

تجزیه زیستی سیانید توسط باکتری *سراشیا* جدا شده از خاک آلوده معدن طلا در تکاب

مجتبی محسنی*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، m.mohseni@umz.ac.ir
سجاد فیروزیار: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، f.firuziyar@stu.umz.ac.ir

چکیده

مقدمه: سیانید ترکیبی سمی و بسیار خطرناک برای موجودات زنده است که به طور گسترده توسط بشر تولید شده و موجب آلودگی محیط زیست می‌شود. بهترین روش برای تجزیه سیانید موجود در پساب صنایع، تجزیه زیستی است. جداسازی باکتری‌های بومی تجزیه کننده سیانید از خاک آلوده و مطالعه توانایی آن‌ها در تجزیه سیانید، از اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌های خاک، غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده سیانید در محیط کشت پایه حاوی نیم میلی مولار پتاسیم سیانید انجام شد. توانایی باکتری جدا شده در استفاده از سیانید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن بررسی شد. تجزیه سیانید و تولید آمونیاک در محیط کشت توسط روش پیکریک اسید ونسلر، سنجیده شد. برای بررسی سمیت ترکیبات مختلف سیانیدی بر رشد باکتری، از روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد استفاده شد. همچنین، توانایی باکتری جدا شده در استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی، بررسی شد. شناسایی باکتری جدا شده به کمک بررسی مشخصات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و نیز تحلیل مولکولی، انجام شد.

نتایج: از خاک آلوده معدن طلا، باکتری با توانایی تجزیه سیانید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، جداسازی شد. این باکتری با عنوان جدایه MF1 نام‌گذاری شد. جدایه MF1 سیانید محیط رشد را در شرایط قلیایی، پس از ۴۰ ساعت تجزیه کرد. همچنین، این جدایه توانایی تحمل بیش از هفت میلی مولار سیانید پتاسیم را داشت. نتایج نشان داد که کاهش غلظت سیانید با افزایش غلظت آمونیاک در محیط رشد و نیز رشد جدایه MF1، ارتباط مستقیم دارد. همچنین، باکتری جدا شده، توانایی استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن را نشان داد. نتایج بررسی مشخصات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی جدایه MF1، نشان داد این باکتری به جنس *سراشیا* متعلق بود. بررسی توالی ژن *16S rDNA* و رسم درخت فیلوژنی نیز نشان داد که جدایه MF1 دارای ۹۹ درصد همولوژی با *سراشیا نماتودیفیلا* بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد باکتری جدا شده، گزینه مناسبی برای تجزیه زیستی سیانید در شرایط قلیایی است. این باکتری می‌تواند برای تجزیه سیانید از پساب صنایع و مکان‌های آلوده، معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، سیانید، باکتری *سراشیا*، پساب

مقدمه

سیانید یک ترکیب نیتروژن‌دار است که برای بیشتر موجودات به شدت سمی است (۱). در طبیعت بسیاری از قارچ‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان قادر به تولید ترکیبات سیانید هستند ولی بیش‌ترین تولیدکننده این آلاینده در طبیعت، فعالیت انسان است (۲). ترکیبات سیانید به طور گسترده در صنایع شیمیایی مختلف از جمله استخراج فلزات، آب‌کاری، تبخیر زغال سنگ و تولید الیاف مصنوعی استفاده می‌شود (۳). سالانه بیش از ۸۳۴ هزار تن سیانید به وسیله صنایع مختلف در کشور آمریکا مصرف می‌شود (۴). همچنین، سیانید به شکل گسترده در صنایع استحصال فلزات گران‌بها نظیر طلا و نقره استفاده می‌شود (۵). به این ترتیب حجم در خور توجهی از پساب حاوی سیانید صنایع مختلف وارد طبیعت شده و با آلوده کردن خاک و آب‌های زیرزمینی موجب صدمات جبران‌ناپذیری به محیط زیست می‌شود. برای مثال شکست سد باطله در معدن بایا در کشور رومانی، باعث ورود یک‌صد هزار متر مکعب سیانید به رودخانه تیزسا شد که باعث مرگ موجودات آب‌زی و حیوانات اطراف رودخانه شد (۶). در بدن انسان و سایر موجودات زنده، سیانید به شکل برگشت‌ناپذیر به پروتئین‌های دارای آهن مانند سیتوکروم‌های زنجیره تنفسی متصل شده و می‌تواند موجب مسمومیت و حتی مرگ شود (۷). روش‌های مختلفی برای حذف سیانید از پساب آلوده استفاده می‌شود. از جمله می‌توان به حذف شیمیایی با استفاده از هیدروژن پراکسید (۸) و (۹)، سولفوردی‌اکسید (۱۰) و کلریزاسیون قلیایی (۸) اشاره کرد. این روش‌ها دارای معایبی از جمله تولید محصولات جانبی نامطلوب و هزینه زیاد است. امروزه

استفاده از روش‌های زیستی برای تجزیه آلاینده‌های سیانیدی مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های زیستی بسیار کارا، مناسب و کم‌هزینه‌اند (۴). سیانید در شرایط خنثی و اسیدی تبدیل به گاز هیدروژن سیانید می‌شود ولی در شرایط قلیایی پایدار است (۱۱). اگر چه میکروارگانیسم‌هایی که توانایی سم‌زدایی و تجزیه سیانید آزاد و یا کمپلکس‌های سیانید-فلز را در شرایط خنثی یا اسیدی داشتند، تاکنون شناسایی شدند (۱۲)، اما تحقیقات اندکی برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید در شرایط قلیایی انجام شده است. در این تحقیق، جدایه باکتریایی با توانایی مصرف سیانید، از خاک آلوده معدن طلا جداسازی شد. به منظور معرفی این باکتری برای استفاده در تجزیه سیانید در پساب آلوده، توانایی این جدایه در تجزیه سیانید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن (در شرایط قلیایی) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید

