

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و یکم، شماره پنج، مردادماه ۹۸

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کننده ی تیوسیانات از رسوبات

دریاچه مهارلو استان فارس

فهیمة مطلبی^۱

فرشید کفیل زاده^{۲*}

f.kafilzadeh@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: تیوسیانات ترکیبی یک کربنه معدنی و عضو مهمی از خانواده سیانید می‌باشد. تیوسیاناتاز منابع طبیعی و صنعتی مشتق شده و در حجم وسیعی توسط صنایع استخراج فلزات و کک تولید می‌شود. این ترکیب سمی باعث بروز اثرات نامطلوبی در موجودات زنده می‌شود. با توجه به وجود این ترکیب سمی در دریاچه مهارلو، این پژوهش باهدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده تیوسیانات از رسوبات دریاچه مهارلو صورت گرفت.

روش بررسی: نمونه برداری از پنج ایستگاه و طی دو فصل، در تابستان ۹۴ و بهار ۹۵ انجام گردید. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده تیوسیانات در محیط M9 انجام شد. پس از شناسایی فیزیولوژی و بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌کننده تیوسیانات، از تست‌های حداقل غلظت بازدارندگی، سینتیک رشد و میزان تجزیه تیوسیانات توسط باکتری‌های مقاوم استفاده شد. در پایان، باکتری‌های مقاوم با روش PCR براساس ژن rRNA ۱۶S، شناسایی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۹ گونه باکتریایی توانایی تجزیه تیوسیانات در دریاچه مهارلو را داشتند. در این میان دو گونه باکتریایی *Bacillus sphaericus* و *Micrococcus luteus* دارای بالاترین پتانسیل در حذف و تجزیه تیوسیانات بوده و بالاترین مقاومت (۵۰ گرم در لیتر) را نسبت به سایر باکتری‌ها نشان دادند. بیش‌ترین قدرت تجزیه‌کنندگی تیوسیانات، مربوط به *B. sphaericus* (۶۶/۶۶ درصد) و *M. luteus* (۵۰ درصد) بود که به ترتیب با ارزش شباهت ۹۷ و ۹۲ درصد با سویه‌های *Planococcus citreus strain* NBRC 15849 و *Bacillus aerius strain 24K* شباهت داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که دریاچه مهارلو دارای باکتری‌های قدرت‌مند در تجزیه تیوسیانات بوده به طوری که *B. sphaericus* تا ۶۶/۶۶ درصد قادر به تجزیه این ترکیب می‌باشد. با فراهم نمودن بستر مناسب جهت رشد این باکتری‌ها می‌توان از آن‌ها جهت سمیت زدایی و حذف تیوسیانات از آب‌های آلوده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تیوسیانات، PCR، باسیلوس اسفریکوس، میکروکوکوس لوتوس، مهارلو.

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران* (مسئول مکاتبات)

Isolation and molecular identification of thiocyanate biodegradation bacteria in the sediments from Maharloo lake, Fars province

Fahimeh Motallebi¹

Farshid Kafilzadeh^{2*}

f.kafilzadeh@gmail.com

Admission Date: October 11, 2017

Date Received: August 16, 2017

Abstract

Background and Objective: Thiocyanate is an inorganic, one compound carbon and an important member of the cyanide family, which is derived from natural and industrial sources. It is largely produced by Metal and coke extraction industries. This toxic compound, causing undesirable effects in living organisms. Due to the presence of this toxic compound in the Maharloo Lake, this study was aimed to isolate and molecular identification of bacteria degrading thiocyanate from sediments of the Maharloo.

Method: Sampling was performed during summer and spring of 2015 and 2016 from 5 stations. Isolation of Thiocyanate-degrading bacteria was conducted in the M9 medium. After identifying the physiological and biochemical thiocyanate degrading bacteria, MIC test, kinetics of growth and the rate of decomposition of thiocyanate were conducted. Finally, resistant bacteria were identified by PCR-based gene 16S rRNA.

Findings: 9 species had the ability of thiocyanate degradation in Maharloo lake. *Bacillus sphaericus* and *Micrococcus luteus* showed the highest potential to remove thiocyanate and the highest resistance (50 grams per liter) than other bacteria. The Most thiocyanate biodegradation rate was related to *B. sphaericus* (66.66%) and *M. luteus* (50%) which showed 97% and 92% homology to *Planococcus citreus strain NBRC 15849* and *Bacillus aerius strain 24K* respectively.

Discussion and Conclusion: The result of this study showed that the Maharloo lake contains powerful bacteria in thiocyanate biodegradation, so that *B. sphaericus* can break up to 66.66%. By providing a framework for the growth of these bacteria, they can be used to detoxify and remove thiocyanate from contaminated water.

Keywords: thiocyanate, PCR, *Bacillus sphaericus*, *Micrococcus luteus*, Maharloo.

1- MSc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

2-Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. *(Corresponding Authors)

مقدمه

است (۵،۸). به طور کلی دو مسیر شیمی و اتوتروف تجزیه میکروبی تیوسانات توسط برخی از باکتری های هوازی شناسایی شده اند، که عبارتند از مسیر سیانات (CNO) و مسیروکرونیل سولفید (COS) (به عنوان ترکیبات حد واسطه) (۴).

تجزیه زیستی یکی از روش های ارزان و موثر در پاک سازی ترکیبات شیمیایی سمی است. این تکنیک بر پایه فعالیت گونه های خاصی از میکروارگانیسم هایی که قادرند ترکیبات شیمیایی سمی را به طور کامل یا تا قسمتی تجزیه کنند استوار است (۹). برخی از میکروارگانیسم ها می توانند تیوسانات را به عنوان منبع انرژی، کربن، نیتروژن یا گوگرد بعد از هیدرولیز آن به سولفید، آمونیاک و دی اکسید کربن مصرف کنند (۱۰، ۱۱).

