عزل وتشخيص البكتريا المؤكسدة والمختزلة للمياه الكبريتية في منطقة الكيلو 70 في صحراء الانبار الغربية

أ.د. ادهام علي عبد العسافي[1] واحمد شاكر[2] و أ.م.د. سيف الدين عبدالرزاق[3]

1 و2 كلية الزراعة جامعة الانبار و3 مركز دراسات الصحراء جامعة الانبار

الخلاصة

نفذ البحث في كلية الزراعة – جامعة الأنبار لدراسة تواجد وانتشار البكتريا المؤكسدة والمختزلة لمركبات الكبريت و إمكانية عزلها وتشخيصها لاستعمالها كلقاحات ميكروبية لمعالجة المياه الكبريتية و زيادة إمكانية استغلال الموارد المائية الكبريتية المتاحة في منطقة الصحراء الغربية، لذلك أجريت عملية دراسة ميدانية للآبار المنتشرة في منطقة الصحراء الغربية الكيلو 70 وتحديد تصريفها ومستوى الكبريت في مكوناتها. أجريت عملية دراسة التواجود الميكروبي للبكتريا المؤكسدة والمختزلة لمركبات الكبريت. أظهرت النتائج تواجد البكتريا المؤكسدة والمختزلة لمركبات الكبريت في المياه الكبريتية في منطقة الكيلو70 اذ تميزت هذه المياه ايضا بمحتوى عالي للكبريت و تم الحصول على اربعة عزلات بكتيرية مؤكسدة لمركبات الكبريت بنسبة تواجد 40%، شخص منها عزلتين بكتيريتين مؤكسدة لمركبات الكبريت الأولى *T.thiopurus* المؤكسدة الضوئية لمركبات الكبريت والثانية *T.dovellus* المؤكسدة الرمية. كما تم حصول على عزلتين من البكتريا المختزلة اللاهوائية و بنسبة 20% ، شخص منها عزلة *Desulfovibro spp.* وتم تحضير لقاحات ميكروبية منها.

Isolated and identification the oxadition and reduction bacteria from sulfate water in 70 K. region

Idham A.A.[1], A.Shakar [2] , S. Abed Arzga[3]

1,2 collage of agriculture 3, study desert center Anbar UNV

Abstract

A study was conducted at college of Agriculture University Anbar for evaluate the suitability of available sulfur water resources in the western desert region ,The study was focused on the available water treatment choices which guaranteed using sulfur water without any environment or health risks. A field study and survey for the existing wells was carried out including determination at wells flow rate, sulfur compounds content. Abundance and distribution for Sulfur oxidizing and reducing bacteria was isolated and study. The results showed the sulfur water was already existing in the western desert region particulate in the kilo 70 area which has the highest sulfur content, four sulfur oxidizer bacterial isolates were obtained 40% percentage and identification 2 isolates the first on *T. thiopurus* and the second *T. dovellus,* also gets 2 isolates from the sulfur reductase anaerobic bacteria with 20% percentage , identification to *Desulfovibro spp*. also microbial inoculated was prepared.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة

توجد المياه الكبريتية في محافظة الانبار ضمن المياه الجوفية على شكل عيون وينابيع تنتشر في مناطق مختلفة في المنطقة الصحراوية، ويوجد الكبريت في المياه بصور عديدة أكثرها أيون الكبريتات SO_4^{-2} بتراكيز متباينة تصل إلى2000 ملغم لتر$^{-1}$، وبرزت الحاجة إلى ضرورة استغلال هذه المياه في ظل الحاجة لعملية الاستغلال الصحراء الغربية وإنشاء الاحزمة الخضراء وتقليل اثر العواصف الترابية في ظل التغيرات المناخية العالمية مما تشير إلى اهمية معالجة هذه المياه ، واستخدمت عدة طرائق بايولوجية باستخدام بكتريا *Thiobacill soxidaus* و*Desulfovibrio desulfuricans* لكفاءتهما في أكسدة واختزال مركبات الكبريت وخفض تراكيز الكبريت الخطرة (1و 2).