پس از جمع‌آوری خاک آلوده به سیانید معدن طلای پویا زرکان واقع در آذربایجان غربی و انتقال آن به آزمایشگاه، مقدار پنج گرم خاک در ۴۵ میلی‌لیتر محلول نرمال سالیین حل شد. برای غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید، حجم یک میلی‌لیتر نمونه خاک حل شده به محیط کشت حداقل (حاوی ۶ گرم Na_2PO_4 ، ۳ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم NaCl ، ۰/۰۱ گرم CaCl_2 ، ۰/۵ گرم MgSO_4 ، ۰/۰۴ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۰/۰۱۵ گرم MnSO_4 در یک لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌مولار پتاسیم سیانید) افزوده شد (۱۳). اسیدیته محیط کشت به وسیله محلول آمونیوم کلراید ۳ مولار، در ۹ تنظیم شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰

بررسی اثر سمیت ترکیبات مختلف سیانیدی

برای بررسی سمیت ترکیبات مختلف سیانیدی از آزمون سنجش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری^۳ (MIC) استفاده شد. در این روش به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB (حاوی ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم سدیم کلراید و ۱ گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر)، غلظت‌های مختلف ترکیبات سیانیدی شامل KCN، NaCN، KSCN و $K_4Fe(CN)_6$ (۱۶). پس از تلقیح باکتری، لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

توانایی تجزیه ترکیبات مختلف سیانیدی

توانایی جدایه باکتریایی در استفاده از ترکیبات سیانیددار آلی و غیرآلی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، بررسی شد. پس از شستشو جدایه با بافر فسفات استریل، حجم ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی (10^8) باکتری در میلی لیتر) به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حداقل حاوی دو درصد (w/v) ترکیبات مختلف سیانیدی شامل استونیتریل، NaCN، KSCN و $K_4Fe(CN)_6$ تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. توانایی استفاده جدایه باکتریایی از ترکیبات مختلف به وسیله سنجش رشد توسط اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

شناسایی باکتری تجزیه‌کننده سیانید

شناسایی باکتری جداشده، بر اساس صفات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه تجزیه‌کننده سیانید روی محیط کشت نوترین آگار (مرک ۴، آلمان) بررسی شد. پس از رنگ آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آن‌ها

درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از سه کشت متوالی در محیط کشت حداقل، غنی‌سازی میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده سیانید انجام شد. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید، کشت غنی‌شده به محیط کشت سفت حداقل حاوی ۱/۵ درصد آگار و ۰/۵ میلی مولار پتاسیم سیانید، تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (۱۳).

سنجش تجزیه زیستی سیانید و رشد باکتری

برای بررسی تجزیه سیانید موجود در محیط کشت حداقل (حاوی دو میلی مولار سیانید) در شرایط قلیایی (اسیدیته=۹)، از روش رنگ سنجی پیکریک‌اسید استفاده شد (۱۴). در حضور سیانید آزاد، پیکریک‌اسید به رنگ‌های ایزوپروپیک اسید تبدیل می‌شود و شدت رنگ رابطه مستقیم با غلظت سیانید آزاد دارد. حجم ۰/۱ میلی لیتر محیط کشت به محلول ۰/۵ درصد (w/v) پیکریک‌اسید و ۰/۲۵ مولار سدیم کربنات اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم ۹۹ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس، با افزودن آب دیونیزه به حجم یک میلی لیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، خنک شد. جذب نوری محلول در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر، خوانده شد. همچنین، برای اندازه‌گیری مقدار آمونیاک آزاد شده در محیط رشد از روش نسلر^۲ (کیت سنجش آمونیاک، شرکت کاریزآب) استفاده شد و پس از انجام مراحل طبق دستورالعمل کیت جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد به وسیله آمونیوم کلراید رسم شد (۱۵).

۵ دقیقه بود. سپس، ۳۵ چرخه شامل: یک دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و یک و نیم دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت برای تکمیل واکنش ساخت DNA، دما به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *16S rDNA* با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بر مایند، تأیید شد.

تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک کیت تخلیص^۱ GeneJet انجام شد. سپس توالی ژن *16S rDNA* توسط شرکت GATC آلمان تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها به کمک نرم افزار Chromas Lite (نسخه ۲/۰۱) دوباره بررسی شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن *16S rDNA* جدایه تجزیه کننده سیانید به کمک نرم افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank و EzTaxon-e مقایسه شد (۲۲). به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف *16S rDNA* جدایه MF1، تعیین شد. همچنین، توالی به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره دستیابی ژنی^۹ مربوطه دریافت شد.

تحلیل فیلوژنی باکتری تجزیه کننده سیانید با باکتری‌های نزدیک به آن با نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲) انجام شد. درخت فیلوژنی توالی جدایه MF1 با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی Genbank و EzTaxon-e، به کمک نرم‌افزار MEGA5 و با الگوریتم Maximum likelihood و joining Neighbour نیز رسم شد. بررسی اعتبار شاخه با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد.

