

## شناسایی و معرفی سویه ایرانی پانتوآ آگلومرانس AKH25 با استفاده از توالی 16S rRNA

### و بررسی قدرت تجزیه‌کنندگی مالونونیتریل آن

نرجس رضانی‌پور، ارسطو بدویی دلفارد\*، زهرا کرمی، عبدالحمید نمکی شوشتری

کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۱

#### چکیده

مالونونیتریل  $\text{CH}_2(\text{CN})_2$  یک ترکیب دی‌نیتریلی با ساختار خطی است که در تولید علف‌کشها، داروهای ضد سرطان و رنگها، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر، باکتریهای هیدرولیز کننده مالونونیتریل با استفاده از محیط کشت MM1 (mineral salts medium) حاوی ۱ درصد مالونونیتریل از نمونه فاضلاب جمع‌آوری شده و به دو روش بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. برای این منظور ابتدا میزان هیدرولیز مالونونیتریل توسط سویه‌های جدا شده با روش رنگ‌سنجی تعیین شد. سویه‌ای که دارای بیشترین قدرت هیدرولیز کنندگی بود، انتخاب گردید و با استفاده از روش PCR و پرایمرهای طراحی شده، ژن 16S rRNA آن تکثیر و تعیین توالی گردید. مقایسه توالی به دست آمده (KM229757) با سایر توالیهای ثبت شده در بانک ژنی نشان داد سویه جداسازی شده (AKH25) مربوط به پانتوآ آگلومرانس از خانواده *انتروباکتریاسه* است. در مطالعه دیگر، منحنی رشد و میزان آمونیاک آزاد شده در حضور غلظتهای مختلف مالونونیتریل رسم گردید. نتایج نشان داد این سویه، دارای بالاترین فعالیت تجزیه مالونونیتریل به میزان ۱/۴۸ و ۳/۳۳ میلی‌مولار آمونیاک تولیدی در حضور غلظتهای ۲ و ۵ میلی‌مولار مالونونیتریل در ۲۱ ساعت پس از انکوباسیون در فاز سکون منحنی رشد بود. بر اساس این تحقیق، سویه ایرانی پانتوآ آگلومرانس AKH25 می‌تواند کاندید مناسبی برای حذف مالونونیتریل از محیطهای آلوده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، مالونونیتریل، پانتوآ آگلومرانس، دی‌نیتریل

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۲۲۰۳۲، پست الکترونیکی: badoei@uk.ac.ir

#### مقدمه

توسعه روز افزون کارخانه‌ها و صنایع شیمیایی متعدد، باعث تولید و مصرف ترکیبات شیمیایی مختلف شده است که پیامد آن تهدید جهانی برای محیط زیست می‌باشد (۴). نیتریلها و مشتقات آنها با ساختار کلی  $\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$  به طور وسیعی در تولید انواع حلالها، پلاستیکها، حشره کشها، علف‌کشها، رنگها، مواد دارویی، پلیمرها و ... استفاده می‌شوند (۸ و ۲۶). علاوه بر فاضلاب خانگی، شهری و پساب کشاورزی از جمله صنایعی که خروجی فاضلاب آنها محتوی ترکیبات نیتریل است می‌توان به صنایع دست‌کاری فلزات، استخراج معادن و ... اشاره کرد (۶). مالونونیتریل

$\text{CH}_2(\text{CN})_2$ ، یک ترکیب دی‌نیتریلی با ساختار خطی است که علاوه بر استفاده گسترده در تولید علف‌کشها، داروهای ضد سرطان و رنگها، به صورت ویژه و انبوه در تولید گاز اشک‌آور ۲-کلرو بنزیلیدین مالونونیتریل (2-Chlorobenzylidene Malononitrile) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). برخی از عوارض این گاز اشک‌آور شامل سرگیجه، درد قفسه سینه، سردرد شدید، دو بینی و تاری دید، خستگی، تهوع، استفراغ، استفراغ خونی، دردهای شکمی و افزایش ترشحات دهان، بینی، چشم و سیستم تنفسی و دردهای شدید عضلانی ذکر شده است (۵، ۱۰).

این گاز در زمان ۸ سال دفاع مقدس کشور ایران، از جمله سلاح‌های شیمیایی-جنگی کشور عراق بود که برای اولین بار در عملیات رمضان نقش بازدارندگی به خود گرفت و نیروهای ایران را از دستیابی به اهداف عملیاتی بازداشت (۱۵). در پی این واقعه، روزنامه لس آنجلس تایمز چاپ آمریکا نوشت: در تابستان سال ۱۹۸۲ میلادی (۱۳۶۱ ه. ش.)، هنگامی که نیروهای ایرانی به نزدیکی سربازان عراقی رسیدند، دشمن از عامل سی اس که به عنوان گاز اشک آور شناخته می‌شود، استفاده کرد (۱۵). این ماده با تأثیر بر DNA سلول می‌تواند سبب عوارض دیررس و تغییرات کارسینوژنیک و سرطان‌زایی در انسان شده و همچنین به دلیل نیمه‌عمر طولانی با شسته شدن توسط آب باران و سرازیر شدن به مزارع که از آب‌های سطحی استفاده می‌کنند، سبب بروز عوارض زیست محیطی گردد (۱۵). به طوری که، مالونونیتریل و مشتقات آن پس از رهاسازی در محیط زیست اثرات مضرمانند کاهش رشد موجودات زنده، کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها، مرگ و میر موجودات، افزایش جهش‌های ژنتیکی و سرطان را ایجاد می‌کنند (۱۴). این ترکیبات در بدن انسان بلافاصله در اثر متابولسم کبدی به ماده سمی سیانید تبدیل شده و منجر به ایجاد مسائل جدی در بحث سلامت فردی می‌شوند (۲۷). از جمله راهکارها برای حذف یا تبدیل ترکیبات نیتریل به ترکیبات اسیدی یا آمیدی بی‌خطر می‌توان به هیدرولیز شیمیایی و آنزیمی اشاره نمود. پیوند نیتریل در ترکیبات نیتریل‌دار بسیار پایدار می‌باشد، این امر سبب می‌شود تا هیدرولیز شیمیایی آنها نیازمند شرایط سخت اسیدی (۶ مولار اسیدکلردریک) یا بازی (۲ مولار سدیم هیدروکسید) و دمای واکنشی بالا باشد (۲۳). علاوه بر آن تولید محصولات جانبی مانند اسید سیانیدریک سمی و مقادیر بالای نمک و ... می‌تواند مشکلات فراوانی به وجود آورد (۲۳). با توجه به این معایب، تجزیه به روش میکروبی-آنزیمی با داشتن مزایایی مانند امکان کنترل فیزیولوژیکی و فیزیوکوشیمیایی، تنوع آنزیمی و مقادیر

