

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

سهمیه مکمل: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، somayemakzum@gmail.com
محمدعلی آموزگار*: استناد 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 10 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

Archive of SID

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 (1 و 2). از آنجا که بیش از 70 درصد از میادین نفت و گاز کشور به‌صورت ترش است حذف ترکیبات گوگردی از نفت و گاز اهمیت زیادی دارد (3). یکی از آلاینده‌های صنعتی که به‌دلیل ویژگی‌های خاص آن بسیار به آن توجه شده است پسابی به‌نام سود مصرف‌شده¹ 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 12 سود مصرف‌شده سولفیدی، شوری 5 تا 12 درصد وزنی و مقدار بالای ترکیبات سولفیدی که از 2 تا 3 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 فیزیکوشیمیایی تصفیه پساب سود مصرف‌شده که در حال حاضر بسیار استفاده می‌شود، روش اکسیداسیون با هوای مرطوب² 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 (4 و 12). در روش زیستی تصفیه سود مصرف‌شده سولفیدی، تصفیه در راکتورهای هوازی و با کمک باکتری‌های اکسیدکننده ترکیبات گوگردی انجام می‌شود و درنهایت 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 (5، 9 و 12). 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 (13 و 14). در سال 2000 سوروکین³ و همکاران باکتری‌های شیمیولیتوتروف اجباری نمک‌قلیادوست را کشف و بررسی کردند. این باکتری‌ها از دریاچه‌های سودای سبیری⁴ و کنیا⁵ جدا شده است که در آن کربنات/بیکربنات سدیم به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کند و شرایط بافری را در pH قلیایی بین 9 تا 10/5 ایجاد و حفظ می‌کند. این گروه از باکتری‌ها دارای سه جنس *Thioalkalimicrobium*، *Thioalkalivibrio* و *Thioalkalispira* هستند که از لحاظ تحمل نمک متفاوت هستند. سویه‌های جداشده از دریاچه‌های سودای سبیری دارای درصد G+C کم هستند (48 و 51 درصد مولی) در صورتی که سویه‌های

است مناسب بود. نمونه‌برداری از خاک تالاب میقان در آذرماه 91 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 (20، 22). آنالیز خاک تالاب میقان از نظر عناصر و یون‌های موجود در آن با روش جذب اتمی⁶ و با استفاده از دستگاه شعله‌سنجی⁷ 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 9/8 و 3/6 درصد نمک که در جدول 1 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 9 تا 10/5، شرایط قلیایی مناسب را برای رشد باکتری‌های نمک‌قلیادوست موردنظر فراهم می‌کنند. ارلن‌های حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت، در دمای 30 درجه سانتی‌گراد با دور شیکر 150 rpm، 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 ذکرشده در جدول 1 به‌همراه آگار (1/5 درصد آگار) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، محیط پایه معدنی و آگار به‌صورت جداگانه

در گروه باکتری‌های با درصد G+C بالا قرار می‌گیرند. این گروه‌های باکتریایی متعلق به 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 (15، 18). 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 15 کیلومتری شمال شرقی شهر اراک در استان مرکزی واقع شده است (19). بعضی از نواحی آن دارای خاک گوگردی و سیاه‌رنگ است و برای هدف موردنظر این مطالعه که جداسازی باکتری‌های گوگردی

برماید رنگ آمیزی شد و توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شد. به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* محصول PCR از طریق شرکت تکاپوزیست به شرکت ماکروژن¹ 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 Parsimony و Maximum Likelihood انجام گرفت (26-29).

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 (30). رشد باکتری در محدوده pH 8 تا 10/5 براساس روش پروتئین‌سنجی تعیین شد و برای سنجش حذف سدیم تیوسولفات از روش تیتراسیون استفاده شد. نمونه‌ها در دمای 35 درجه سانتی‌گراد با دور شیکر 150 rpm گرماگذاری شد. برای ایجاد محیط با pH 8، تنها

اتوکلاو شد و بعد از رسیدن به دمای 60 درجه سانتی‌گراد، در شرایط استریل به هم اضافه شد. این کار برای جلوگیری از کارامله شدن آگار در دمای بالا و pH قلیایی صورت گرفت (15-18). برای مشخص کردن سویه‌های اتوتروف اجباری از اختیاری، بعد از خالص‌سازی روی محیط جامد اتوتروفي، نمونه‌ها در نوترینت آگار (آگار خالص محصول شرکت مرک)² کشت داده شدند (17).