مطالعه شد. همچنین، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت کاتالازی، اکسیدازی و دکربوکسیلازی، تولید اندول، مصرف گلوکز از مسیر تخمیر اسیدهای مخلوط (متیل رد^۵) یا مسیر تخمیر بوتاندیول (وژز-پروسکوئر^۶)، تولید پیگمان، تولید اسید از قندهای مختلف، تولید سولفید هیدروژن، مصرف سیترات، هیدرولیز اوره و ژلاتین، احیای نیترات انجام و حرکت باکتری مطابق جداول شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگگی^۷، بررسی شد (۱۸). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

استخراج نوکلئیک اسید

برای بررسی مولکولی باکتری جدا شده، DNA ژنومی به کمک روش استاندارد، استخراج شد (۱۹). ابتدا دیواره سلولی باکتری‌ها با دترجنت هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) (مرک، آلمان) متلاشی شد. سپس، از محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. برای رسوب نوکلئیک اسید از محلول نمکی پلی اتیلن گلیکول و نیز برای شستشو و حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص استفاده شد. درستی استخراج نوکلئیک اسید، با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بر مایند، بررسی شد (۲۰).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *16S rDNA*

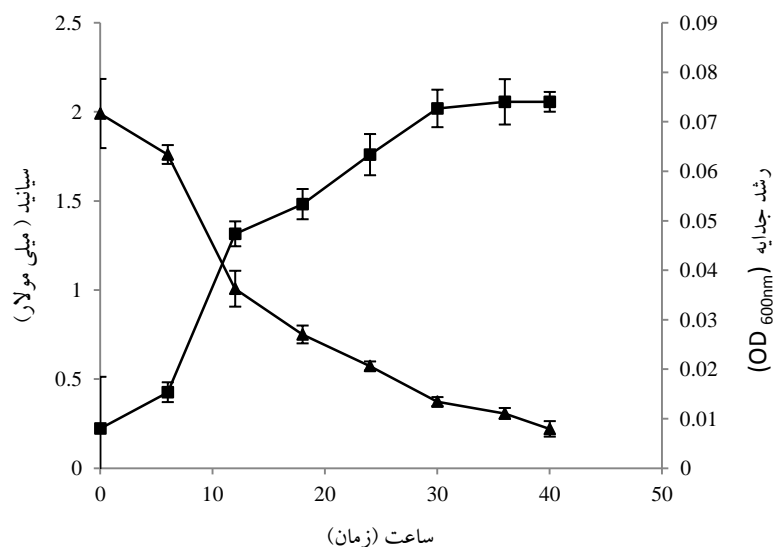
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *16S rDNA* باکتری تجزیه کننده سیانید، مطابق برنامه زیر انجام شد (۲۱). همچنین، الیگونوکلئوتید پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن *16S rDNA* شامل پرایمرهای عمومی و PA-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و PH-R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') بود. دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت

نتایج

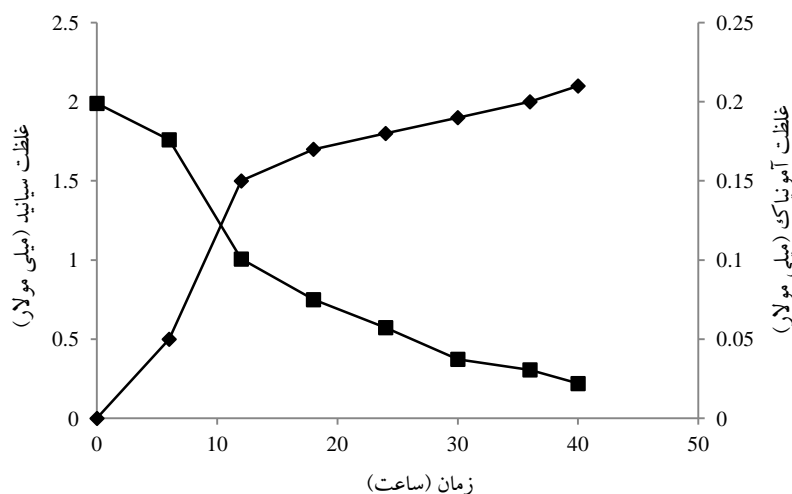
برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سیانید در شرایط قلیایی، غنی سازی خاک آلوده معدن طلا در محیط کشت حداقل و حاوی سیانید (اسیدیته = ۹) انجام شد. برای افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده سیانید، غنی سازی محیط رشد با انتقال به محیط کشت تازه استریل انجام شد. پس از سه بار غنی سازی، تعداد سه جدایه با توانایی استفاده از سیانید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن توسط محیط کشت آگاردار حداقل و حاوی سیانید، جداسازی و خالص سازی شد. پس از بررسی اولیه توانایی جدایه‌ها در تجزیه سیانید، جدایه به نام MF1 برای ادامه مطالعه انتخاب شد. تجزیه سیانید با روش اندازه گیری پیکریک اسید بررسی و غلظت سیانید باقیمانده در محیط کشت، سنجش شد. نتایج سنجش تجزیه سیانید نشان داد که

جدایه MF1 توانست سیانید موجود در محیط کشت (۲ میلی مولار سیانید) را پس از ۴۰ ساعت، کاملاً تجزیه کند. بیشترین تجزیه در ۱۲ ساعت ابتدای رشد باکتری انجام شد (شکل ۱). همچنین، نتایج نشان داد که جدایه MF1 بدون نیاز به منبع کربن و نیتروژن اضافی، توانایی تجزیه سیانید در شرایط قلیایی را داراست.