بالای تولید آنزیم می‌تواند راهی مؤثر و کارآ برای حذف یا تبدیل نیتریلهایی با سمیت بالا از محیط زیست می‌باشد (۱). در این راستا، جداسازی و غربالگری آنزیم‌های جدید با خصوصیات مؤثر و بهینه از میکروارگانیسم‌ها به عنوان اولین مرحله در مسیر تحقیق و توسعه محصولات آنزیمی بررسی شده و باکتری‌های متنوعی جداسازی و بررسی شدند (۲). تاکنون گزارشات محدودی از جداسازی و فعالیت باکتری‌های هیدرولیز کننده دی‌نیتریل‌های آلیفاتیک به ویژه مالونونیتریل منتشر شده است که می‌توان به جداسازی *Pyrococcus abyssi* (۲۵) و *Bacillus RAPc8* (۲۷) با سوبسترای مالونونیتریل، فعالیت ۱۷ درصدی هیدرولیز مالونونیتریل سویه *Burkholderia cenocepacia* J231 (۱۹) و فعالیت آنزیمی باکتری *Bacillus Pallidus* Dac521 روی دو سوبسترای گلو تارونیتریل و آدیونیتریل در مقایسه با سوبسترای کنترل بنزونیتریل با مقادیر ۱۰ و ۱۴ درصد اشاره نمود (۳). ترکیب نیتریل به عنوان یک منبع کربن و یا انرژی در این باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در نهایت به کربوکسیلیک اسید و آمونیاک تبدیل می‌شود (۸). از آنجایی که بهترین روش برای حذف مالونونیتریل از محیط زیست، استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده این ترکیب است. در این تحقیق یک باکتری ایرانی با توانایی حذف مالونونیتریل از فاضلاب شهری کرمان جداسازی گردید. سپس این سویه (AKH25) با استفاده از ژن 16S rRNA شناسایی و پتانسیل حذف مالونونیتریل آن مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روشها

تهیه نمونه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های هیدرولیز کننده مالونونیتریل: نمونه‌های حاوی باکتری از محل فاضلاب شهر کرمان تهیه گردید. جداسازی باکتری‌های هیدرولیز کننده مالونونیتریل به روش غنی‌سازی در محیط حاوی سوبسترای اختصاصی صورت گرفت. برای این منظور از محیط حداقل نمک‌های معدنی (MMI) به همراه

شناسایی مولکولی باکتری با تکثیر قسمتی از ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای 5'-Forward AGTTTGATCCTGGCTCCAG-3' و 3'-Reverse GGCTACCTTGTTACGACTT-3' با  $T_m=53.7^\circ\text{C}$  و  $T_m = 53.4^\circ\text{C}$  انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو (10 mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۱ میکرولیتر (50 mM)  $\text{MgCl}_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/ml) خریداری شده از شرکت سیناژن و ۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه با برنامه ذیل انجام شد. (۱) دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، (۲) ۵۲ درجه سانتی‌گراد، (۳) ۷۲ درجه سانتی‌گراد، (۴) ۹۰ ثانیه، (۵) ۴۵ ثانیه، (۶) ۷۲ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۸ دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خلص‌سازی شد. سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA توسط شرکت بیونیر (کره) تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rRNA سویه هیدرولیز کننده به کمک نرم‌افزار BLAST با توالیهای ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد (۱۶). به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rRNA با سویه تعیین شد. همچنین، توالی به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره دستیابی ژنی مربوطه دریافت شد. درخت فیلوژنی توالی سویه با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به کمک نرم‌افزار MEGA4 با روش neighbour joining رسم شد (۲۴).