اهمیت دریاچه های آب شور مانند مهارلو را می توان در سه بخش بهداشتی، اقتصادی و زیست محیطی مورد بررسی قرار داد. از آنجایی که دریاچه مهارلو یکی از منابع تأمین نمک خوراکی و صنعتی می باشد حضور آلاینده های صنعتی در آب یا رسوبات این دریاچه می تواند به عنوان تهدید جدی برای سلامتی جامعه مطرح باشد.

Mekuta و همکاران در سال ۲۰۱۴، نشان دادند تمام باکتری های جداسازی شده از فاضلاب حاوی سیانید به جنس *Bacillus* تعلق داشتند. در صورت حضور زیاد منبع آمین، باکتری ابتدا منبع آمینی را بعلاوه تجزیه آسان مصرف کرده در نتیجه مانع مصرف سیانید در محیط کشت گردید (۱۹). در سال ۲۰۱۶ باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، به عنوان باکتری تجزیه کننده سیانید و تیوسانات از جایگاه های نفتی جداسازی شد و میزان رشد و تجزیه سیانید آزاد و تیوسانات در شرایط قلیایی مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

با توجه به این که تاکنون مطالعه ای در ارتباط با تجزیه زیستی تیوسانات توسط میکروارگانیسم های موجود در این دریاچه صورت نگرفته است، هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تیوسانات از دریاچه مهارلو می باشد.

تیوسانات (SCN) ترکیبی یک کربنه معدنی سولفیدی (۱) پایدار، غیر قابل هیدرولیز و غیر فرار و مقاوم در شرایط اسیدی است (۲). این ترکیب شیمیایی خطرناک، عضو مهمی از خانواده سیانید (CN) می باشد. سیانید با اتصال محکم به سیتوکرم C اکسیداز که جزئی از سیستم انتقال الکترون است، از انتقال الکترون در زنجیره تنفسی جلوگیری می کند (۳). تیوسانات همچنین به طور ذاتی در فرایند سم زدایی زیستی سیانید تولید شده و در فاضلاب کک و معادن فلزی نیز یافت می شود (۴).

این ترکیب در فرآیندهای گوناگون صنعتی از قبیل عکاسی (ظهور عکس)، رنگ رزی، آبکاری طلا، تولید آفت کش، پلاستیک و فولاد، استخراج فلزات و کک استفاده می شود. از تیوسانات همچنین برای استریل کردن خاک و جلوگیری از فرسایش نیز استفاده می گردد. اگر چه یون تیوسانات از مولکول های پدید آورنده خود (سیانید) سمیت کمتری (۱۰-۷ برابر) دارد (۵) اما با ثبات تر بوده و سخت تر از بین می رود (۶). سیانید دارای پتانسیل واکنش آسان با گوگرد برای تولید تیوسانات می باشد؛ بنابراین هر صنعتی که در پساب خود دارای سیانید باشد می تواند منبع بالقوه آلودگی تیوسانات قلمداد شود (۵). علی رغم سمیت کم تر نسبت به سیانید آزاد، دوز کشنده آن برای انسان ۵۰-۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم در وزن بدن است و عوارض مزمن بایک دوز روزانه تقریباً ۲-۱۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دیده می شود (۱). اثرات سمی تیوسانات شامل مهار انتقالات هالید به غده تیروئید، معده، قرنیه و آبشش ها (در آبزیان) به علاوه مهارکننده آنزیم های گوناگون می باشد. تیوسانات روی سیستم عصب مرکزی انسان تأثیر می گذارد و باعث کج خلقی، حالات عصبی، توهم، روان پریشی (جنون)، هیجان های بی دلیل و زیاد (عشق و دیوانگی)، هذیان و تشنج می شود (۱، ۷).

همه روش های حذف تیوسانات از محیط شامل کلرزی، مستقیم و استفاده از هیپوکلریت، اکسیداسیون پراکسید هیدروژن، اکسیداسیون اوزون، تجزیه الکترولیتیکی و ... دارای معایبی بوده که بکار گیری آن ها را در طبیعت محدود کرده

روش بررسی

(شکل ۱). ایستگاه‌ها ترجیحاً در مناطقی که احتمال آلودگی بیش‌تر داشتند انتخاب شدند و نمونه برداری از رسوبات دریاچه در عمق ۰-۱۰ سانتی‌متر صورت گرفت. نمونه‌های مورد نظر درون ظرف‌های استریل سر بسته روی یخ قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

نمونه برداری: نمونه برداری از رسوبات دریاچه مهارلو در ۵ ایستگاه و دو فصل تابستان و بهار صورت گرفت. در هر ایستگاه از سه نقطه نمونه برداری شد. نقاط نمونه برداری شده با دستگاه جی‌پی‌اس، جهت نمونه برداری فصل بعد ثبت گردید



شکل ۱- موقعیت ایستگاه‌های نمونه برداری در دو فصل تابستان و بهار در دریاچه مهارلو به وسیله ستاره نشان داده شده است.

Figure 1. The position of sampling stations are shown in summer and spring in the Maharloo lake by the star.

غنی سازی:

کشت M9 اضافه شدند. ۵ گرم از نمونه رسوب مورد نظر به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت‌های غنی‌سازی شده استریل اضافه و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rmp گرم‌خانه گذارید. غنی‌سازی با دوبار تکرار انجام شد (۱).