آمونیاک محصول اصلی تجزیه سیانید است. برای سنجش آمونیاک موجود در محیط کشت، از روش نسلر استفاده شد. نتایج شکل ۲ نشان داد که در طی رشد باکتری MF1، آمونیاک تولید و بیشترین تولید آمونیاک در ۱۲ ساعت ابتدای رشد باکتری، ایجاد شد. این نتیجه با نتایج حاصل از تجزیه سیانید در ساعات اولیه رشد باکتری، مطابقت دارد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- رشد جدایه MF1 (■) و تجزیه سیانید (میلی مولار) (▲) در محیط کشت حداقل حاوی سیانید (دو میلی مولار) در گرمخانه شیکردار ۳۰ درجه سانتی گراد. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج سه بار تکرار \pm انحراف معیار اند (n=۳).



شکل ۲- ارتباط تولید آمونیاک (◆) و تجزیه سیانید (■) توسط جدایه MF1 در محیط کشت حداقل و حاوی دو میلی‌مولار سیانید در گرمخانه شیکردار ۳۰ درجه سانتی‌گراد

نیتروزن، را نشان داد. از میان ترکیبات مختلف سیانیدی، بیشترین رشد جدایه MF1 در حضور $K_4[Fe(CN)_6]$ مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲- توانایی جدایه MF1 در استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی (پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری).

ترکیبات سیانیدی	رشد جدایه ($OD_{600\text{nm}}$)
Acetonitrile	۰/۰۲۷
KSCN	۰/۰۲۳
NaCN	۰/۰۲۳
$K_3[Fe(CN)_6]$	۰/۰۳۵

برای شناسایی باکتری تجزیه‌کننده سیانید MF1، رنگ آمیزی گرم انجام شد و ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلونی جدایه، بررسی شد. ریخت‌شناسی کلونی به رنگ کرم، شفاف، براق و نرم بود. نتایج حاصل از رنگ آمیزی گرم نشان داد که جدایه به شکل سلول‌های میله‌ای کوتاه و گرم منفی است. همچنین، نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی (جدول ۳) بر اساس جداول شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی (۱۸)، نشان داد که جدایه MF1 به جنس *Serratia* متعلق است.

برای بررسی سمیت ترکیبات مختلف سیانیدی بر باکتری تجزیه‌کننده MF1، از آزمون سنجش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) استفاده شد. نتایج جدول ۱ نشان داد این جدایه توانایی خوبی در تحمل غلظت‌های بالای ترکیبات سیانیدی را دارد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ترکیبات سیانیدی $K_3[Fe(CN)_6]$ و $KSCN$ به ترتیب ۱۷۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار برای جدایه MF1 بود (جدول ۱).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ترکیبات مختلف سیانیدی بر جدایه MF1.

ترکیبات مختلف سیانیدی	حداقل غلظت (میلی‌مولار)
$K_4[Fe(CN)_6]$	۱۷۰
KSCN	۱۲۰
KCN	۷/۵
NaCN	۷

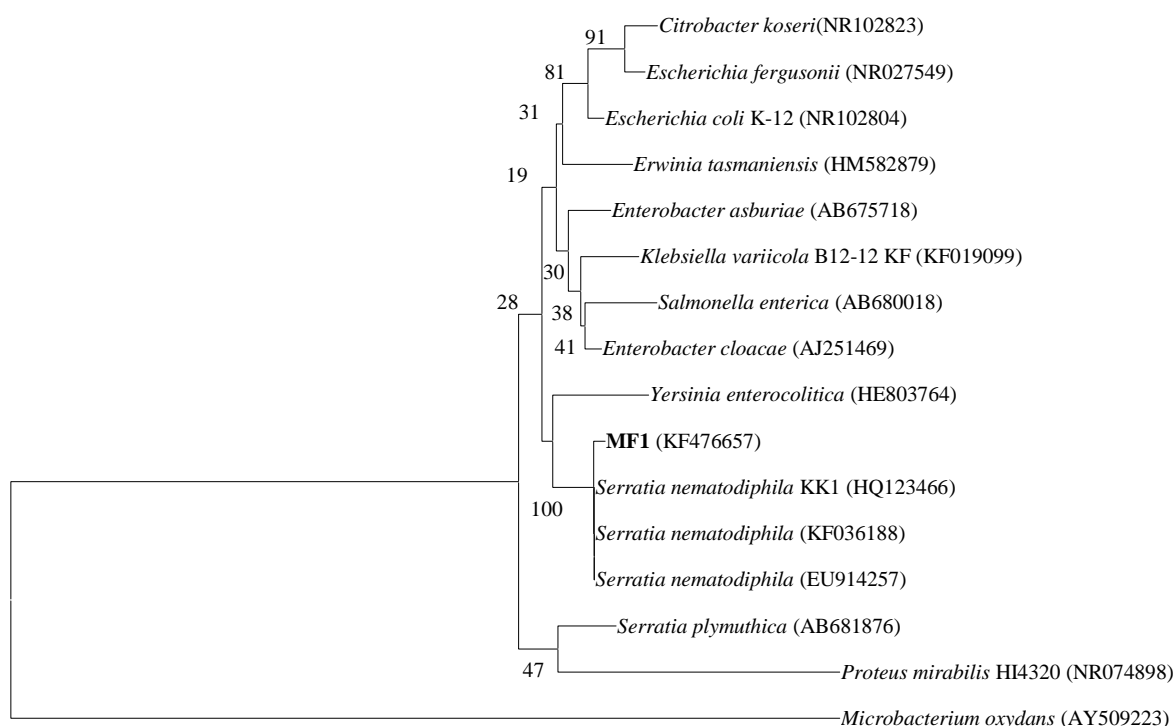
همچنین، توانایی باکتری جدا شده در استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروزن، بررسی شد. نتایج در جدول ۲ خلاصه شده است. جدایه MF1 توانایی رشد روی تمام ترکیبات سیانیدی آزمایش شده به عنوان تنها منبع کربن و