**سنجش فعالیت آنزیمی:** فعالیت آنزیم بر اساس مقدار آمونیاک تولیدی با استفاده از روش فنل-هیپوکلیت ارائه شده توسط فاست و اسکات سنجیده شد (۹). بر اساس این روش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی آنزیم، ۱۰۰ میکرولیتر مالونونیتریل ۲۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافر

یک درصد مالونونیتریل به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد (۲۲). محیط حداقل نمکهای معدنی (pH ۷) حاوی ترکیبات: ۶/۸ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱/۲ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۱ گرم سولفات منیزیم، ۰/۱ گرم سولفات منگنز، ۰/۱ گرم کلسیم دی‌کلرید، ۰/۱ گرم سولفات آهن و ۰/۰۰۶ گرم سدیم مولیبدات در یک لیتر آب مقطر بود. میزان ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های آب درون این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و روی شیکر-انکوباتور با ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت یک هفته، ۵ میلی‌لیتر از محیط برداشته شد و به محیط حداقل نمکهای معدنی جدید انتقال یافت. این عمل تا ۳ پاساژ ادامه یافت تا اینکه کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتریها باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ نهایی میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت جامد نمکهای معدنی منتقل گردید. پس از رشد، باکتریها به صورت تک کلنی جداسازی و به محیط حداقل نمکهای معدنی جدید انتقال یافتند. باکتریهایی که در مراحل قبلی جداسازی شده بودند، در پلیتهای حاوی محیط حداقل نمکهای معدنی، ۱۰۰ میکرولیتر مالونونیتریل و ۰/۰۲ درصد فنل‌رد به عنوان شناساگر کشت داده شده و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از سه دوره کشت از میان سویه‌های با فعالیت هیدرولیز مالونونیتریل، سویه‌ای که بیشترین هاله و میزان شدت رنگ در محیط جامد و مایع حاوی سوبسترا و فنل‌رد، بود به عنوان سویه برتر مولد آنزیم تجزیه کننده مالونونیتریل جهت مطالعات بعدی انتخاب شد. با استفاده از برخی آزمونهای میکروبی و بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، آزمون حرکت، تولید اندول، تولید سولفید هیدروژن، احیای نترات، آزمایش وژز-پروسکوئر، هیدرولیز ژلاتین، شناسایی اولیه باکتری برتر هیدرولیز کننده مالونونیتریل انجام گرفت (۱۷).

میلی‌مولار مالونونیتریل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ کشت داده شد. میزان آمونیاک آزاد شده حاصل از تجزیه مالونونیتریل طبق روش ذکر شده اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، منحنی رشد سویه مورد نظر در غلظت‌های ۲ و ۵ میلی‌مولار مالونونیتریل نیز به روش کدورت‌سنجی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر در فاصله‌های زمانی مشخص ۰ تا ۳۶ ساعت پس از انکوباسیون رسم شد.

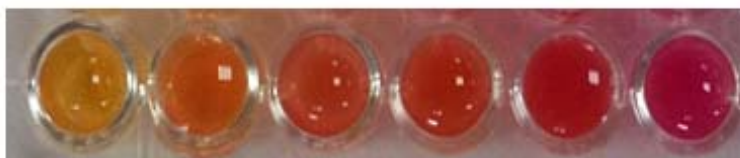
### نتایج

**جداسازی باکتری‌های هیدرولیز کننده مالونونیتریل:** جداسازی باکتری‌های هیدرولیز کننده مالونونیتریل با غنی‌سازی نمونه‌های فاضلاب در محیط کشت حداقل نمک‌های معدنی (MMI) حاوی یک درصد مالونونیتریل انجام شد. پس از رشد، تعداد ۴ سویه با توانایی استفاده از مالونونیتریل به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن روی محیط کشت حاوی مالونونیتریل و فنل‌رد، جداسازی و خالص‌سازی شد. از میان ۴ سویه جدا شده، سویه AKH25 با ایجاد بیشترین هاله و شدت رنگ صورتی در محیط جامد و مایع حاوی فنل‌رد برای ادامه مطالعات انتخاب گردید. نتایج حاصل از تجزیه مالونونیتریل و تغییر رنگ فنل‌رد در شکل ۱ نشان داده شد. این نتایج نشان داد که تجزیه مالونونیتریل از ۳ ساعت پس از انکوباسیون شروع و به تدریج افزایش یافته است به طوری که در ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون بیشترین فعالیت تجزیه‌کنندگی مشاهده گردید.

فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از آن مقادیر ۴۰۰ میکرولیتر محلول A (فنل ۰/۵۹ مولار و سدیم نیتروپروساید ۱ میلی‌مولار) و ۴۰۰ میکرولیتر محلول B (سدیم هیپوکلریت ۰/۱۱ مولار و سدیم هیدروکسید ۲ مولار) به آن اضافه شد. پس از پدیدار شدن رنگ آبی مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مرئی-فرابنفش) خوانده شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهدی که در آن آنزیم پس از انکوباسیون مخلوط واکنش به آن اضافه شده بود استفاده گردید. بر این اساس، یک واحد فعالیت آنزیم عبارت است از مقدار آنزیمی که قادر است ۱ میکرومول آمونیاک به ازای ۱ دقیقه تحت شرایط استاندارد واکنش آزاد نماید. آزمایشات ۳ بار تکرار و منحنی استاندارد توسط آمونیم کلراید رسم شد (۲۱).