جدول 1 ترکیبات محیط کشت

20 گرم	سدیم کربنات	محیط پایه معدنی (1 لیتر)
10 گرم	سدیم بی‌کربنات	
5 گرم	سدیم کلرید	
1 گرم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات	
2 میلی‌لیتر/لیتر	عناصر کم‌مقدار	
5 میلی‌مولار	منیزیم کلرید	
5 میلی‌مولار	پتاسیم نترات	
40 میلی‌مولار	سدیم تیوسولفات 5آبه	

شناسایی کلنی‌ها از نظر رنگ و شکل در محیط جامد بررسی شدند. برای شناسایی اولیه باکتری از رنگ آمیزی گرم و تست KOH استفاده شد (23 و 24). شناسایی تکمیلی جدایه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی به روش مارمور³ انجام شد. PCR ژن *16S rRNA* با استفاده از پرایمرهای جهانی رفت و برگشت (پرایمر رفت F 27 با توالی AGAGTTTGATCMTGGCTCAG و دمای اتصال 56/3 و پرایمر برگشت R 1492 با توالی GGTTACCTTGTTACGACTT و دمای اتصال 54 درجه سانتی‌گراد) انجام شد (25). محصول PCR بر ژل آگارز 0/7 درصد الکتروفورز شد و با استفاده از اتیدیوم

غلظت‌های مختلف سدیم کلرید: بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های 0/5 تا 5 درصد (وزنی / حجمی) نمک سدیم کلرید بررسی شد. سنجش رشد براساس پروتئین سنجی و حذف سدیم تیوسولفات براساس روش تیتراسیون انجام شد (30).

تعیین بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات: بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات توسط آن در غلظت‌های 0/5 تا 5 درصد (وزنی / حجمی) نمک سدیم سولفات بررسی شد. سنجش رشد و حذف تیوسولفات مطابق روش گفته شده در بالا انجام شد (30).

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 7/6 و شوری آن 0/3 درصد گزارش شد. در جدول 2 آنالیز عناصر خاک تالاب میقان آورده شده است.

جدول 2 آنالیز نمونه خاک تالاب میقان

عناصر	مقدار (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
Na ²⁺	1/42
Mg ²⁺	0/18
K ⁺	2
Ca ²⁺	410
Fe ²⁺	0/7
Cl	1065
HCO ₃ ⁻	61

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی: پس از

سدیم بی‌کربنات به عنوان منبع کربن در نظر گرفته شد. برای تهیه محیط‌های فوق از معادله هندرسون هاسلباخ و pH متر استفاده شد. نمونه برداری در ابتدای فاز تأخیر، با فاصله زمانی 6 تا 7 ساعت انجام شد و پس از آن در فاز لگاریتمی هر 2 تا 3 ساعت نمونه برداری شد و غلظت پروتئین و میزان حذف سدیم تیوسولفات آن سنجیده شد. (30 و 31).

- برای تعیین غلظت کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد، یک میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت 10 دقیقه با دور 11500 سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و برای تخریب سلول و سنجش کل پروتئین سلول باکتری، 100 میکرولیتر سدیم هیدروکسید به پلیت سلولی اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای 100 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از آن به مدت 10 دقیقه با دور 11500 سانتریفیوژ شد. سپس 20 میکرولیتر از مایع رویی در یک کوت ریخته شد و 1000 میکرولیتر معرف برادفورد به آن اضافه گردید. پس از هم‌زدن نمونه‌ها، جذب آنها در طول موج 595 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 (32).

- برای سنجش حذف سدیم تیوسولفات از روش تیتراسیون با محلول یدین 10 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 (36 و 37).

تعیین بهینه رشد باکتری و حذف تیوسولفات در

هم‌ترازی سویه‌ها مشخص کرد که باکتری‌های ذکر شده، متعلق به جنس *Thioalkalivibrio* هستند و توالی به‌دست آمده بیشترین شباهت را به سویه *Thioalkalivibrio versutus* نشان می‌دهند. سویه *EMA*، *HMA*، *KMA* و *DMA* به ترتیب به میزان 100، 99، 100 و 100 درصد به *Thioalkalivibrio versutus* شباهت دارند.