جهت غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده تیوسیانات از محیط کشت پایه نمکی M9 مطابق جدول ۱ استفاده شد. محلول ۱۰ میلی مولار KSCN و گلوکوز (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) با فیلتر استریلیزه (0.2 um pore size) استریل و به محیط

جدول ۱ - مواد لازم جهت تهیه محیط M9 در یک لیتر آب دیونیزه

Table 1. Materials for preparation of M9 medium in one liter of deionised water

FeSO ₄ .7H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	KCl	NaCl	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	مواد
۰/۰۱	۰/۵	۰/۵	۰/۴۵	۳/۴	۱	مقدار (گرم)

شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده تیوسیانات: ابتدا باکتری‌ها بوسیله رنگ آمیزی گرم شناسایی مورفولوژی شدند سپس جهت شناسایی دقیق‌تر از تست‌های بیوشیمیایی شامل: هیدرولیز آمیلاز، کاتالاز، احیای نیترات، آرابینوز، تخمیر مانیتول، تخمیر گلوکز، سیترات، VP، TSI، OF، SIM استفاده شد.

جداسازی و خالص‌سازی باکتریایی: بعد یک هفته گرم‌خانه گذاری ۱۰۰ لاندا محیط کشت‌های کدر شده روی محیط‌های نوترینت آگار ریخته و به مدت ۷۲-۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه گذاشته شد. پس از چندین بار کشت مرحله‌ای، تک کلنی‌ها را روی محیط کشت اختصاصی M9 آگار (شامل تیوسیانات و گلوکوز) کشت داده شدند (۱).

نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند (۱۲، ۱۳).
سینتیک رشد باکتری‌های مقاوم: در این تست برای هر باکتری ۶ ارلن که هرکدام حاوی ترکیب ۹۰ سی‌سی محیط کشت M9 با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ گرم در لیتر پتاسیم تیوسانات تهیه و سپس با فیلتر استریلیزه (0.2 um pore size) استریل گردید یکی از ارلن‌ها شامل محیط M9، بدون پتاسیم تیوسانات بعنوان شاهد انتخاب شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون منطبق با نیم مک فارلند به ارلن‌ها اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ rpm به مدت ۱۰ روز گرم‌خانه گذاری شدند. هر روز میزان کدورت نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتر نوری (unico Tm1100) با طول موج ۶۰۰ نانومتر، در زمان مشخص خوانده شد (۹).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری: این تست برای تشخیص باکتری‌های دارای بالاترین آستانه تحمل نسبت به تیوسانات استفاده شد. در این تست، از محیطی شفاف با پایه نمکی M9 که در هر لیتر آب دیونیزه شامل: ۵ گرم NaCl، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ استفاده گردید. برای هر نمونه ده لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط M9 استریل در نظر گرفته شد. محلول پتاسیم تیوسانات با غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر تهیه گردید و پس از فیلتر کردن آن با فیلتر استریلیزه (0.2 um pore size)، مقدار ۱ میلی‌لیتر به آخرین لوله (لوله ۱۰) اضافه شد، سپس ۱ میلی‌لیتر آن از لوله ۱۰ برداشته و به لوله ۹ اضافه شد و این عمل تا لوله ۲ تکرار شد. لوله شماره ۱ به عنوان لوله شاهد (بدون تیوسانات) انتخاب گردید. سوسپانسیون باکتریایی منطبق با نیم مک فارلند به مقدار ۵۰ لاند به لوله‌ها اضافه شد.

$$100 \times \frac{\text{تیوسانات یاقی مانده (تلقیح شده)} - \text{تیوسانات یاقی مانده (تلقیح نشده)}}{\text{غلظت تیوسانات اولیه}} = \text{درصد تجزیه تیوسانات ضریب تجزیه زیستی}$$

معکوس (GGTTACCTTGTTACGACTT) استفاده شد. مواد جهت PCR در حجم ۲۵ لاند که شامل مستر ۱۲/۵، پرایمر B و A هر کدام ۰/۵، آب مقطر تزریقی ۷/۵ و DNA استخراجی ۴ لاند بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ و در زمان ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۴ به مدت ۱ دقیقه و طولی سازی در دمای ۷۲ درجه و در مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ و مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز باژل آگارز ۱٪، بوسیله دستگاه ژل داک عکس برداری شد. محصول PCR جهت توالی یابی یک طرفه به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. نمونه‌های تعیین توالی شده با کتابخانه ژنوم مرکز بین‌المللی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مقایسه و بلاست گردید. درخت تبارزایی و ارتباط ژنتیکی بین سویه‌ها بوسیله نرم افزار Mega7 (ویرایش 7.0.18) رسم شد.

تیوسانات: این آزمایش ۹۰ میلی‌لیتر M9 و پتاسیم تیوسانات، به غلظت ۱۰ گرم در لیتر تهیه گشت. ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی منطبق با نیم مک فارلند به ارلن‌ها افزوده شد. نمونه‌ی بدون تلقیح باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از یک هفته، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آن را درون لوله فالکون استریل ریخته و با دور ۶۰۰۰ و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گشت و جهت انجام آنالیز به وسیله دستگاه UV visible با طول موج ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر فرستاده شد. میزان تجزیه تیوسانات به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید (۹).