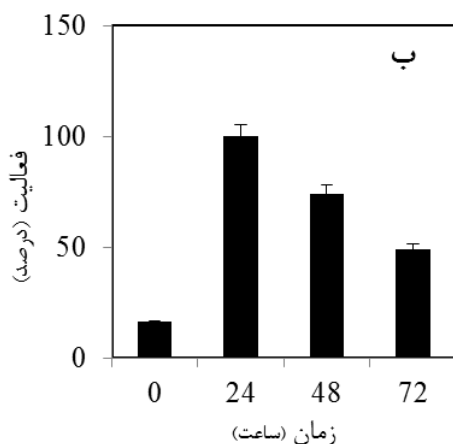
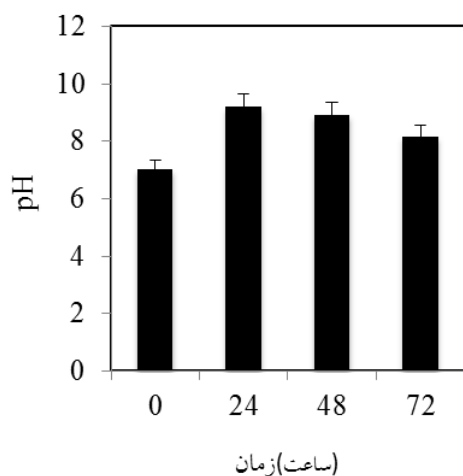
**بررسی میزان هیدرولیز مالونونیتریل و تغییرات pH در طی زمان:** سویه باکتریایی مورد نظر در حضور غلظت یک درصد مالونونیتریل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ کشت داده شد. میزان تغییرات pH و تولید آمونیاک ناشی از فعالیت آنزیم در مدت زمان ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون و همچنین تجزیه مالونونیتریل در حضور و عدم حضور سوپسترا در مدت زمان ۰ و ۷۲ ساعت، با روش گفته شده مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

**منحنی رشد و هیدرولیز مالونونیتریل توسط سویه مورد نظر:** سویه باکتریایی مورد نظر در حضور غلظت‌های ۲ و ۵



شکل ۱- روند تغییر رنگ محیط مایع حاوی فنل‌رد و مالونونیتریل از زرد به صورتی توسط باکتری پانتوا آگلومرانس AKH25 درون میکروپلیت در بازه زمانی ۰ تا ۱۵ ساعت پس از رشد

شکل ۱- روند تغییر رنگ محیط مایع حاوی فنل‌رد و مالونونیتریل از زرد به صورتی توسط باکتری پانتوا آگلومرانس AKH25 درون میکروپلیت در بازه زمانی ۰ تا ۱۵ ساعت پس از رشد



شکل ۲- بررسی میزان تجزیه مالونونیتریل در طی زمان ۷۲ ساعت. الف) تغییرات pH، ب) میزان آمونیاک تولیدی.

نتایج نشان داد که این سویه باکتریایی در این مدت، ۱/۴۸ میلی مولار آمونیاک را از تجزیه ۲ میلی مولار مالونونیتریل تولید کرد (شکل ۳-الف). علاوه بر این میزان تولید آمونیاک از تجزیه ۵ میلی مولار مالونونیتریل در همین زمان حدود ۳/۳۳ میلی مولار بود (شکل ۳-ب). پس از این مدت با کاهش یافتن میزان رشد باکتری، میزان تجزیه و تولید آمونیاک نیز کاهش یافت.

**شناسایی بیوشیمیایی:** برای شناسایی سویه موردنظر، خصوصیات فنوتیپیکی و برخی آزمونهای بیوشیمیایی- میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این

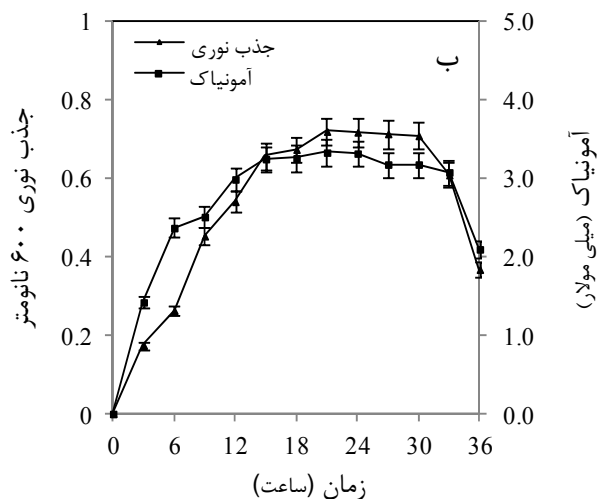
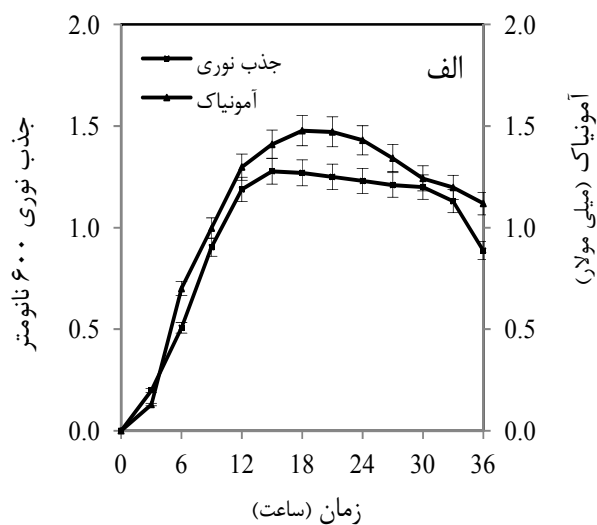
بررسی میزان هیدرولیز مالونونیتریل و تغییرات pH در طی زمان: نتایج تغییرات pH و آمونیاک تولید شده حاصل از فعالیت آنزیمی سویه پانتوآ آگلومرانس AKH25 در زمانهای مختلف انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده شد. نتایج نشان داد زمان بهینه فعالیت هیدرولازی، ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون بود (شکل ۲-الف). علاوه بر این، نتایج خاطر نشان می‌سازد که میزان تغییرات pH محیط با میزان فعالیت آنزیم و تجزیه مالونونیتریل نیز رابطه مستقیم دارد به طوری که بیشترین میزان تغییر pH ناشی از آزادسازی آمونیاک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده گردید. به این ترتیب در اثر تجمع آمونیاک در محیط، pH خنثی اولیه به سمت قلیایی شدن پیش رفته و در زمان ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون به بالاترین حد خود رسید و پس از آن به تدریج کاهش یافت (شکل ۲-ب).

