کشف کردند. این باکتری‌ها که در دو جنس *Thioalkalivibrio* و *Thioalkalimicrobium* قرار گرفتند از دریاچه‌های سودای سیرری و کنیا جدا شدند. در این مطالعه چندین محیط غنی‌سازی از دریاچه‌های سودای مختلف استفاده شد (۱۷). در مطالعات بعدی که

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<sup>۱۵</sup> 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 در حالی که در شرایط اکسیژن بالا، تیوسولفات مستقیماً به سولفات اکسید می‌شود. در مطالعه حاضر به دلیل 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 به دلیل 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 گونه *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 تصفیه پساب سود مصرف‌شده 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 نمک‌قلیادوست اکسیدکننده ترکیبات گوگردی بومی را برای تصفیه این پساب به کار برد.

پژوهش که جداسازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف گوگردی برای استفاده از آنها در تصفیه پساب سود مصرف‌شده است بهینه‌سازی رشد سویه *EMA* و حذف تیوسولفات از محیط کشت از نظر pH ۸ تا ۱۰/۵ و غلظت ۰/۵ تا ۵ درصد سدیم کلرید و سدیم سولفات انجام شد. به‌منظور استفاده از سویه جداسازی شده در تصفیه پساب سود مصرف‌شده با pH قلیایی، بالاترین pH که در آن باکتری بیشترین رشد و حذف تیوسولفات را داشته باشد به عنوان pH مطلوب در نظر گرفته شد. سویه *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؛ به دلیل 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 به‌عنوان بهینه در نظر گرفته شد. به دلیل بالا بودن میزان نمک سود مصرف‌شده بهینه‌سازی غلظت نمک سدیم کلرید و سدیم سولفات انجام شد. از آنجا که در مراحل خنثی‌سازی<sup>۱۴</sup> سود مصرف‌شده در صنعت از سولفوریک‌اسید استفاده می‌شود و در نهایت نمک سدیم سولفات تولید می‌شود، بهینه‌سازی رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات بررسی شد و مشخص شد که باکتری در غلظت‌های بالاتر نمک‌های سدیم سولفات و سدیم کلرید رشد سریع‌تری دارد به طوری که در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد 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 سویه *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

## References

- (1) Eugene L.M. Environmental microbiology: from genomes to bio geochemistry. 1st 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*. 1st ed. Tehran: Internal publication of Iran Gas Company; 1388.
- (4) Gadekar S., Nemati M., Hill GA. Batch 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 Technology* 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., Kolganiva T. *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) Bardi M. *Soil physics*. 1<sup>st</sup> ed. Tehran: University of Tehran; 1379.
- (22) Bozorgmehr A. *Fundamental soil physics*. 1<sup>st</sup> 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 sulfur-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*

*Biophysica 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- Marmor
  - 10- macrogen
  - 11- alignment
  - 12- Boot Strap
  - 13- Out group
  - 14- neutralization
  - 15- Poly extreme