تكون الأحياء المجهرية مسؤولة عن تحويل صور الكبريت اذ تعمل البكتريا المختزلة للكبريت على تحويل الكبريت المعدني S إلى صورة HS و H_2S ثم يتحرر بشكل غاز (3). وتحدث عملية اختزال مركبات الكبريت المعدنية بصورة غازية تحت الظروف اللاهوائية يقوم بها العديد من الأحياء من أهمها البكتريا التابعة لجنس *Desulfuvibrio* و *Desulfotomaculum* التي تسيطر على عمليات الاختزال بعمل نظام بيئي ومورفولوجي ملائم لمجاميعها الميكروبية (4). وأكدت دراسة قام بها (5) أن بكتريا *Thiobacillus.ferrooxidans* تقوم بتحويل H_2S إلى مركبات بروتينية داخل الخلية ، في حين تقوم بكتريا الاختزال SBR (Sulfur Bacteria Reduction) بتحويل SO_4^{-2} إلى H_2S الذي تستعمله بعض انواع الأحياء البكتيرية ذاتية التغذية في إنتاج الطاقة لها وتصنيع مركباتها الغذائية (6). كما وجدت علاقة تعايش بين البكتريا المختزلة SRB والمؤكسدة SOB في بيئة واحدة، ويبدو أن البكتريا المؤكسدة للكبريت تمتلك نشاطاً يسيطر على البكتريا المؤكسدة الضوئية (7). كما تنتج البكتريا المختزلة للكبريت إنزيمات متعددة مساعدة لاختزال الكبريتات تلعب دورا رئيسا في نشاط اختزال الكبريتات منها إنزيم الفوسفوتيز و ATP-ase و الباسلفيت (8)، وتعد تراكيز الكبريتات والمادة العضوية والتوازن البايولوجي ودرجات الحرارة من العوامل الرئيسة المؤثرة في توزيع وانتشار البكتريا المختزلة للكبريت ونشاطها في اختزال الكبريتات(9). هناك عدد كبير من الأحياء المجهرية لها القدرة على أكسدة الكبريت منها الأحياء المجهرية المؤكسدة للكبريت ذاتية التغذية التابعة للجنس *Thiobacillus* وبعض الأحياء المجهرية رمية التغذية من بكتريا وفطريات وبكتريا شعاعية هي المسؤولة عن أكسدة الكبريت (10). استطاع (11) من عزل *Thiobacillus* من الحمأة الهوائية الناتجة من مخلفات عمل معالجة النفايات، وأجرى تجارب باستخدام التقانات الحيوية لاستعمالها في إزالة مركبات H_2S من مياه الفضلات. وأكد(12) وجود بكتريا Desulfovibrio speces وانتشارها في الرواسب الطينية للمياه الكبريتية وأنها تتأثر بتركيز الكبريت وكبريتيد الهيدروجين، كما عزل (13) بكتريا D. elcholovorans المختزلة للكبريتات من المخلفات الصناعية اللاهوائية الناتجة من صناعات الكحول وتصنف البكتريا بمحتوى 64.5% G+C%. وحصل (14)على 6 عزلات تابعة لجنس Thiobacillus من نماذج أخذت من مفاصل للمواقع السائلة لأحد المعامل الصناعية وقد وصلت الكثافة المكروبية 102 وحدة تكوين مستعمرة غم-1 وشخصت منها

T.thioparus و T.intemedius و T.novellus وكانت اختيارية التغذية الكيميائية وتناقص عدد البكتريا T. thoxidnas بزيادة التهوية لمكونات الوسط بالأوكسجين النقي. كما عزل (15) أربعة عزلات تابعة Thiobacillus من مخلفات المياه الصناعية لمعمل المطاط وتمكنت جميع العزلات من النمو في الظروف الهوائية، كما أنها تمكنت من البقاء في الظروف قليلة التهوية أو اللاهوائية، كذلك كانت العزلات الأربع كيميائية ضوئية التغذية وكيميائية عضوية التغذية تنمو بدرجات حرارة 25-45 مo وبدرجة مثالية بين30-35 مo وبعد مدة 14يوماً من إضافة لقاحها في مياه المخلفات الصناعية الكبريتية تمكنت إحدى العزلات من إزالة نسبة عالية 54% من COD و 33% من BOD في حين تمكنت عزلة أخرى من إزالة 83%من BOD و 46% من COD للمياه الصناعية المعالجة. وتمكن (16) من الحصول على عزلات من Thiobacillus تمكنت من تشخيص سلالات منها T.neapolitonus التي ظهرت عند استعمالها في اكسدة مركبات الكبريتيد بنسبة 50%إلى مركب الكبريت المعدني الراسب.