از توالی ژنی *16S rRNA* به‌دست آمده از جدایه‌های بررسی شده، درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor Joining و ضریب بوت استرپ^{۱۲} صد و با استفاده از نرم‌افزار Mega 6 رسم شد. درخت فیلوژنتیک سویه‌های به‌دست آمده، در شکل 2 نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود فاصله فیلوژنی سویه‌های مورد نظر نسبت به برون گروه^{۱۳} آن که باکتری *Thioalkalimicrobium aerophilum* است مقایسه شده است. این باکتری یک جنس جدا را در باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست اکسیدکننده ترکیبات گوگردی تشکیل می‌دهد.

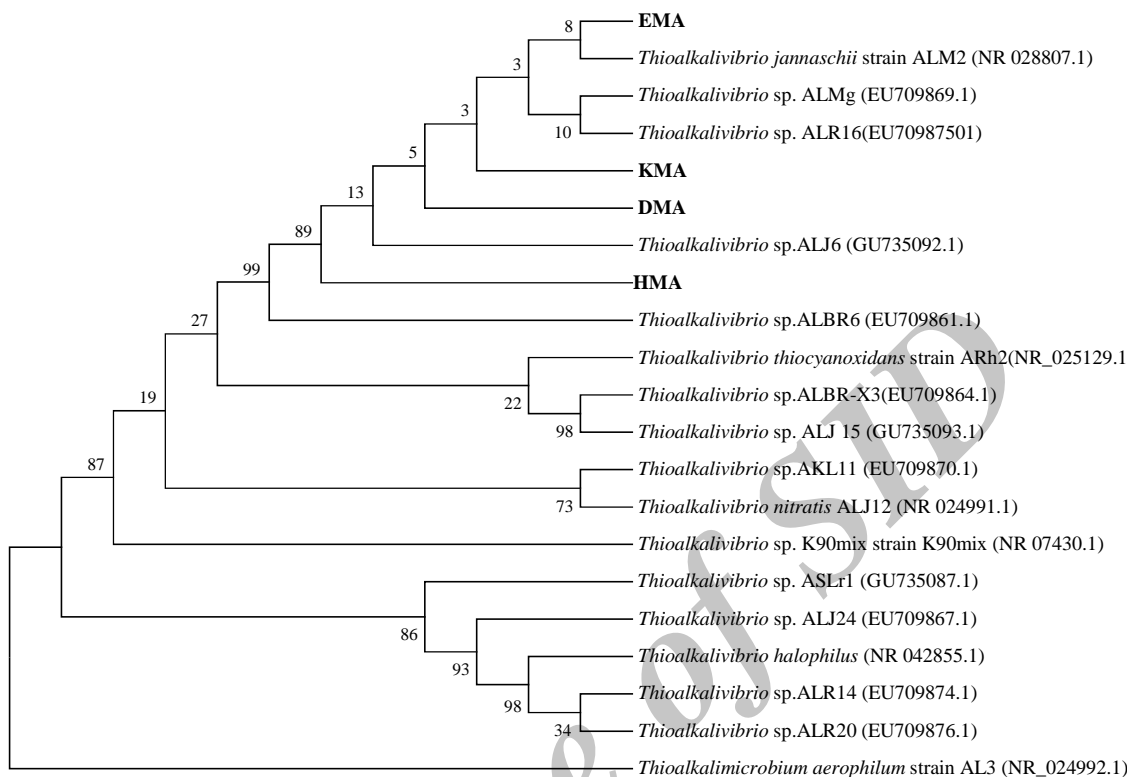


شکل 1 کلنی باکتری سویه *EMA*

خالص سازی متوالی در کشت جامد، 10 سویه جدا شد. کلنی‌های جوان سویه‌های جدا شده، در سطح پلیت دارای گوگرد سفیدرنگ در سلول است که با پیر تر شدن سلول، زردرنگ دیده می‌شود. برای اطمینان از شیمیولیتوتروف بودن سویه‌های جدا شده، مجدداً در کشت مایع کشت داده شدند. سویه‌ها بعد از یک هفته انکوباسیون، توانایی رشد در محیط مایع با همان ترکیبات بیان شده در جدول 1 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 10 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 1 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 پری پلاسم خود دارند.