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی با استفاده از توالی یابی ژن rRNA ۱۶S انجام شد. ابتدا DNA باکتریایی به روش جوشاندن و با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاصله رویی محتوی DNA باکتری، درون میکروتیوپ استریل ریخته‌شد. میزان کمیت و کیفیت DNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. برای انجام PCR از دو پرایمر عمومی شامل پرایمر (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و پرایمر

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده تیوسیانات: در این پژوهش ۹ گونه باکتریایی تجزیه کننده تیوسیانات از رسوبات دریاچه مهارلو به وسیله رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی شدند که شامل باکتری‌های *Bacillus pasteurii*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pathothenticus*, *Bacillus azotoformans*, *Micrococcus varians*, *Bacillus circulans*, *Acinetobacter B. popilliae*, *Micrococcus luteus* و *lowffi* بودند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری: در تست حداقل غلظت بازدارندگی، باکتری *B. sphaericus* و *M. luteus* دارای بیشترین مقاومت بودند. در نتیجه باکتری‌های ذکر شده به عنوان مقاومترین گزینه‌ها جهت انجام تست سنتتیک رشد و میزان تجزیه زیستی تیوسیانات انتخاب شدند (جدول ۲). در این مرحله در فصل تابستان باکتری ^۱*B. sphaericus* و در فصل بهار ^۲*B. sphaericus* و *M. luteus* به عنوان مقاومترین باکتری‌های تجزیه کننده تیوسیانات جداسازی شدند.

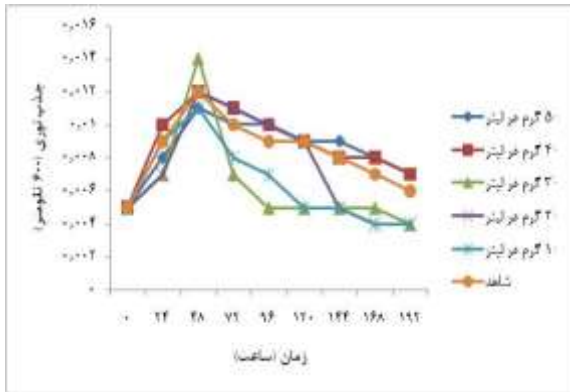
جدول ۲- تست حداقل غلظت مهارکنندگی

Table 2. Minimum inhibitory concentration test

بدون تیوسیانات	بدون باکتری	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱.۵۶≥	غلظت (گرم در لیتر)
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>B. sphaericus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>B. pasteurii</i>
+	-	-	-	-	-	+	+	<i>B. pathothenticus</i>
+	-	-	-	-	+	+	+	<i>B. azotoformans</i>
+	-	-	-	-	+	+	+	<i>B. popilliae</i>
+	-	-	-	-	-	-	+	<i>B. circulans</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>M. varians</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>M. luteus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>Acinetobacter lowffi</i>

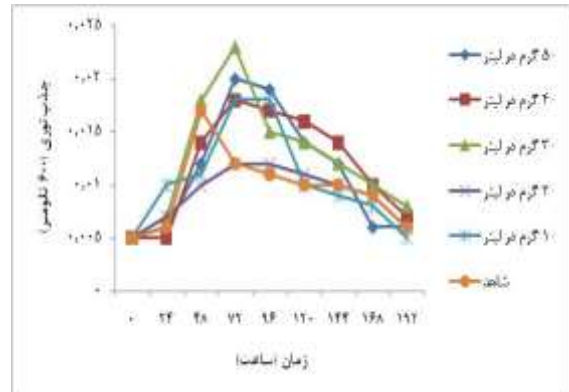
در لیتر تیوسیانات (نمودار ۳ و ۲) و باکتری *M. luteus* در دو غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر بیشترین میزان رشد را نشان دادند (نمودار ۴).

سنتتیک رشد باکتری‌های مقاوم: در این تست باکتری‌های مقاوم پس از ۲۴ ساعت وارد فاز لگاریتمی شدند و در ۷۲ ساعت به اوج رشد خود رسیدند. پس از آن روند نزولی خود را طی کردند. هر دو باکتری *B. sphaericus* ۱ و ۲ در ۳۰ گرم



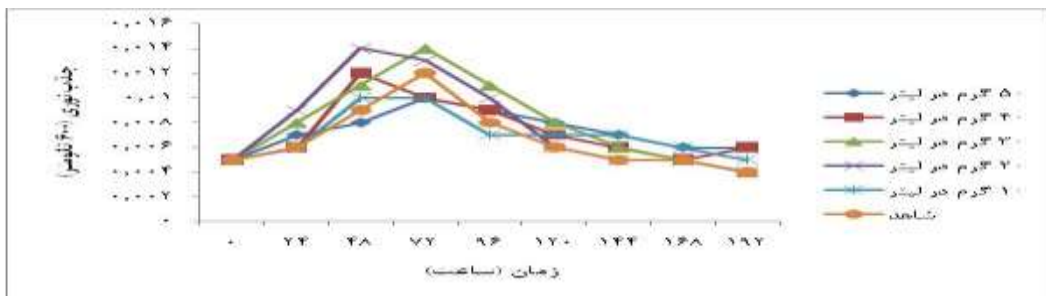
نمودار ۳- منحنی رشد باکتری *B.sphaericus* در غلظت های مختلف تیوسیانات در فصل بهار

Figure 3. Growth pattern of *B.sphaericus*2 in different concentrations of thiocyanate in spring.



نمودار ۲- منحنی رشد باکتری *B. sphaericus* در غلظت های مختلف تیوسیانات در فصل تابستان

Figure 2. Growth pattern of *B. sphaericus*1 in different concentrations of thiocyanate in summer.

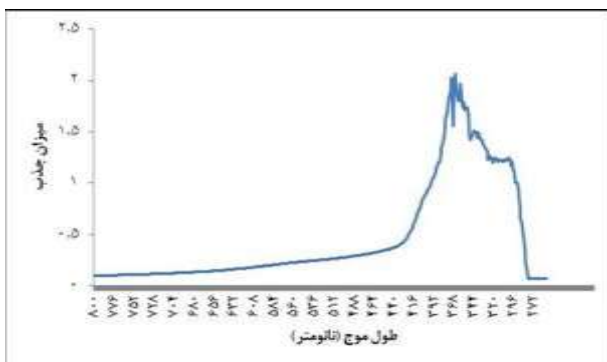


نمودار ۴- منحنی رشد باکتری *M. luteus* در غلظت های مختلف تیوسیانات در فصل بهار

Figure 4. Growth pattern of *M. luteus* in different concentrations of thiocyanate in spring.