المواد وطرائق العمل

اختيرت منطقة الكيلو 70 التي تقع غرب مدينة الرمادي بمسافة 70 كم وعلى خط عرض وطول "34°5'20.25 "42°39'34.05 واعتمادا على أهمية الموقع من حيث التصريف المقدر للمصادر المائية. جلبت عينة ماء بحجم 1 لتر وبثلاثة مكررات من فوهة البئر الرئيسي في المنطقة لتحديد نوعية المياه وصلاحيتها للأغراض الزراعية وإجريت تحليلات مختبرية (17) شملت الرقم الهيدروجيني والإيصالية الكهربائية وتركيز الصوديوم والكالسيوم والبوتاسيوم والمغنيسيوم والكبريتات والكلور والكاربونات والبيكاربونات و كبريتيد الهيدروجين والمتطلب البايولوجي للأوكسجين(BOD biooxegen demand) والمتطلب الكيميائي للأوكسجين (COD chemooxegen demand) ومجموع الأملاح الذائبة (TDS total dissolve salte) وحساب نسبة امتزاز الصوديوم (SAR).

عزل وتشخيص البكتريا المؤكسدة لمركبات الكبريت *Thiobacillus*

جلبت عشرة عينات ماء بحجم 1 لتر وبثلاثة مكررات من مواقع مختلفة امتدت من فوهة البئر الرئيسي الى مسافة 90 م من مجرى المياه لنفس للبئر وبمعدل عينة لكل 10 م. نقلت العينات إلى المختبر في قناني مظلمة ومعقمة. حضر وسط الأملاح المعدنية Mineral Salts Medium(MSM) وحسب ما ورد في (18) في أنابيب اختبار زجاجية بمعدل 10مل وعقم في المؤصدة على 120 م° وضغط 1.5 جو لمدة 20 دقيقة ، بردت الأوساط ثم لقحت من 1 مل من المياه الكبريتية مع ترك معاملة سيطرة ، نميت في حاضنة دون رج في 35 م° ولمدة 14 يوماً ودل ظهور العكرة وتطورها على وجود النمو الميكروبي (18). لقح وسط MSM(Mineral Salts Medium) الصلب من الأنابيب التي ظهر فيها النمو للعزلات ذات الرمز K700 و K701 و K702 و K705 و K707 بطريقة التخطيط وحضنت تحت الظروف المشار إليها أعلاه ، ثم نقيت مستعمرات منفردة بطريقة التخطيط والتخفيف في الأطباق. حضرت مزارع مائلة على وسط MSM الصلب من مستعمرات العزلة K700و K705 لتميز مستعمراتها بنمو جيد التي أطلق عليها K70AD1 و K70AD2

وحفظت في ثلاجة تحت درجة حرارة 4 م لإجراء الاختبارات اللاحقة (18). أجريت بعض الاختبارات لتحديد هوية العزلات بتحديد الصفات المورفولوجية واجريت الاختبارات الكيموحيوية في مختبرات كلية العلوم جامعة النهرين التي شملت الكاتليز والاوكسديز واليوريز وMR (أحمر المثيل) وVP (فوكس بروسكور) وإنتاج H_2S، واستعمال الكلوكوز (إنتاج الغاز- والحامض) والثايوسلفات والسترات والسكروز والمالتوز واللاكتوز، واستعمل وسط الكلوكوز في تنمية البكتريا عدا حالات اختبار المصادر الكاربوني، وأجري التشخيص وأعطيت العزلتين الرمزان K70AD1 و K70AD2. طبقا لما ورد في(19) .

عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريتات

جلبت 6 عينات من الرواسب الطينية للمياه الكبريتية أخذت من منطقة فوهة العينة وعلى بعد 2 م و5 م و10 م من سطح الرواسب أو من عمق 0.30 م في منطقة الكيلو 70 وضعت العينات في قنينة حجم 1 لتر معقمة ومظلمة إذ ملئت القناني بالرواسب بشكل تام ثم نقلت إلى المختبر تحت ظروف مسيطر عليها ، واستعمل الوسط حسب طريقة (20) إذ استعملت أنابيب اختبار Hungate(1964) في التقنيات اللاهوائية بعد تعقيمها تحت درجة 120 م° لمدة 20 دقيقة في المؤصدة، جهز الوسط بالمحاليل المطلوبة حسب (21) ثم لقح الوسط بمعدل 1غم من الرواسب الطينية بطريقة الوخز، وأضيف لجميع الأنابيب الملقحة 2% أكار وحضنت تحت درجة 35 م° لمدة أسبوعين بعد ظهور النمو في الأنابيب موجبة النمو وأجريت عملية تنقية للعزلتين K70R1 وK70R2 التي ظهر فيها كثافة نمو عالية، اذ لقحت أنابيب أخرى بطريقة الوخز ونميت لمد 14 يوماً بنفس الظروف اعلاه وحفظت العزلة K70R2 التي أخذت من عمق 30 سم للرواسب ومن منطقة تبعد2 م عن فوهة العين وحفظت في ثلاجة تحت درجة حرارة 4 م°لإجراء الاختبارات اللاحقة. أجريت الاختبارات المورفولوجية الزراعية والمجهرية والكيميوحيوية ونقلت العزلات الهوائيةK70AD1 وK70AD2 واللاهوائية K70RAD2 التي شملت مورفولوجيا المستعمرات ولونها وشكل الخلية وترتيب الخلايا وفحص الحركة وتكوين السبورات وطبيعة التغذية واستهلاك الكبريت المعدني والثايوكبريتات والرقم الهيدروجيني والحرارة والتهوية واستهلاك الكلوكوز واللاكتوز والسكريات، والسترات واللاكنينو الفورمالين والإيثانول وتحلل النشأ والجيلاتين وأنتاج غاز H_2S والأندول وفحص الكاتليز والأوكسديز واليوريز والنترات وتحديد نسبة G+C (القواعد النتروجينية الكوانين+ السايتوسين) في DNA الخلايا وجرى فحص اختزال الكبريتات والثايوكبريتات للعزلة K70R وذلك حسب الطرائق الواردة في (APHA،1988)(22) وحسب ما ذكره Sridar وRajagoal (2007).(23)

النتائج والمناقشة

بينت نتائج تحليل المياه الكبريتية التي جلبت من منطقة الكيلو 70 التي بلغ تصريفها 42 لتر ثا$^{-1}$ وقيم الرقم الهيدروجيني 7.2 والإيصالية الكهربائية بلغت 2.88 ديسيسمنز م$^{-1}$ و بلغ محتوى المياه من كتيونات Na وCa وMg وK 7.33 و 2.15 و 1.94 و 1.11 ملي مول$^{-1}$ على التتابع، في حين تباين محتوى الأيونات

HCO_3و Cl و SO_4 وNO_3 أذ بلغت 0.44 و 1.5 و 28.6 و 0.29 ملي مول$^{-1}$على التتابع. وتبين أن محتوى المياه من H_2S الذائب في المياه بلغ 19.8 ملغم لتر$^{-1}$ في حين بلغت قيم SAR 10.2 وكانت قيم BOD ضمن المستويات المقبولة وربما يعود إلى انخفاض محتواها من المادة العضوية ولتعرضها إلى التهوية عند عملية الضخ، أما معدل COD فقد وجد أنه 19.8 ملغم لتر$^{-1}$ ، كما نجد ان قيم TDS بلغت 1920 ملغم لتر$^{-1}$، وعند احتساب الملوحة الكامنة للمياه بجمع نصف تركيز الكبريتات مع تركيز الكلور حسب (24) تبين أنها بلغت 58.82 وصنفت المياه C4S2 حسب تصنيف مختبر الملوحة الأمريكي لمياه الري اعتمادا على الملوحة ونسبة امتزاز الصوديوم (12) وتعد مياه من الخطر استعمالها لأغراض الزراعة من دون معالجة (24).

تشخيص العزلات البكتيرية

تم الحصول على 4 عزلات بكتيرية هوائية عزلت من عشر عينات للمياه الكبريتية مختلفة الموقع للمياه الكبريتية في منطقة الكيلو 70 أي بنسبة عزل 40% للعينات، انتخب منهما العزلتين K70AD1 و K70AD2، كما تم الحصول على عزلتين بكتيرية لاهوائية K70R4 و K70R2 من الرواسب الطينية بنسبة عزل بلغت 20% من عينات الرواسب. انتخبت العزلة K70RAD2 لتميزها بأعلى كثافة نمو. وأظهرت نتائج الاختبارات المبينة في الجدول (1) أن العزلتين K70AD1 و K70AD2 تنتميان إلى*T. sthioparus* و *T. dovellus* المؤكسدة لمركبات الكبريت (19). تبين أن العزلة *T. thioparus* ذاتية التغذية ضوئية، أما العزلة *T. novellus* رمية التغذية تنتمي العزلة اللاهوائية K70RAD2 إلى *Desulfovibro spp* المختزلة للكبريتات وحسب ما ذكره (20).