نتایج حاصل از منحنی رشد و تجزیه مالونونیتریل (غلظتهای ۲ و ۵ میلی مولار) توسط سویه AKH25 در بازه زمانی ۳۶ ساعت در شکل ۲ نشان داده شد. در این آزمایش سویه AKH25 در محیط اختصاصی MM<sub>1</sub> حاوی مالونونیتریل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۶۰ کشت داده شد. سپس هر ۳ ساعت یکبار میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید که معیاری از رشد باکتری بود. نتایج نشان داد که باکتری دارای فاز تأخیر تقریبی حدود ۲ ساعت بوده و پس از آن در بازه زمانی حدود ۳-۱۲ ساعت، در فاز لگاریتمی قرار داشت. بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون فاز سکون شروع شده و باکتری در حدود ۲۷ ساعت بعد از کشت وارد فاز مرگ شد. مقایسه نمودارهای حاصل از فعالیت آنزیمی تجزیه غلظتهای ۲ و ۵ میلی مولار مالونونیتریل نشان داد که این باکتری در زمان تقریبی ۲۱ ساعت رشد دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بود. از این رو، میزان آمونیاک آزاد شده ناشی از تجزیه مالونونیتریل در این زمان بیشترین مقدار بود.

سویه از جمله باکتریهای گرم منفی، دارای پیگمان و از جنس پانتوآ بود (جدول ۱).

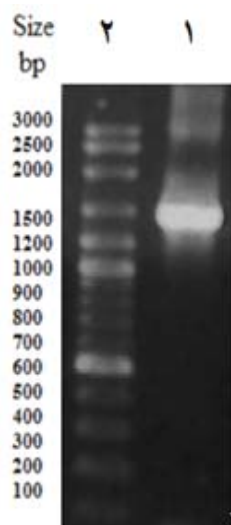
جدول ۱- نتایج آزمونهای بیوشیمیایی - میکروبی باکتری پانتوآ آگلومرانس AKH25

نتیجه	خصوصیات سویه
منفی	واکنش گرم
باسیلوس	شکل باکتری
زرد رنگ	پیگمان
-	تولید اندول
-	اوره‌آز
+	حرکت
+	احیا نیترات
+	واکنش VP
+	هیدرولیز ژلاتین
+	رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد



شکل ۳- منحنی رشد و فعالیت هیدرولیز مالونونیتریل در بازه زمانی ۳۶ ساعت در دو غلظت مختلف آمونیاک. الف) غلظت ۲ میلی‌مولار، ب) غلظت ۵ میلی‌مولار.

نوکلئوتیدی آن ۹۹ درصد بود. توالی نوکلئوتیدی ارائه شده در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی KM229757 ثبت و در دسترس است.



شکل ۴. محصول PCR ژن 16S rRNA سویه پانتوآ آگلومرانس AKH25 (چاهک شماره ۱) و DNA مارکر (چاهک شماره ۲).

شناسایی با استفاده از 16S rRNA: تعیین گونه باکتریایی با استفاده از اطلاعات حاصل از توالی ژن 16S rRNA انجام شد. توالی ژن 16S rRNA دارای بخشهای حفاظت شده و غیر حفاظت شده می‌باشد که از اطلاعات مربوط به این بخشها برای شناسایی گونه‌های باکتریایی استفاده می‌شود. برای تهیه DNA ژنومی باکتری، از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده شد و DNA تکثیر یافته با استفاده از PCR پس از مشاهده روی ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۴) توسط کیت تخلیص DNA از شرکت سیناژن تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره) ارسال شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم گردید (شکل ۵). مقایسه توالی ژن 16S rRNA این سویه باکتریایی با ۱۳ گونه نزدیک از نظر توالی ژن مورد نظر موجود در NCBI نیز در جدول ۲ آورده شد. نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که گونه فوق به *Pantoea agglomerans* نزدیک و میزان شباهت

جدول ۲- مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA جدایه AKH25 با سایر گونه‌های موجود در NCBI