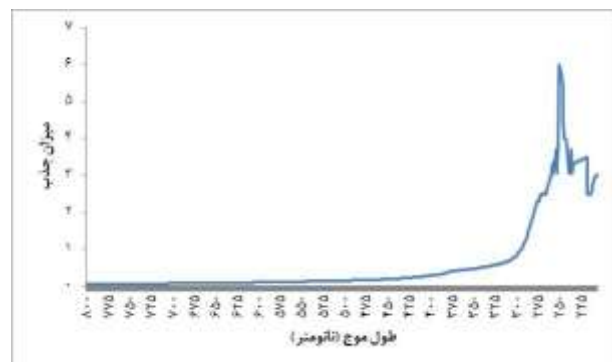
sphaericus 2 این باکتری به عنوان باکتری دارای صلاحیت انتخاب نشد و فقط *B. sphaericus 1* و *M. luteus* در مرحله بعد شناسایی مولکولی شدند.

ضریب تجزیه زیستی تیوسیانات:میزان تجزیه تیوسیانات توسط باکتری های مقاوم شامل *B. sphaericus 1* ، *B. sphaericus 2* و *M. luteus* به ترتیب برابر با ۶۶/۶۶، ۴۳/۳۳ و ۵۰ درصد بود. دلیل تجزیه زیر ۵۰ درصد *B.*



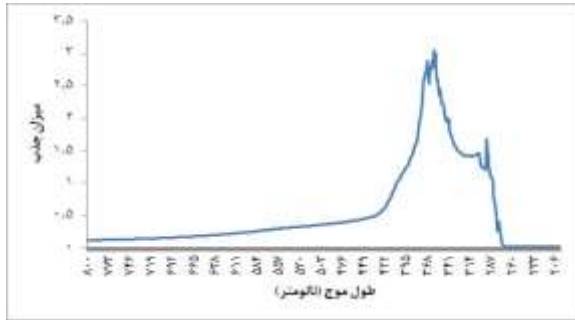
نمودار ۶- منحنی تجزیه تیوسیانات در غلظت ۱۰ گرم در لیتر *B. sphaericus*1 در

Figure 6. Thiocyanate decomposition curve at a concentration of 10 g / L in *B. sphaericus*1



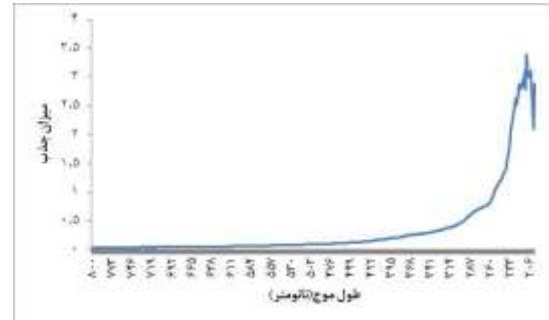
نمودار ۵- منحنی تجزیه تیوسیانات در غلظت ۱۰ گرم در لیتر در نمونه شاهد (بدون تلقیح باکتری)

Figure 5. Thiocyanate decomposition curve at a concentration of 10 g / L in a control sample (without inoculation of bacteria)



نمودار ۸- منحنی تجزیه تیوسیانات در غلظت ۱۰ گرم در لیتر در *M.luteus*

Figure 8. Thiocyanate decomposition curve at a concentration of 10 g / L in *M.luteus*



نمودار ۷- منحنی تجزیه تیوسیانات در غلظت ۱۰ گرم در لیتر در *B. sphaericus2*

Figure 7. Thiocyanate decomposition curve at a concentration of 10 g / L in *B. sphaericus2*

چاهک سه *B. sphaericus1* چاهک N کنترل منفی (بدون DNA) بود (شکل ۹).

شناسایی مولکولی: شکل ۹ ژل آگارز محصول PCR باکتری‌های مقاوم را نشان می‌دهد. چاهک M ماکر ۱۰۰ bp، چاهک یک *M. luteus*، چاهک دو *B. sphaericus2*