وقد أظهرت الاختبارات أيضا أن معدل درجة الحرارة الملائم الذي اعطى أفضل كفاءة نمو للعزلات الهوائية واللاهوائية 35 م وانخفض معدل النمو مع زيادة درجات الحرارة للبكتريا الهوائية(++) في حين استمرت العزلات اللاهوائية بتحقيق معدل نمو عالٍ (+++) مع درجة حرارة 45 م^{o} واختفى النمو للعزلة الهوائية K70D2 مع درجة حرارة 60 م في حين وصلت معدلات قليلة (+) للعزلة K70D1 وحافظت العزلة K70R2 على معدل جيد (++) مع درجة الحرارة 60 م، وقد يعود ذلك إلى اختلافات محتوى العزلات G+C% الذي بلغ 59% و 52% و46% للعزلة اللاهوائية K70R2 والعزلتين الهوائية K70D1 و K70D2 على التتابع . أذ أن عملية الارتباط بين الكوانين والساستوسين تكون بثلاث أواصر هيدروجينية والارتباط بين الثايمين والأدنين بآصرتين هيدروجينية وهذا يؤكد قوة الارتباط وزيادة ارتباط الحافظة النووية بارتفاع درجة الحرارة (25).

جدول(1) الاختبارات المورفولوجية – المزرعية والمجهرية والكيموحيوية لتشخيص العزلاتالبكتيرية المؤكسدة والمختزلة لمركبات الكبريت

الاختبارات	K-70 AD1	K-70 AD2	K-70 RAD2	الاختبارات		K-70 AD1	K-70 AD2	K-70 RAD2
المستعمرات	ناعمة مستديرة	ناعمة مرتفعة	متكتلة نجمية	النمو في درجة حرارة م^0	25	++	+++	++
لون المستعمرة	تبنية مصفرة	قرنفلية وردية	داكنة مسودة		35	+++	+++	+++
شكل الخلية	عصوية قصيرة	عصوية قصيرة	منحنية عصوية		45	++	++	+++
ترتيب الخلايا	سلاسل قصيرة	منفردة	متجمعة		60	+	-	++
ملون كرام	-	-	-	الكاتليز		+	-	
تكوين السبورات	-	-	-	الاوكسديز		-	-	
الحركة	+	+	+	انتاج الاندول		-	-	
التهوية	هوائية اختيارية	هوائية اجبارية	لاهوائية اجبارية	احمر المثيل		+	+	
استهلاكS المعدني	+	-	-	فوكس بروسكور		-	-	
استهلاك Na_2SO_3	-	+	+	انتاج H_2S		+	-	+
طبيعة التغذية	رمية كيموعضوية	ذاتية ضوئية	رمية عضوية	اختزال SO_4		-	-	+
الكلوكوز	+	-	+	اختزال SO_3		+	-	+
استهلاك السترات	+	+	+	NO_3		+	-	+
تحلل النشا	+	-	+	الايثانول		+	-	+
المالتوز	+	-	-	الارجنين		-	-	
السكروز	+	-	+	اللايسين		-	-	
اللاكتوز	+	-	+	انتاج اليوريز		+	+	
اللاكتيت				البايوتين		+	+	+
البايروفيت				G+C%		52	46	59

التشخيص: للعزلات K-70AD1 و K-70AD1 و K-70RAD1 هو ***Thiobacillusthioparus*** و ***Thiobacillusnovellus***و .***Desulfovibro***spp حسب الترتيب.

المصادر

1-**Postgate** , J. R.(1984). The Sulphate-Reducing Bacteria. Cambridge University Press, New York, 2nd ed. , 208 pp.

2-**Briglia**, M. and W.Verstraete.(1995).Occurrence of sulphate Reducing Bacteria in natural and Artificial ecological miches. Universiteitgent . (Belgium).60(4b):2653 .

3-**Hedin**.R.S,R.Hammack..(2011). Microbial Sulfate Reduction for the treatment of acid mine drainage: A Laboratory study.

4-**Battersby** N.S. (1988). Sulphate-reducing bacteria, Methods on aquatic bacteriology, B. Austin, John Wiley and Sons (eds.), 269-299.