جدول ۳- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری تجزیه کننده سیانید MF1.

نتیجه	آزمون	نتیجه	آزمون	نتیجه	آزمون
+	Acid from maltose	-	Hydrogen sulfide production	-	Oxidase
+	Acid from mannitol	+	Acid from glucose	-	Indole production
+	Acid from sucrose	+	Motility	-	Methyl Red
+	Nitrate reduction	+	Gelatin hydrolysis, 22° C	+	Voges-Proskauer
+	Deoxyribonuclease, 25° C	-	Acid from lactose	+	Citrate (Simmons)
+	Catalase production (24 h)	-	Pigment	-	Urea hydrolysis

16S rDNA سریشیا نماتودیفیل^{۱۱} بود. توالی ژن *16S rDNA* باکتری‌های مشابه و جدایه MF1 به کمک نرم افزار ClustalX، هم‌ردیف‌سازی شد و درخت فیلوژنی آن به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega5 رسم شد. موقعیت فیلوژنی جدایه MF1 با *سریشیا نماتودیفیل* در شکل ۳ نشان داده شد. توالی ژن *16S rDNA* جدایه MF1 نیز در بانک ژنی NCBI به شماره دستیابی ژنی KF476657 ثبت شد.

همچنین، شناسایی مولکولی جدایه با استفاده از توالی ژن *16S rDNA* بررسی شد. به این منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *16S rDNA* انجام شد. پس از تعیین توالی، هومولوژی قطعه ژن *16S rDNA* (به طول ۱۰۴۹ نوکلوتید) باکتری تجزیه کننده سیانید با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی EzTaxon-e تعیین شد. نتایج BLAST نشان داد که جدایه MF1 دارای ۹۹ درصد هومولوژی با



شکل ۳- دندوگرام توالی ژن *16S rDNA* باکتری تجزیه کننده سیانید MF1 که به جنس *سریشیا* نزدیکی نشان داد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Microbacteriumoxydans* به عنوان out group قرار داده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه تجزیه زیستی سیانید به عنوان یک روش مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست در مقایسه با روش‌های متداول شیمیایی، مورد توجه قرار گرفته است.

میکروارگانیسم‌های مختلفی با توانایی تجزیه زیستی سیانید، شناسایی و بررسی شده‌اند. جدول ۴ میکروارگانیسم‌های مختلف تجزیه کننده سیانید شامل انواع قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۴- برخی میکروارگانیسم‌های گزارش شده برای تجزیه زیستی سیانید

منابع	میکروارگانیسم	منابع	میکروارگانیسم
۳۱	<i>Pseudomonas diminuta</i>	۲۳	<i>Stemphylium loti</i>
۱۷	<i>Burkholderia cepacia</i>	۲۴	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
۳۱	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	۲۶ و ۲۵	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
۳۲	<i>Citrobacter</i> sp.	۲۷	<i>Rhizopus oryzae</i>
۳۴، ۳۳	<i>Trichoderma</i> sp.	۲۸	<i>Klebsiella oxytoca</i>
۳۸ و ۳۷، ۳۶، ۳۵	<i>Fusarium oxysporum</i>	۲۹	<i>Pseudomonas</i> sp.
۳۹	<i>Bacillus pumilus</i>	۳۰	<i>Scenedesmus obliquus</i>

این باکتری تنها با افزودن منبع کربن و نیتروژن اضافی به محیط رشد، قادر به تجزیه ۰/۱ میلی مولار سیانید بود (۴۱). نتایج مطالعه دیگری که از سودوموناس فلورسانس برای تجزیه سیانید استفاده شد، نشان داد که این باکتری علاوه بر توانایی استفاده از یون‌های سیانید آهن به عنوان تنها منبع نیتروژن، ۷۹ درصد سیانید محیط رشد را در اسیدیته ۵ و در مدت ۴۸ ساعت تجزیه کرد (۲۵). در سال ۲۰۱۰ ازل^{۱۵} و همکاران توانایی تجزیه سیانید توسط جدایه‌های مختلف قارچ‌ها از گروه بازیدیومیست را بررسی و ۵ جدایه مختلف تجزیه کننده سیانید را شناسایی کردند. این جدایه‌ها توانایی تجزیه ۶۰ تا ۸۰ درصد سیانید محیط کشت را در مدت ۶۰ ساعت دارا بودند. قارچ فوزاریوم سولانی^{۱۶} توانایی تجزیه ۵۰ میلی گرم بر لیتر سیانید در مدت ۹۶ ساعت در شرایط قلیایی را دارا است (۱۵). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد جدایه MF1 علاوه بر توانایی خوب در تجزیه کامل سیانید، دارای سرعت تجزیه مناسب بوده و سیانید را در مدت حدود ۴۰ ساعت تجزیه کرد.