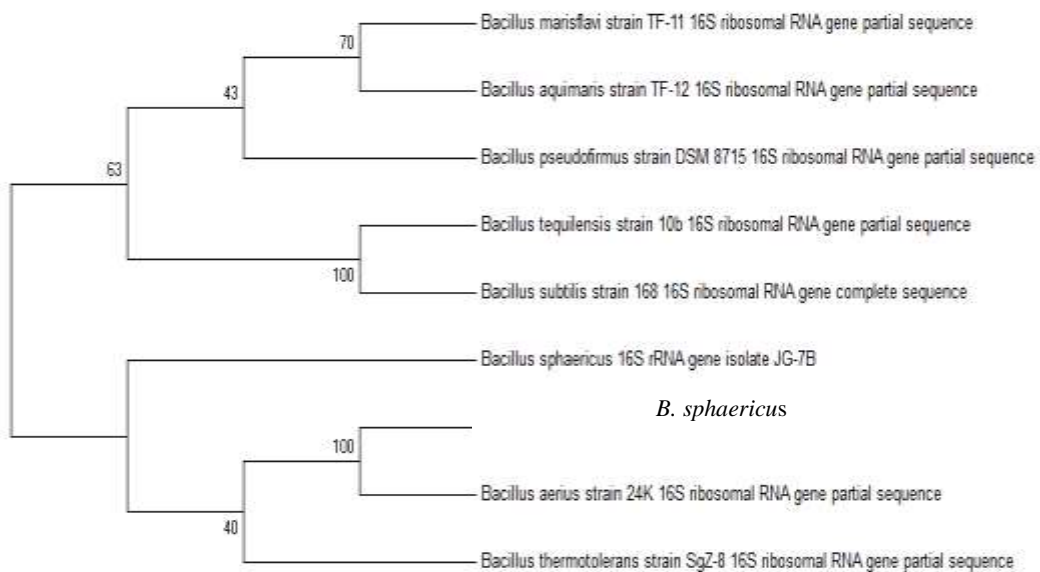


شکل ۹- ژل آگارز محصول PCR باکتری‌های مقاوم

Figure 9. Agarose gel PCR Product of Resistant bacteria

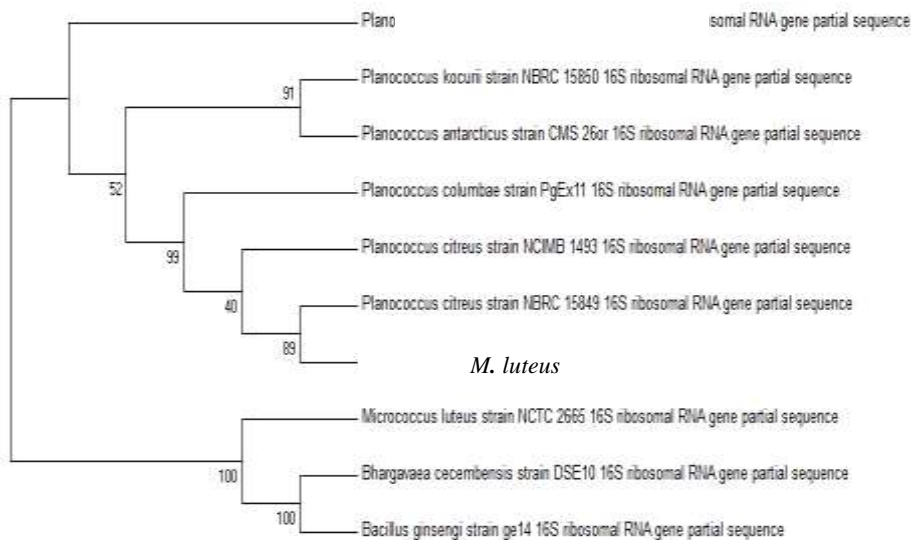
Bacillus aerius با ۹۲ درصد تشابه با *sphaericus* strain 24K همولوژی داشت (شکل ۱۰ و ۱۱).

نتایج حاصل از بلاست کردن توالی‌ها نشان داد باکتری *M.luteus* با ۹۷ درصد تشابه با *Planococcus citreus* strain NBRC 15849 و باکتری *B.*



شکل ۱۰- درخت تبارزایی باسیلوس اسفریکوس (*Bacillus sphaericus*)

Figure 10. Phylogenetic tree *Bacillus sphaericus*



شکل ۱۱- درخت تبارزایی میکروکوکوس لوتئوس (*M. luteus*)

Figure 11. Phylogenetic tree *M. luteus*

بحث و نتیجه گیری

زیست، از نظر اقتصادی نیز نسبت به دیگر روش های پاکسازی برتری دارند (۱۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد باکتری های جداسازی شده از رسوبات دریاچه مهارلو (شامل جنس های *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acintobacter*) دارای پتانسیل حذف این

روش های مختلفی برای پاکسازی آلاینده های مختلف وجود دارد که این روش ها در سه دسته کلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی دسته بندی می شود. روش های زیستی که به طور معمول شامل تبدیل آلودگی ها به مواد غیر سمی، با استفاده از فرایندهای میکروبی است (۱۴)، ضمن سازگاری با محیط

فقط در حضور تیوسیانات، بدون عوامل کمکی مانند کربن اضافی بررسی شد و به دلیل عدم وجود گلوکز به عنوان منبع کربن اضافی و آغازگر واکنش، میزان سنتیک رشد باکتری‌ها پایین بود (حداکثر در جذب نور OD_{600nm} ۰/۰۲۳). محسنی و همکاران گزارش کردند جدایه باسیلوس MF3 (۹۹ درصد همولوژی با باکتری *Bacillus safensis*) بدون نیاز منبع کربن و نیتروژن اضافی، توانایی حذف سیانید در شرایط قلیایی از خاک‌های آلوده را داشتند که برتری این باکتری نسبت به دیگر باکتری‌ها عنوان کردند جدایه MF3 قادر به جذب نور OD_{600nm} ۰/۰۶۳ در حضور تیوسیانات و ۰/۰۷۱ در برابر سیانید بود (۳). Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ علت رشد بسیار کم باکتری‌ها را سرعت پایین تجزیه تیوسیانات و فاز تاخیری رشد باکتری عنوان کردند (۷). نتایج حاصل از تست سینتیک رشد نشان دهنده وجود بیش‌ترین رشد باکتری *B. sphaericus* در غلظت ۳۰ گرم در لیتر و *M. luteus* ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر تیوسیانات بود. سینتیک رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در غلظت‌های مختلف سیانید نشان داد بالاترین رشد باکتری در غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سیانید بوده است (۱۸).