از میان سویه‌های جدا شده، به صورت تصادفی، 4 سویه *EMA*، *HMA*، *DMA* و *KMA* برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. پس از استخراج ژنوم، انجام PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA*، توالی‌های به‌دست آمده هم‌تراز^{۱۱} و با میکروارگانیزم‌های موجود در بانک ژنی Eztaxon مقایسه شد. نتایج حاصل از

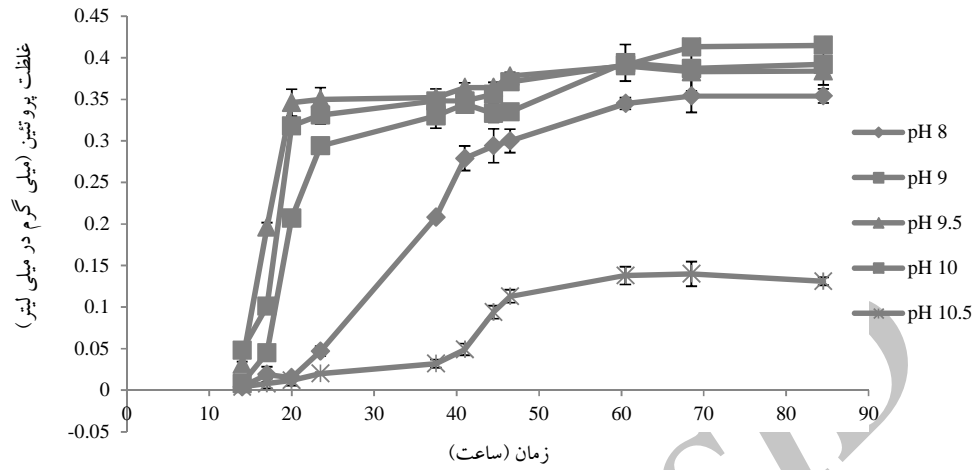


شکل 2 درخت فیلوژنی سویه‌های جداشده

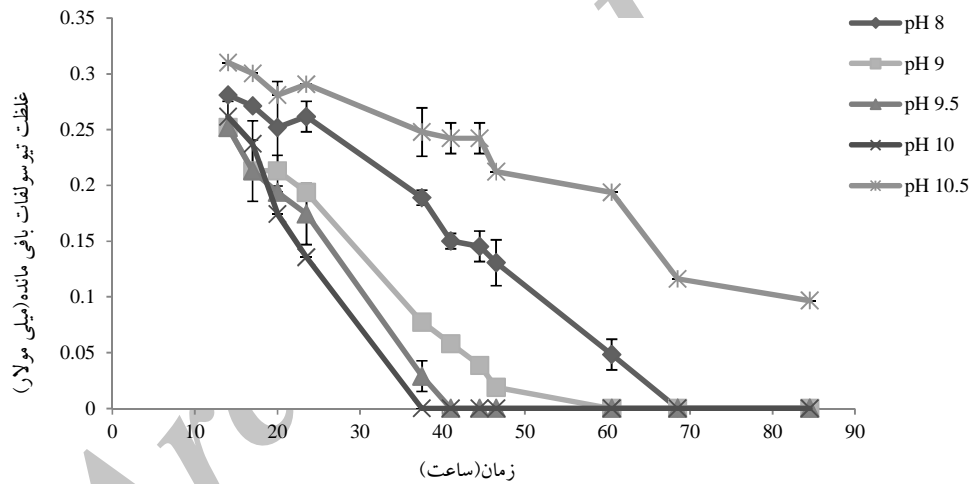
به صورت تولید پروتئین کل برحسب زمان تعریف شده است که در pH 10 و 10/5 به ترتیب، 0/49 و 0/15 میلی‌گرم/میلی‌لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد باکتری 0/093 بر ساعت اندازه‌گیری شد. باکتری در 10pH سریع‌تر از pHهای دیگر تیوسولفات سدیم را حذف کرده است و در ساعت 37/5 رشد میزان تیوسولفات به صفر رسیده است درحالی‌که در 10/5pH در ساعت 37/5 رشد تنها 2درصد از تیوسولفات محیط حذف شده است و در پایان ساعت 84/5 رشد، میزان حذف تیوسولفات 68درصد است. در pHهای 9/5، 9 و 8 به ترتیب در ساعت رشدی 41، 60/5 و 68/5 تیوسولفات به اتمام می‌رسد و میزان حذف تیوسولفات در ساعت 37/5 رشد به ترتیب 88،