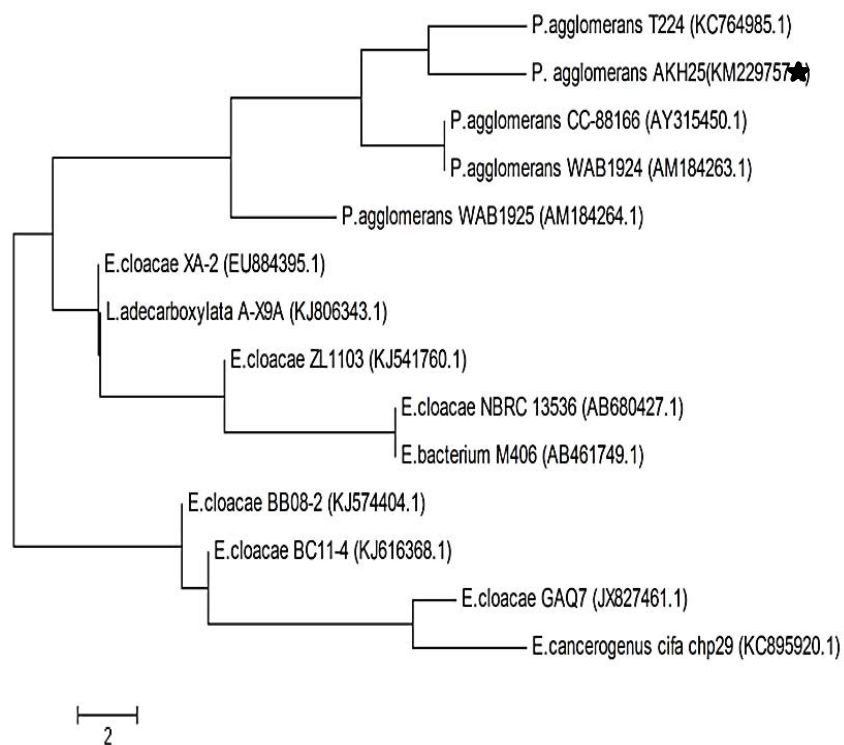
No.	Strain	AC. Number	Reference	Identify (%)
1	<i>Pantoea agglomerans</i> AKH25	KM229757	This study	
2	<i>Pantoea agglomerans</i> T224	KC764985.1	You, C, and et al. 2013.	99
3	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB1924	AM184263.1	Abraham, WR, and et al. 2006.	99
4	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB1925	AM184264.1	Abraham, WR, and et al. 2006.	99
5	<i>Pantoea agglomerans</i> CC-88166	AY315450.1	Young, CC, and et al. 2003.	99
6	<i>Enterobacter cloacae</i> GAQ7	JX827461.1	Avila-Quezada, GD, and et al. 2012.	99
7	<i>Enterobacter cancerogenus</i> cifa chp29	KC895920.1	Tripathy, S, and et al. 2013.	99
8	<i>Enterobacter cloacae</i> BB08-2	KJ574404.1	Nataprawira, S, and et al. 2014.	99
9	<i>Enterobacter cloacae</i> ZL1103	KJ541760.1	Hao, Y, and et al. 2014.	99
10	<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium M406	AB461749.1	Okubo, T, and et al. 2009(17).	99
11	<i>Enterobacter cloacae</i> NBRC13536	AB680427.1	Nakagawa, Y, and et al. 2011.	99
12	<i>Enterobacter cloacae</i> BC11-4	KJ616368.1	Putra, AE, and et al. 2014.	97
13	<i>Enterobacter cloacae</i> XA-2	EU884395.1	Song, L, and et al. 2008.	99
14	<i>Leclercia adecarboxylata</i> A-X9A	KJ806343.1	Liang, J, and et al. 2014.	99

و شناسایی گردید. فنل رد در pH اسیدی زرد رنگ و در pH قلیایی صورتی رنگ می‌شود. آمونیاک، محصول اصلی هیدرولیز ترکیبات نیتریلی است. اگر باکتری قادر به هیدرولیز مالونونیتریل باشد با انجام این فرآیند، آمونیاک در

## بحث

در مطالعه حاضر، سویه باکتریایی پانتوآ آگلومرانس AKH25 با فعالیت قابل توجه تجزیه مالونونیتریل جداسازی

محیط تجمع یافته که منجر به قلبایی شدن و تغییر رنگ معرف فنل رد از زرد به صورتی می‌شود (۲۵).



شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه پانتوا آگلومرانس AKH25 رسم شده به روش neighbour joining و با استفاده از معیار Boot strap.

آمونیاک نیز به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد. پس از گذشت زمان و تجمع آمونیاک اضافی در محیط، به دلیل اثر مهارى بر رشد باکتری، فاز سکون منحنی رشد آغاز و pH محیط با عدم تولید آمونیاک افزایش نیافته و ثابت می‌ماند (۲۵).

بررسی فعالیت آنزیمی باکتری جداسازی شده نیز نشان داد که تجزیه مالونونیتریل از ۳ ساعت پس از انکوباسیون شروع شده و به تدریج افزایش می‌یابد و تا ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون به بیشترین میزان تجزیه می‌رسد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۵ روی نیتریلاز *Pyrococcus abyssii* انجام گردید، مشخص شد که این آنزیم تمایل به هیدرولیز سوبستراهای دی‌نیتریل آلیفاتیک داشته و در میان آنها، مالونونیتریل با مقدار  $K_m$  ۳/۴۸ میلی‌مولار، بهترین

نتایج خاطر نشان می‌سازد که بیشترین میزان قلبایی شدن pH محیط ناشی از آزادسازی آمونیاک، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده می‌شود. علاوه بر این، میزان تغییرات pH محیط با میزان تجزیه مالونونیتریل نیز رابطه مستقیم دارد. سانتاشکومار و همکاران در ۲۰۱۰ گزارش کردند که هیدرولیز استونیتریل موجود در محیط به وسیله باکتری *Paracoccus sp.* SKG موجب تولید آمونیاک و افزایش pH محیط از ۷ به ۹/۲ می‌شود و پس از آن به تدریج کاهش و یا ثابت می‌ماند (۲۲). آنها بر اثرگذار بودن رشد باکتری و ایجاد این تغییرات اشاره کرده و نشان دادند که در فاز نمایی رشد، باکتری با مصرف سوبسترای نیتریلی به تدریج غلظت آن را در محیط کاهش داده و از طرفی میزان آمونیاک و محصول را افزایش می‌دهد. علاوه بر آن، در این مرحله، باکتری از محصول تولیدی حاصل از هیدرولیز و