در مطالعه حاضر میزان تجزیه زیستی تیوسیانات توسط باکتری *B. sphaericus 1B. sphaericus 2* و *M. luteus* به ترتیب ۶۶/۶۶، ۴۳/۳۳ و ۵۰ درصد بود. در مطالعه دیگری باکتری سودوموناس قادر به تجزیه زیستی ۷۷ درصد تیوسیانات بود (۱۶). همچنین باکتری سرایشیا ناماتودیفیلا قادر به تجزیه ۲ میلی مولار سیانید در مدت ۴۰ ساعت بود (۲۱). باکتری باسیلوس MF3 توانست در مدت ۳۶ ساعت ۴،۳ میلی-مولار سیانید را کاملاً تجزیه کند (۳). کنسرسیوم گونه‌های باسیلوس شامل *Bacillus Safensis* ، *Bacillus Tequilensis* Lichenformis قادر به تحمل و تجزیه سیانید آزاد در بالاترین غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و به میزان ۶۰ درصد در حضور منبع کربن بودند (۱۹). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۵ توسط Khamar و همکاراندر حوضچه‌های باطله طلا در خراسان رضوی صورت گرفت

ترکیب سمی می‌باشند. در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است که جنس‌های متنوعی از باکتری‌ها شامل *Bacillus Brevibacterium Corynebacterium, Arthrobacter, Escherichia, Methylobacterium Pseudomonas, Paracoccus thiocyanatus, thioalkalivibrio thiocyanoxidans, halomonas sp, Thiobacillus thioparus* قادر به تجزیه تیوسیانات به‌عنوان منبع نیتروژن و انرژی بوده اند (۲۳، ۷، ۴، ۵، ۱، ۱۱).

نتایج تست حداقل غلظت بازدارندگی نشان داد که باکتری-های *B. sphaericus* و *M. luteus* دارای بالاترین آستانه تحمل نسبت به تیوسیانات (۵۰ گرم در لیتر) می‌باشند. در مطالعات مشابه، حداقل غلظت بازدارندگی سیانید برای دو باکتری *Halomonas daqingensis DQD2-30* و *Streptococcus lactarius* ۳۵۰ میلی گرم در لیتر گزارش شد (۹). همچنین، حداقل غلظت بازدارندگی برای ترکیبات سیانیدی شامل $K_4Fe(CN)_6$ و $Na_4Fe(CN)_6$ توسط باکتری *Pseudomonas Fluorescens* به ترتیب ۲۱/۱ گرم در لیتر (۵۰ میلی مولار) و ۳۶/۳ گرم در لیتر (۷۵ میلی مولار) اعلام شد (۱۳). در مطالعه دیگری باکتری سودوموناس قادر به تحمل ۴۵ میلی مولار NaSCN و محیط کشت‌های حاوی میکس قادر به تحمل ۶۰ میلی مولار از این ترکیب بودند که نشان داد آستانه تحمل کشت باکتری‌های ترکیبی (کنسرسیوم) بالاتر از کشت‌های خالص است (۱۶). به نظر می‌رسد این میزان اختلاف بین سیانید و ترکیبات سیانیدی در مطالعات اشاره شده، در تست حداقل غلظت بازدارندگی، بیان‌گر سمیت بسیار بالای سیانید آزاد در مقایسه با کمپلکس‌های فلزی سیانید و سایر مشتقات آن مانند تیوسیانات است که در غلظت‌های پایین‌تر اثر مهاری بر روی زنجیره انتقال الکترون باکتری‌ها داشته درحالی‌که تیوسیانات در مقایسه با سیانید باثبات تر بوده و سخت‌تر از بین می‌رود (۶).

باکتری‌ها تجزیه کننده تیوسیانات علاوه بر رشد روی تیوسیانات به‌عنوان منبع نیتروژن، نیازمند به منبع کربن اضافی (گلوکز) بوده در غیراین‌صورت میزان رشد آن‌ها کم می‌باشد (۱۷). در مطالعه حاضر، میزان سینتیک رشد باکتری‌های جداسازی شده

Reference

- Muthukumaran, V., 2011. Isolation and characterisation of Thiocyanate degrading bacteria from sago effluent contaminated site. Thesis submitted to Bharathidasan University for the award of Doctor of Philosophy.
 - Kavitha, G., King, P., Sheshamma, G., Kalpana, P., Naidu, DA., 2013. Acute toxicity of thiocyanate using *Danio rerio* and microbial degradation of thiocyanate. International journal of enjineering research and science and technology. Vol. 2, pp.47-61.
 - Mohseni, M., Firuzyar, S., Nazari, O.L., 2014. Isolation and characterization of cyanide degrading *Bacillus* sp.MF3 under alkaline condition. Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian journal of biology), Vol. 28, pp.384-394. (In Persian)
 - Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Kuenen J. G., 2001. Microbialthiocyanate utilization under highly alkaline conditions. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 2, pp. 528-538.
 - Patil, Y, B., 2013. Development of a bioremediation technology for the removal of thiocyanate from aqueous industrial wastes using metabolically active microorganisms. In: Applied Bioremediation-Active and Passive Approaches (Editors Yogesh B Patil and Prakash Rao), Intech Open Science Publisher.
 - Gould, W, D., King, M., Mohapatra, B, R., Cameron, R, A., Kapoor, A., Koren, D, W., 2012. A critical reviewon destruction of thiocyanate in mining effluents. Minerals Engineering, vol. 34, pp. 38-47.
- دوسوپهجداسازی شده قادر به تجزیه سیانید به میزان ۶۶ و ۵۰ درصد بودند؛ اما کشت ترکیبی این دو سویه میزان تجزیه را در مدت ۹۶ ساعت به ۷۶ درصد ارتقا داد (۱۲).
- در پژوهش دیگری سه گونه باکتریایی سودوموناس از خاک باغچه با درصد تجزیه ۷۸/۲۴، ۷۵/۹۱، ۸۲/۴۷ و سه گونه باکتریایی دیگر از لجن فعال هر کدوم با درصد تجزیه ۹۲/۰۷، ۸۷/۶۵، ۸۹/۴۱ جداسازی شدند و کنسرسیون باکتریایی جدا شده هر کدام به طور جداگانه (خاک باغچه و لجن فعال) قادر به تجزیه تیوسیانات با بازده بالای ۹۹/۹ درصد بودند. مدت زمان تجزیه تیوسیانات در کنسرسیون های جدا شده از لجن فعال نسبت به کنسرسیون های جدا شده از خاک باغچه کم تر بود (۲۰).
- عملکرد و استفاده از میکروارگانیسم های بومی برای تصفیه زیستی مناطق آلوده نسبت به میکروارگانیسم های غیر بومی (به علت مناسب نبودن شرایط محیطی برای میکروارگانیسم های غیربومی) نتایج بهتری به همراه دارد (۲۲). نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان داد که تعدادی از باکتری های موجود در رسوبات دریاچه مهارلو دارای توانایی تجزیه زیستی تیوسیانات، جیوه، آرسنیک و ... می باشند. با توجه به حجم ورود آلاینده ها به این دریاچه، احتمال این که میزان آلاینده ها به حد خارج از توان خودپالایی دریاچه رسیده و سلامت عمومی را تهدید کند زیاد می باشد، لذا پیشنهاد می گردد صنایع آلاینده با بهره گیری از توان تجزیه زیستی باکتری های موجود در رسوبات مهارلو، سیستم های تصفیه را در بدو خروج پساب از کارخانجات خود ایجاد نمایند تا حجم ورود آلاینده ها به دریاچه کاهش یابد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و همچنین از جناب آقای دکتر حمیدرضا احمدنایب مطلق که در انجام این پژوهش همکاری نمودند تشکر به عمل می آید.