تعیین pH بهینه رشد و حذف تیوسولفات: از میان سویه‌های توالی‌یابی شده، سویه *EMA* برای ارزیابی فعالیت انتخاب شد و در محدوده pH 8 تا 10/5 رشد و حذف تیوسولفات از محیط بررسی شد. در شکل‌های 3 و 4 که رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در pHهای مختلف نشان می‌دهد مشاهده می‌شود که بیشترین میزان پروتئین تولیدشده مربوط به pH 10 و کمترین آن مربوط به pH 10/5 است. بعد از pH 10، سویه *EMA* به ترتیب در pH 9/5، 9 و 8 بیشترین رشد را نشان داد. با حذف تیوسولفات به‌عنوان سوستر رشد باکتری زیاد می‌شود و بعد از اتمام تیوسولفات با مصرف گوگرد ترشح شده به محیط کشت، رشد ادامه می‌یابد و با مصرف کامل گوگرد رشد ثابت می‌شود. بازده رشد

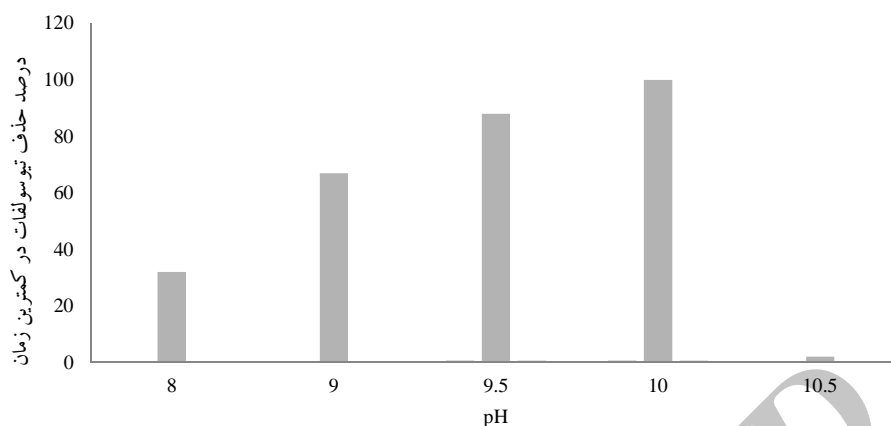
67 و 32 است. مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه *EMA* در pHهای مختلف در شکل 5 نشان داده شده است.



شکل 3 تعیین بهینه رشد در pHهای مختلف توسط سویه *EMA*



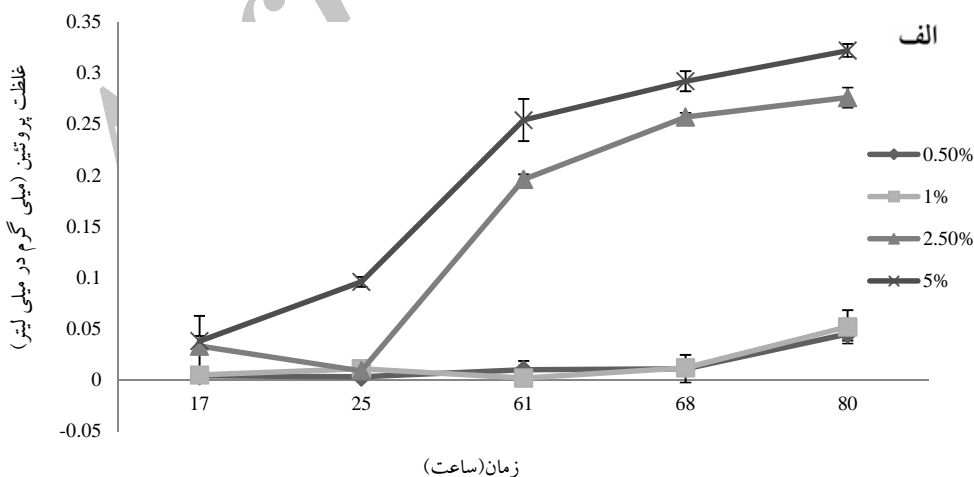
شکل 4 تعیین بهینه حذف تیوسولفات در pHهای مختلف توسط سویه *EMA*