همچنین، نتایج نشان داد که جدایه MF1 بدون نیاز به منبع کربن و نیتروژن اضافی، توانایی تجزیه سیانید در

سیانید در شرایط اسیدی و خنثی، به شکل گاز هیدروژن سیانید تبخیر می‌شود ولی در شرایط قلیایی پایدار است (۱۱). بنابراین، جداسازی میکروارگانیسم‌ها با توانایی تجزیه سیانید در شرایط قلیایی، می‌تواند برای حذف این آلاینده از محیط زیست، بسیار موثر باشد. در این تحقیق، باکتری‌های تجزیه کننده سیانید، با غنی‌سازی خاک آلوده معدن طلا و تحت شرایط قلیایی، جداسازی شد. برای سنجش تجزیه سیانید، از روش اندازه‌گیری پیکریک اسید استفاده شد. این روش برای سنجش سیانید آزاد و کمپلکس‌های ضعیف سیانید-فلز استفاده می‌شود (۱۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه MF1 توانست مقدار ۱۳۲ میلی گرم بر لیتر سیانید موجود در محیط کشت (دو میلی مولار سیانید) را کاملاً تجزیه کند. بیشترین تجزیه در ۱۲ ساعت ابتدای رشد باکتری انجام شد. در مطالعه مشابه در سال ۲۰۰۳، کائو^{۱۲} و همکاران تجزیه سیانید با کلبسیلا اکسیتوکا^{۱۳} را بررسی کردند. این جدایه ۰/۹ میلی مولار سیانید را در مدت ۸۰ ساعت تجزیه کرد (۴۰). همچنین، در سال ۲۰۱۳، مانام^{۱۴} و همکاران تجزیه زیستی سیانید توسط باکتری رودوکوکوس را بررسی کردند.

از ترکیبات مختلف سیانیدی (ترکیبات سیانید-فلز و نیتریل) به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن را نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد از میان ترکیبات مختلف سیانیدی، بیشترین رشد جدایه MF1 در حضور $K_4[Fe(CN)_6]$ انجام شد. ترکیبات سیانید-فلز را بر اساس انحلال آن‌ها در اسیدیته مختلف می‌توان به دو دسته حل شونده به وسیله اسید ضعیف $(CN)_{WAD}^{22}$ و حل شونده به وسیله اسید قوی $(CN)_{SAD}^{23}$ تقسیم کرد. ترکیب سیانید با فلزاتی نظیر آهن و کبالت در دسته CN_{SAD} قرار می‌گیرند. این ترکیبات بسیار پایدارند و گروه سیانیدی خود را در اسیدیته صفر آزاد می‌کنند (۱۱). میکروارگانیزم‌هایی نظیر *فوزاریم سولانی*^{۲۴} (۴۴)، *سودوموناس فلورسانس*^{۲۵} (۹) و *سودوموناس سودوآلکالیترنز* (۱۱) شناسایی شدند که توانایی استفاده از ترکیبات CN_{SAD} به عنوان تنها منبع نیتروژن را دارند.

سیانید ترکیب بسیار سمی است که با فعالیت صنعتی انسان، باعث آلودگی گسترده طبیعت به این آلاینده شده است. با جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده سیانید از خاک‌های آلوده و ایجاد شرایط بهینه تجزیه زیستی، می‌توان با صرف هزینه کمتر و نیز مشکلات زیست محیطی کمتر، پساب آلوده به این ترکیب سمی را پالایش کرد. نتایج نشان داد که جدایه MF1 توانست پس از ۴۰ ساعت گرمخانه‌گذاری، سیانید موجود در محیط رشد را تجزیه کند. همچنین، این جدایه توانایی استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن را داشت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد باکتری *سریشیا سوبیه MF1* جدا شده از خاک معدن طلا، گزینه مناسبی برای تجزیه زیستی سیانید در شرایط قلیایی است و می‌تواند برای تجزیه سیانید از پساب صنایع و مکان‌های آلوده، به کار گرفته شود.

شرایط قلیایی را داراست. در سال ۱۹۹۹ آدجی و اوها^{۱۷} تجزیه سیانید توسط *بورخولدریا سپاسیا*^{۱۸} را در شرایط قلیایی مطالعه کردند. این باکتری توانایی استفاده از سیانید به عنوان تنها منبع نیتروژن را داشت ولی نیازمند به افزودن گلوکز به عنوان منبع کربن بود (۱۷). در سال ۲۰۰۵ جدایه‌ای به نام *سودوموناس سودوآلکالیترنز*^{۱۹} از پساب صنایع جواهرسازی اسپانیا جداسازی شد. این باکتری توانایی استفاده از سیانید به عنوان تنها منبع نیتروژن را در شرایط قلیایی دارا بود اما این جدایه نیز به استات، به عنوان منبع کربن اضافی نیاز داشت (۱۱). کمبود منبع کربن محیط رشد، یک عامل بازدارنده در تجزیه زیستی سیانید خاک‌های آلوده به شمار می‌آید (۸). بنابراین، جدایه MF1 با توانایی تجزیه سیانید بدون افزودن منبع کربن و نیتروژن، دارای برتری نسبت به سایر جدایه‌هاست.