5-**Sugio**, T.; T.Hirose,; L.Z.Ye,; T.Tano. (1992). Purification and some properties of sulfite: Ferricion oxidoreductase from Thiobacillus ferrooxidans. J. Bacteriol., *174*, 4189-4192.

6-**Sugio**, T.; T.Katagiri.;K.Inagaki; T.Tano. (1989). Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur:ferric ion oxidoreductase purified from Thiobacillus ferrooxidans. Biochim. Biophys. Acta, 973, 250-256 sulphate-reducing bacteria in marine salterns, Experientia, 49, 473-481.

7-**Maree**, JP H. A . Greber and M de Beer.(2004). Treatment of acid and sulphate-rich effluents in an integrated biological / chemical process .Division of water, Environment and Forestry Technolody, CSLR, PO Box 395,Pretoria 0001, south Africa .

8-**Visscher** P.T., R.A.Prins ,H.Gemerden.(1992). Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in marine microbial mat, FEMS Microbiol. Ecol., 86, 283-294.

9-**Westrich** J.., Berner R.A., (1988). The effect of temperature on rates of sulfate reduction in marine sediments, Geomicrobiol. J.,6,99-117.

10-**Devai**,I. and R. D. Delaun.(2000). Emissions of reduced gaseous sulfur compound from west water sludge. Eviron.Eng.Sci.17(1)1-8.

11-**Ravichandra1**,Gopal Mugeraya3,A.Gangagni Rao1, M. Ramakrishna2 and Annapurna Jetty.(2007).Isolation of Thiobacillus sp from aerobic sludge of distillery and dairy effluent treatment plants and its sulfide oxidation activity at different concentrations.

12-**Madigan**, M.J.Maltinko, and J,Parker (2000). Brockbology of microorganisms. Prentice-Hall. Vpper sadolle River, NJ.498-502.

13-**Qatibi**, A.I,V.Nivere, and J.I.Garcia(1990). Desulfovibrioal Coholov or ans sp.Nov.Sulfate-redacing bacterium able to grow onglycerd, 2. And 1,3 propanediol Arch.Microbial.155:143-148.

14-**Karin** , W,and W. Wolff. and E.Bock (1983). Thiobacilli of the Corroded concrete wallsof the Humburg sewer system . Jornal of Genral microbiology. 129. 1327-1333.

15-**Kantachote** , D.and W.Innuwat(2004). Isolation of thiobacillus sp for use in treatment of rubber sheet weste water song klanokarin Jornal SCi. Technol.26(5):649-657.

16-**Jan**, M.A.V.,A.R.Lesley. W.V.Henk, and J.G.Kuenen (1997). Sulfur production by obligalely chemolitoautotrophic Thiobacillus species Applied and environmental microbiology.63(6):2300-2305.

17-**Richards** , A. (1954). Diagnosis and improvement of saline and Al kaline Soil. Agriculture Handbook. No.60. USDA, Washington.

18-**DSMZ**. (2002).List of media. Deutsche Sammlung zon Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb Germany.

19-**Kelly**, D.P. and A.P.Harrison, (1989). Genus *Thiobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 3. Staley, J.T. Williams and Wilkins, Baltimore.

20-**Baolin** S. R. G. James, A. S. Robert and M. T James.(2000). Isolation and characterization of desulfovibrio dechloracetivor SP. Non amarine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of chloro phenol . Appl Environ microbial 2000 June: 66(6):2408-2413.

21-**Doetsch** . R. N. (1981). Deter minative methohs of light microscopy. In Gerhardt P,murray R.G E costilow RN, nester EW wood ,WA, krieg NR, Phillips GB, editors Manual of methods for general bacteriology.Washing ton D.C. American society for microbiology. PP.21-33.

22-**A P H A**,(1988) Standers methods for examination of water and wastewater 20^{th} End wostigton.

23-**Rajagoal**, V. and R Sridar .(2007) . Isoltion and characterization of sulfur oxidizing bacteria . J. of culture Collections .S. 73- 77.

24- **Domen**, L.D. (1954) . Salinization of soil by salt in the irrigation water Amer . Geophys. Unin.Trans. 35:943-950 .

25-**Barton**. L. and G.D.Fauque (2009). Biochemistry,Physiology and biotechnology of sulfate-Reducing Bacteria advances in applied microbiology .58:41-48.