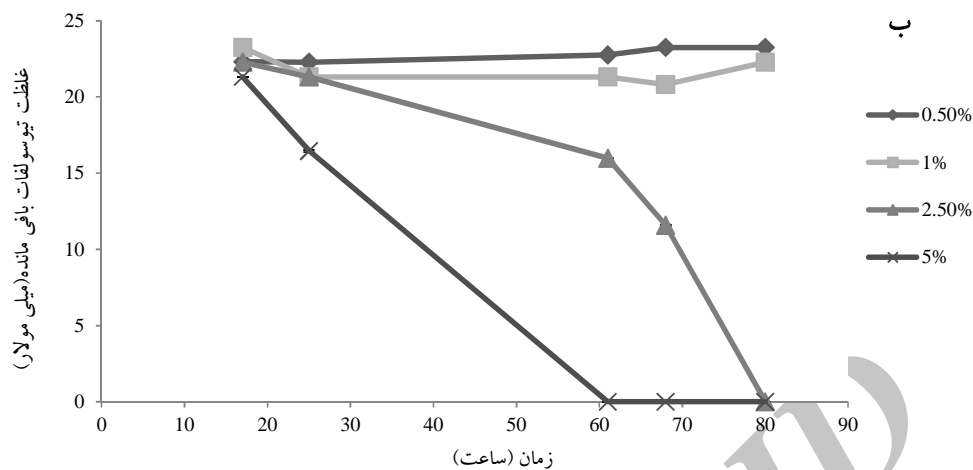


شکل 5 مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در pHهای مختلف

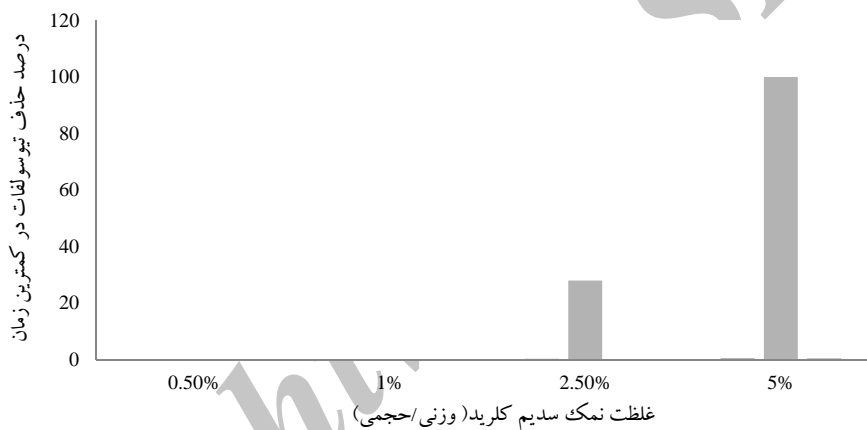
34 میلی گرم/میلی لیتر ساعت درصد بوده است. ضریب رشد 0/0093 بر ساعت اندازه‌گیری شد. حذف تیوسولفات توسط باکتری در غلظت 5 درصد سریع‌تر از 2/5 درصد بوده است؛ به صورتی که در غلظت 5 درصد، در ساعت 60 رشد، تمام تیوسولفات حذف شده است. در حالی که در غلظت 2/5 درصد تمام تیوسولفات در ساعت 80 رشد حذف شده است و در ساعت 60 رشد میزان حذف، 28 درصد است. در شکل 7 مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید آورده شده است.