نتایج بررسی سمیت ترکیبات مختلف سیانیدی بر باکتری تجزیه‌کننده MF1، نشان داد که جدایه MF1 توانایی خوبی در تحمل غلظت‌های بالای ترکیبات سیانیدی را دارد. ترکیبات پایدار سیانید نظیر کمپلکس‌های آهن و نیکل به علت پیوند قوی با گروه CN، سمیت کمتری نشان می‌دهند اما ترکیبات با پیوند ضعیف‌تر همانند سدیم سیانات و پتاسیم سیانات به علت انحلال پذیری بیشتر در آب و آزاد کردن گروه CN، سمیت بیشتری دارند (۱۱). سوزا^{۲۰} و همکاران حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ترکیب سیانیدی NaSCN بر باکتری *سودوموناس* را ۴۵ میلی‌مولار گزارش کردند (۴۲).

نتایج این پژوهش توانایی جدایه MF1 در استفاده از ترکیبات مختلف سیانیدی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، را نشان می‌دهد. این جدایه توانایی رشد روی تمام ترکیبات سیانیدی آزمایش شده را به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن دارا بود. جدایه‌هایی از *سیتوباکتر*^{۲۱} (۴۳) و *بورخولدریا سپاسیا* (۱۷) شناسایی شدند که توانایی استفاده

References

- (1) Kwon HK, Woo SH, Park JM. Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicolus* MCN2. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 214 (2): 211- 16.
- (2) Jones DA. Why are so many food plants cyanogenic?. *Phytochemistry* 1998; 47 (2): 155- 62.
- (3) Dursun AYÇ, alik A, Aksu Z. Degradation of ferrous (II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*. *Process Biochemistry* 1999; 34 (9): 901- 08.
- (4) Baxter J, Cummings SP. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006; 90 (1): 1- 17.
- (5) Arslan F, Ozdamar DY, Muduroglu M. Cyanidation of Turkish gold-silver ore and the use of hydrogen peroxide. *European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* 2003; 3 (3): 309- 15.
- (6) Soldan P, Pavonic M, Boucek J, Kokes J. Baia Mare accident brief ecotoxicological report of Czech experts. *Ecotoxicology and environmental safety* 2001; 49 (3): 255-61.
- (7) Leavesley HB, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological Sciences* 2008; 101 (1): 101-11.
- (8) Young CA, Jordan TS. Cyanide remediation: current and past technologies. In Conference Proceeding, Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research. Kansas State University: Manhattan, KS; 1995. p. 104-29.
- (9) Akcil A, Mudder T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters* 2003; 25 (6): 445- 50.
- (10) Demopoulos GP, Cheng TC. A case study of CIP tails slurry treatment: comparison of cyanide recovery to cyanide destruction. *European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* 2004; 4 (1): 1-9.
- (11) Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Martinez-Luque M, Moreno-Vivian C, Roldan MD, Garcia-Gil LJ, Castillo F, Blasco R. Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71 (2): 940- 47.
- (12) Ezzi MI, Lynch JM. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36 (7): 849-54.
- (13) Kwon HK, Woo SH, Park JM. Thiocyanate degradation by *Acremonium strictum* and inhibition by secondary toxicants. *Biotechnology Letters* 2002; 24 (16): 1347-51.
- (14) Fisher FB, Brown JS. Colorimetric determination of cyanide in stack gas and waste water. *Analytical Chemistry* 1952; 24 (9): 1440-44.
- (15) Özel YK, Gedikli S, Aytar P, Ünal A, Yamaç M, Çabuk A, Kolankaya N. New fungal biomasses for cyanide biodegradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; 110 (4): 431-35.
- (16) Silva-Avalos JUAN, Richmond MG, Nagappan O, Kunz DA. Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by cyanide-utilizing bacterial isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 56 (12): 3664- 70.
- (17) Adjei MD, Ohta Y. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1999; 15 (6): 699-704.
- (18) Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition, volume 2, USA: Springer; 2004.

- (19) Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (11): 4147- 54.
- (20) Sambrook J, Russell DW. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
- (21) Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl Acids Res* 1989; 17 (19): 7843-53.
- (22) Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012; 62: 716- 21.
- (23) Fry WE, Millar RL. Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1972; 151 (2): 468-74.
- (24) Atkinson A. Bacterial cyanide detoxification. *Biotechnology and Bioengineering* 1975; 17 (3): 457-60.
- (25) Harris RE, Knowles CJ. The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth. *FEMS Microbiology Letters* 1983; 20 (3): 337- 41.
- (26) Dash RR, Balomajumder C, Kumar A. Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption and biodegradation (SAB). *Journal of Hazardous Materials* 2008; 152 (1): 387- 96.
- (27) Padmaja G, Balagopal C. Cyanide degradation by *Rhizopus oryzae*. *Canadian Journal of Microbiology* 1985; 31 (8): 663- 9.
- (28) Wang PY, Tsai SW, Chen TL. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C 250L. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2008; 83 (11): 1518-1525.
- (29) Akcil A, Karahan AG, Ciftci H, Sagdic O. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.) *Minerals Engineering* 2003; 16 (7): 643-49.
- (30) Gurbuz F, Ciftci H, Akcil A. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 162 (1): 74- 79.
- (31) Kowalska M, Bodzek M, Bohdziewicz J. Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *Process Biochemistry* 1998; 33 (2): 189-97.
- (32) Patil YB, Paknikar KM. Development of a process for biodetoxification of metal cyanides from waste waters. *Process biochemistry* 2000; 35 (10):1139-51.
- (33) Ezzi MI, Lynch JM. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 31 (7): 1042- 47.
- (34) Ezzi MI, Pascual JA, Gould BJ, Lynch JM. Characterisation of the rhodanese enzyme in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32 (5): 629- 34.
- (35) Pereira PT, Arrabaça JD, Amaral-Collaco MT. Isolation, selection and characterization of a cyanide-degrading fungus from an industrial effluent. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1996; 37 (1): 45-52.
- (36) Pereira P, Pires AS, Roseiro JC. The effect of culture aging, cyanide concentration and induction time on formamide hydro-lyase activity of *Fusarium oxysporum* CCMI 876. *Enzyme and Microbial Technology* 1999; 25 (8):736-44.