- Journal of Engineering Research and Technology. ESRSA Publications. Vol. 2, pp. 1485-1493.
14. Kafilzadeh, F., Aram, M., Sharifi, A., Naghmachi, M., 2012. Isolation and survey growth kinetics of mercury resistant bacteria in Lake Maharloo. Iran J Med Microbiol. Vol. 6, pp. 28-38. (In Persian)
 15. El-Sheekh, M, M., Hamouda, R, A., Nizam A, A., 2013. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. International Biodeterioration & Biodegradation , Vol. 82, pp. 67-72.
 16. SouzaFagundes, EM., Rosa, L, H., Gomes, N., Santos, M, H., Pimentel, P,F., 2004. Thiocyanate degradation by pure and mixed cultures of microorganisms, Brazilian Journal of Microbiology; Vol. 35, No. 4, pp. 333-336.
 17. Patil, Y. B., 2006. Isolation of thiocyanate degrading chemoheterotrophic bacterial consortium, Nature Environment and Pollution Technology, Vol.5, pp. 135-138.
 18. Mekuto, L., Ntwampe, S, K, O., Kena, M., Golela, M, T., Amodu, O, S., 2016. Free cyanide and thiocyanate biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* STK 03 capable of heterotrophic nitrification under alkaline conditions, 3 Biotech, vol. 6, pp. 1-7.
 19. Mekuto, L., Jackson, V, A., Ntwampe, S, K, O., 2014. Biodegradation of free cyanide using *Bacillus* sp. consortium dominated by *Bacillus safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* strains:
 7. Lee, C., Kim, J., Chang, J., Hwang, S., 2003. Isolation and identification of thiocyanate utilizing *chemolithotrophs* from gold mine soils. Biodegradation, Vol. 14, pp. 183-188.
 8. Patil, Y. B., 2011. Utilization of thiocyanate (SCN) by a metabolically active bacterial consortium as the sole source of nitrogen. International Journal of Chemical, Environmental & Pharmaceutical Research, Vol. 2, No.1, pp. 44-48.
 9. Kafilzadeh, F., Khosrobak, A., Jamali, H., 2015. Degrading Bacteria from the Soil around Oil Company of Andimeshk and Investigation of Their Growth Kinetics. Polycyclic Aromatic Compounds, Vol. 36, pp.58-71.
 10. Sorokin, D, Y., Kuenen, J, G., Muyzer, G., 2011. The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. Frontiers in microbiology, Vol. 2, pp. 1-16.
 11. Combarros, R, G., Collado, S., Laca, A., Díaz, M., 2016. Understanding the simultaneous biodegradation of thiocyanate and salicylic acid by *Paracoccus thiocyanatus* and *Pseudomonas putida*. International Journal of Environmental Science and Technology, Vol. 13, pp. 649-662.
 12. Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., Gharaie, M, M., 2015. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture, International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 99, pp. 123-128.
 13. Bouari, A,-R., Begum, S, A., Egiebor, N, O., 2013. Bioremediation of Complex Cyanide Contaminated Wastewater using *Pseudomonas Fluorescens* Pf-5. In International

22. Akhavan S. A., Ebrahimi, A.F., Minaei, T.D., 2009. Investigation of Toluene Biodegradation by Bacillus Consortium in Toluene Contaminated Soils. Journal of Microbiology, Vol. 1, No. 4, pp. 7-19. (In Persian)
23. Igeno, M, I., Orovengua, E., Guijo, M, I., Merchán, F., Quesada, A., Blasco, R., 2007. Biodegradation of cyanide-containing wastes by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Vol. 1, pp. 100-107.
- A bioprocess supported solely with whey. Journal of Bioremediation & Biodegradation, <http://hdl.handle.net/11189/2038>
20. Patil, Y. B., 2008b. Thiocyanate degradation by pure and mixed bacterial cultures, Bioinfolet, Vol. 5, No. 3, pp. 308-309.
21. Mohseni, M., Firuzyar, S., 2014. Biodegradation of cyanide using *Serratia* sp. isolated from contaminated soil of gold mine in Takab. Biological Journal of Microorganism, Vol. 3, No.10, pp.75-86.(In Persian)