وانگ و همکاران در ۲۰۱۳ در طی بررسی اختصاصیت سویسترای آنزیم نیتریلاز سویه *Burkholderia cenocepacia* J231 در مقایسه با سویسترای کنترل فنیل-استونیتریل، فعالیت ۱۷ درصدی هیدرولیز مالونونیتریل در کنار هیدرولیز ۷۸ درصدی و ۵ درصدی دی‌نیتریلهای فومارونیتریل و سوکسینونیتریل گزارش دادند (۲۵). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۳ روی فعالیت آنزیمی سویه *Siaobactriabii* PCC6803 انجام شد، فعالیت ۵ درصدی نیتریلاز در حضور سویستراهای دی‌نیتریل به خصوص مالونونیتریل در مقایسه با کنترل بنزونیتریل مشاهده گردید (۱۳). در پایان خاطر نشان می‌سازد، تاکنون از جنس پانتوآ به عنوان باکتری هیدرولیز کننده ترکیبات دی‌نیتریل به ویژه مالونونیتریل گزارشی منتشر نشده است.

### نتیجه‌گیری

با توجه به مصرف روزافزون محصولات مالونونیتریل و مشتقات آن، رهاسازی این ترکیبات در محیط زیست تأثیر منفی بر سلامت انسان و موجودات زنده دارد. تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک راهکار مؤثر در حذف این آلاینده‌ها مطرح می‌باشد. بنابراین پانتوآ *Agromonas* سویه AKH25 می‌تواند برای هیدرولیز مالونونیتریل در مراحل تصفیه فاضلاب شهری و پاکسازی محیط زیست مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

سویسترای هیدرولیزی است. همچنین اثر مهاری این سویسترا در غلظتهای بالاتر از ۱۲ میلی‌مولار نیز مشاهده گردید (۱۸). علی‌رغم پژوهشهای گسترده‌ای که در مورد هیدرولیز ترکیبات مختلف نیتریلی صورت گرفته است، گزارشات معدودی به بررسی هیدرولیز ترکیبات دی‌نیتریلی مانند مالونونیتریل، سوکسینونیتریل، گلوتارونیتریل، آدیپونیتریل و ... به وسیله سویه‌های مختلف باکتریایی منتشر شده است (۲۰). از جمله باکتری‌های تجزیه‌کننده مالونونیتریل می‌توان به *Burkholderia cenocepacia* J2315 و *Rhodococcus rhodochrous* 21197 اشاره نمود (۷).

سویه پانتوآ *Agromonas* AKH25 قادر است پس از ۲۱ ساعت انکوباسون میزان ۷۴ درصد از مالونونیتریل اولیه (۲ میلی‌مولار) را تجزیه کرده و آمونیاک تولید کند. علاوه بر این، در صورتی‌که میزان مالونونیتریل اولیه ۵ میلی‌مولار باشد این سویه قادر است در همین شرایط میزان ۶۷ درصد آن را تجزیه کند. کمتر شدن درصد تجزیه احتمالاً به خاطر سمی بودن ترکیب و ممانعت از رشد بیشتر باکتری می‌باشد (۲۵). گاوگان و همکاران در ۱۹۹۹، جداسازی باکتری گرم منفی *Acidovorax facilis* 72W با توانایی طیف گسترده هیدرولیز دی‌نیتریلهای از جمله مالونونیتریل را گزارش دادند (۱۱). در این پژوهش، میزان تبدیل سویسترا-ی مالونونیتریل، گلوتارونیتریل و سوکسینونیتریل به ازای میلی‌گرم وزن تر بر حسب میکرومول بر دقیقه بترتیب ۰/۱۴۴، ۰/۰۹ و ۰/۰۸ گزارش شد (۱۱). در میان باکتریهای گرم مثبت، فعالیت هیدرولیزی مالونونیتریل توسط *Bacillus* RAPc8 به میزان ۷ درصد در مقایسه با سویسترای استونیتریل گزارش شد (۲۷).

### منابع

۱- شهباز محمدی، ح. و امیدنی، ا. ۱۳۸۷. جداسازی، غربالگری و تعیین خصوصیات آنزیمی میکروارگانیسم‌های تولید کننده آمینواسید دهیدروژنازها از نمونه‌های خاک ایران. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۱، ص ۹۴-۱۰۴.

۱- شهباز محمدی، ح. و امیدنی، ا. ۱۳۸۷. جداسازی، غربالگری و تعیین خصوصیات آنزیمی میکروارگانیسم‌های تولید کننده