- (37) Barclay M, Tett VA, Knowles CJ. Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 1998; 23 (5): 321-30.
- (38) Campos MG, Pereira P, Roseiro JC. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised *Fusarium oxysporum* CCM1 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCM1 908. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 38 (6): 848-54.
- (39) Meyers PR, Rawlings DE, Woods DR, Lindsey GG. Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. *Journal of Bacteriology* 1993; 175 (19): 6105-12.
- (40) Kao CM, Liu JK, Lou HR, Lin CS, Chen SC. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 2003; 50 (8):1055-1061.
- (41) Maniyam MN, Sjahrir F, Ibrahim AL, Cass AE. Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia* 2013; 68 (2): 177- 85.
- (42) SouzaFagundes EM, Rosa LH, Gomes N, Santos M,H, Pimentel PF. Thiocyanate degradation by pure and mixed cultures of microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004; 35 (4): 333- 36.
- (43) Finnegan I, Toerien S, Abbot L, Smit F, Raubenheimer HG. Identification and characterisation of an *Acinetobacter* sp. capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991; 36 (1): 142-44.
- (44) Barclay M, Tett VA, Knowles CJ. Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 1998; 23 (5): 321- 30.

-
- ¹ - Baia Mare
 - ² - Nessler's methods
 - ³ - Minimum inhibitory concentration
 - ⁴ - Merck
 - ⁵ - Methyl Red
 - ⁶ - Voges-Proskauer
 - ⁷ - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
 - ⁸ - Thermo Scientific, Lithuania
 - ⁹ - Accession Number
 - ¹⁰ - *Serratia*
 - ¹¹ - *Serratia nematodiphila*
 - ¹² - Kao
 - ¹³ - *Klebsiella oxytoca*
 - ¹⁴ - Maniyam
 - ¹⁵ - Özel
 - ¹⁶ - *Fusarium solani*
 - ¹⁷ - Adjei and Ohta
 - ¹⁸ - *Burkholderia cepacia*
 - ¹⁹ - *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
 - ²⁰ - Souza
 - ²¹ - *Acinetobacter* sp
 - ²² - CN weak acid-dissociable
 - ²³ - CN strong acid-dissociable
 - ²⁴ - *Fusarium solani*
 - ²⁵ - *Pseudomonas fluorescens*

Biodegradation of cyanide using *Serratia* sp. isolated from contaminated soil of gold mine in Takab

Mojtaba Mohseni *

Assistant Professor of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, m.mohseni@umz.ac.ir

Sajad Firuzyar

M.Sc. of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, s.firuzyar@stu.umz.ac.ir

Abstract

Introduction: Cyanide is a toxic and hazardous compound for all organisms which is produced enormously by human being and causes the environment pollution. Biodegradation is the best method for cyanide elimination in industrial wastewater. The aims of this study were isolation of cyanide degrading bacteria from contaminated soil and investigation of their ability for cyanide degradation.

Materials and methods: After soil samples collection, enrichment of cyanide degrading bacteria was performed in a minimal medium containing 0.5 mM potassium cyanide. The ability of isolated bacterium to utilize the cyanide as sole carbon and nitrogen source was investigated. Cyanide degradation and ammonium production was determined in growth medium using picric acid and Nessler's reagent methods. Toxicity effect of different cyanide compounds on bacterial growth was determined using minimum inhibitory concentration. In addition, the ability of the isolated bacterium to utilize different cyanide compounds was investigated. Identification of the isolate was undertaken using morphological, physiological and biochemical characteristics and molecular analysis.

Results: A bacterium with ability to degrade cyanide as sole carbon and nitrogen source was isolated from soil. This bacterium named as isolate MF1. MF1 degraded cyanide in growth medium in alkaline condition after 40 hours. Moreover this isolate tolerated more than 7 mM potassium cyanide. The results showed that there was a direct relation between decreasing of cyanide concentration, increasing of ammonia concentration and growth of MF1. In addition, the isolated bacterium demonstrated the ability to utilize different cyanide compounds as sole carbon and nitrogen source. The results of morphological and physiological characteristics showed that this bacterium belonged to the *Serratia* sp. Moreover, *16S rDNA* sequencing and phylogenetic analyses exhibited that MF1 strain was similar to *Serratia nematodiphila* with 99% homology.

Discussion and conclusion: The results demonstrated that the isolated bacterium is a suitable candidate for degradation of cyanide in alkaline condition. This bacterium could introduce for treatment of industrial wastewater and sites that contaminated with cyanide.

Key words: Biodegradation, Cyanide, *Serratia*, Wastewater

* Corresponding author

Received: September 1, 2013 / **Accepted** December 10, 2013