تعیین بهینه رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید: بهینه رشد و حذف تیوسولفات از محیط توسط سویه EMA در غلظت‌های 0/5 تا 5 درصد سدیم کلرید تعیین شد. شکل 6 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 1 درصد سدیم کلرید در بازه زمانی 80 ساعت رشد نداشته است. سریع‌ترین رشد مربوط به غلظت 5 درصد سدیم کلرید بوده است و بازده رشد سویه در غلظت 5 و 2/5 درصد به ترتیب 0/4 و

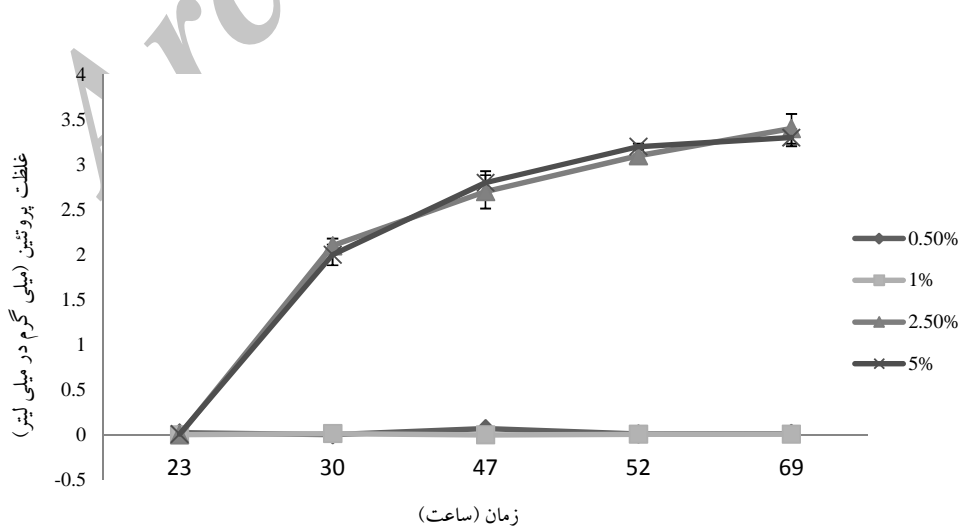




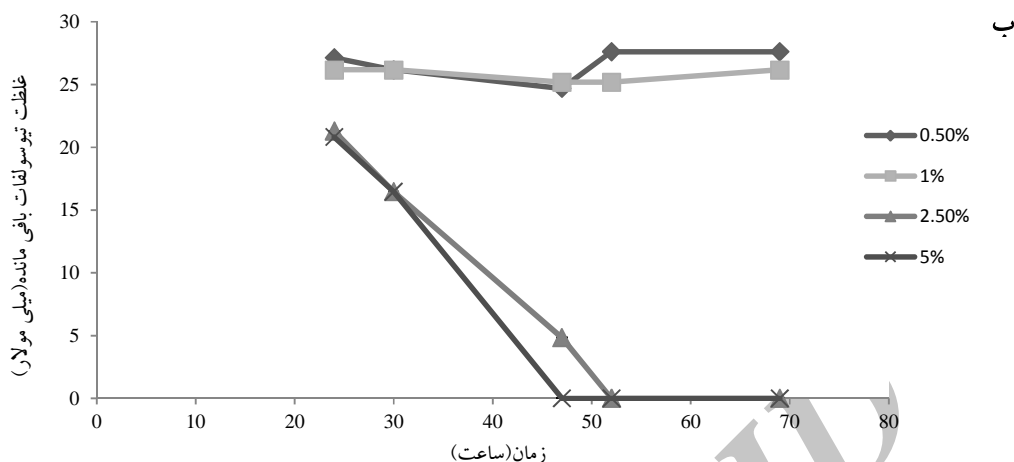
شکل 6 تعیین بهینه رشد توسط سویه EMA (الف) تعیین بهینه حذف تیوسولفات توسط سویه EMA (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید



شکل 7 مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه EMA در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید

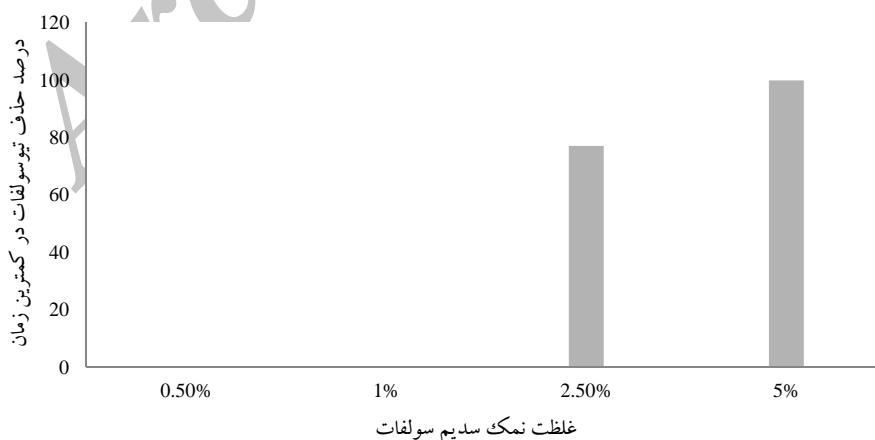


الف



شکل 8 تعیین بهینه رشد توسط سویه *EMA* (الف) تعیین بهینه حذف تیوسولفات توسط سویه *EMA* (ب) در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات باکتری 0/023 بر ساعت تعیین شد. حذف کامل تیوسولفات در غلظت 5 و 2/5 درصد، به ترتیب در ساعت رشدی 47 و 52 انجام شد به طوری که میزان حذف تیوسولفات در غلظت 2/5 درصد سدیم سولفات در ساعت رشدی 47 و 77 درصد بوده است. شکل 8 رشد باکتری و حذف تیوسولفات از محیط را در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات نشان می‌دهد. در شکل 9 مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات نشان داده شده است.

تعیین بهینه رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات: بهینه رشد و حذف تیوسولفات در غلظت‌های 0/5 تا 5 درصد سدیم سولفات بررسی شد. در مورد نمک سدیم سولفات در غلظت 0/5 و 1 درصد رشد مشاهده نشد و در غلظت‌های 2/5 و 5 درصد نمک، هر دو تقریباً هم‌زمان شروع به رشد کردند. میزان پروتئین تولیدی نیز در هر دو غلظت 2/5 و 5 درصد با هم یکسان بود و باکتری بعد از زمان 30 ساعت به فاز لگاریتمی رسید و بازده رشد سویه در غلظت‌های 2/5 و 5 درصد، 0/5 میلی گرم/میلی لیتر ساعت درصد است. ضریب رشد



شکل 9 مقایسه ویژگی‌های رشدی سویه *EMA* در غلظت‌های مختلف سدیم سولفات

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 2000، 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 سیری و کنیا جدا شدند. در این مطالعه چندین محیط غنی‌سازی از دریاچه‌های سودای مختلف استفاده شد (17). 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 (17، 18، 19 و 38). 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 7/6 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 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 8 تا 10/5 و غلظت 0/5 تا 5 درصد سدیم کلرید و سدیم سولفات انجام شد. به منظور استفاده از سویه جداشده در تصفیه پساب سود مصرف‌شده با pH قلیایی، بالاترین pH که در آن باکتری بیشتری رشد و حذف تیوسولفات را داشته باشد به عنوان pH مطلوب در نظر گرفته شد. سویه EMA، در

10 pH، با سرعت بیشتری تیوسولفات را حذف کرده است. اگرچه میزان پروتئین تولیدشده در pH‌های 9/5 و 9 تقریباً برابر با 10 pH است؛ به دلیل سرعت بیشتر حذف تیوسولفات توسط باکتری، 10 pH به عنوان بهینه در نظر گرفته شد. در پژوهش‌هایی که سوروکین و همکاران (17 و 39) انجام دادند 10 pH به عنوان بهینه در نظر گرفته شد. به دلیل بالابودن میزان نمک سود مصرف‌شده بهینه‌سازی غلظت نمک سدیم کلرید و سدیم سولفات انجام شد. از آنجا که در مراحل خنثی‌سازی^{۱۴} سود مصرف‌شده در صنعت از سولفوریک اسید 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 0/5 و 1 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 (39) 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 به عنوان ترکیب واسطه به صورت درون سلولی یا

تصفیه زیستی سود مصرف شده مربوط به استفاده از گونه *Thiobacillus denitrificans* بوده است. عدم رشد در pH بالا و نیاز به آب فراوان برای رقیق‌سازی سود مصرف شده، باعث توجه دانشمندان به استفاده از باکتری‌های شیمیولیتوتروف نمک‌قلیادوست برای تصفیه پساب سود مصرف شده سولفیدی شده است و مطالعاتی در این زمینه انجام شده است (5 و 9). 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.

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