- ۲- مشایخی، ف.، امیدنی‌نیا، ا.، شهباز محمدی، ح.، ابراهیمی‌راد، م.، حسین‌خانی، س. و گره‌گوریان، آ. ۱۳۸۹. تخلیص و بازیافت emergency department personnel from o-chlorobenzylidene malononitrile exposure, 2002. *Ann. Emerg. Med.* 45(6): 655-658.
- 3- Almatawah, Q.A., Cramp, R. and Cowan, D.A. 1999. Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic *Bacillus*. *Extremophiles*. 3(4): 283-289.
- 4- Annadonia, G., Juang, R. and Lee, D. 2002. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas Putida* and activated sludge. *Waste. Management*. 22 (7): 703-710.
- 5- Ballantyne, B. 2006. Medical Management of the Traumatic Consequences of Civil Unrest Incidents. *Toxicol. Rev.* 25(3): 155-197.
- 6- Banerjee, A., Sharma, R. and Banerjee, U.C. 2002. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 (1): 33-44.
- 7- Chen, J., Zheng, R.C., Zheng, Y.G. and Shen, Y.C. 2009. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides. *Biotechnol. In. China*. 133(1): 33-77.
- 8- Fang, S., An, X., Liu, H., Cheng, Y., Hou, N., Feng, L. and Li, C. 2015. Enzymatic degradation of aliphatic nitriles by *Rhodococcus rhodochrous* BX2, a versatile nitrile-degrading bacterium. *Bioresour. Technol.* 185(1): 28-34.
- 9- Fawcett, J.K. and Scott, J.E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13 (2): 156-159.
- 10- Fraunfelde, F. T. 2000. Is CS gas dangerous? *B. M. J.* 320 (7233): 458-459.
- 11- Gavagan, J.E., DiCosimo, R., Eisenberg, A., Fager, S.K., Folsom, P.W. and Hann, E.C. 1999. A Gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic nitriles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (5): 654-659.
- 12- Hart, J. 2009. Background to selected environmental and human health effects of chemical warfare agents. In *Environmental Consequences of War and Aftermath*. Springer Berlin Heidelberg. 1-19.
- 13- Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R. and Stolz, A. 2003. Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8): 4359-4366.
- 14- Horton, D.K., Burgess, P., Rossiter, S. and Kaye, W.E. 2005. Secondary contamination of emergency department personnel from o-chlorobenzylidene malononitrile exposure, 2002. *Ann. Emerg. Med.* 45(6): 655-658.
- 15- Javed, A. 2001. Chemical weapons and the Iran-Iraq war: A case study in noncompliance. *N. P. R.* 8 (1): 43-58.
- 16- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M. and Na, H. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (3): 716- 721.
- 17- Leavesley, H.B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L. and Isom, G.E. 2008. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol. Sci.* 101 (1): 101-111.
- 18- Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C.E., Boutou, E., Trauthwein, H. and Verseck, S. 2006. Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein. Express. Purif.* 47 (2): 672-681.
- 19- Okubo, T., Ikeda, S., Kaneko, T., Eda, S., Mitsui, H., Sato, S., and et al. 2009. Nodulation-dependent communities of culturable bacterial endophytes from stems of field-grown soybeans. *Microbes. Environ.* 24 (3): 253-258.
- 20- O'Reilly, C. and Turner, P.D. 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes—a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* 95 (6): 1161-1174.
- 21- Pereira, R.A., Graham, D., Rainey, F.A. and Cowan, D.A. 1998. A novel thermostable nitrile hydratase. *Extremophiles*. 2 (3): 347-357.
- 22- Santoshkumar, M., Anand, S., Nayak, O., Timmanagouda, A. and Karegoudar, B. 2010. A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 3(7): 111-115.
- 23- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409 (6817): 258-268.
- 24- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24(8): 1596-99.

- 25- Wang, H., Sun, H. and Wei, D. 2013. Discovery and characterization of a highly efficient enantioselective mandelonitrile hydrolase from *Burkholderia cenocepacia* J2315 by phylogeny-based enzymatic substrate specificity prediction. BMC. biotechnol. 13(1): 14-25.
- 26- Zhou, Z., Hashimoto, Y. and Kobayashi, M. 2005. Nitrile degradation by *Rhodococcus*: useful microbial metabolism for industrial production. Actinomycetologica. 19 (1): 18-26.
- 27- Zhu, D., Mukherjee, C., Yang, Y., Rios, B.E., Gallagher, D.T., Smith, N.N. and Hua, L. 2008. A new nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110: Gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity. J. biotechnol. 133(3): 327-333.

## Identification and introducing of an Iranian *Pantoea agglomerans* strain AKH25 by 16S rRNA sequence and investigation of its capacity to malononitrile degradation

Ramezani-pour N., Badoei-Dalfard A., Karami Z. and Namaki-Shoushtari A.H.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

Malononitrile,  $\text{CH}_2(\text{CN})_2$  is an aliphatic dinitrile, which uses in the production of herbicides, anti-cancer drugs and dyes. In the present study, malononitrile hydrolyzing bacteria screened from sewage with using MM1 media containing 1 % malononitrile. This strain was identified with biochemical and molecular methods. At first, malononitrile hydrolyzing activity of this strain determined with colorimetric method. The isolate AKH25, with high enzyme activity was selected and 16S rRNA gene was amplified and sequenced by PCR method and designed primers. Comparison of 16S rRNA gene of AKH25 (KM229757) with the other deposited 16S rRNA genes in NCBI showed that this strain is *Pantoea agglomerans* from *Enterobacteriaceae* family. In another study, the bacterial growth curve and ammonia liberated in the presence of different malononitrile concentration was considered. Results showed that, the highest malononitrile decomposition value was detected as releasing of 1.48 and 3.33 mM ammonia from 2.0 and 5.0 mM malononitrile, after 21 h of incubation during the stationary phase, respectively. According to this research, the Iranian *Pantoea agglomerans* strain AKH25 can be used as a suitable candidate for removing malononitrile from contaminated environments.

**Key words:** Isolation, Malononitrile, *pantoea agglomerans*, di-nitrile