بررسی تجزیه زیستی سیانید توسط آنزیم نیتریلاز ترشحی از قارچ پنی‌سیلیوم

مهدیه شهابی‌نژاد[1*]، محمدرضا زمانی[2]، فاطمه حیدریان[1] و علی‌رضا منصوریان[3]

[1] **ایران، میمه، موسسه آموزش عالی نوردانش، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[2] **ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری مولکولی گیاهی**

[3] **ایران، تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

سیانید ترکیبی سمی و بسیار کشنده است که آثار مخربی بر محیط زیست زیست و سلامت انسان می‌گذارد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی جهت حذف آلودگی برای مساحت‌های بالا، پر هزینه هستند. این مهم منجر به درک کامل‌تر از توان ریزموجودات از جمله قارچ‌ها در پالایش مؤثر و اقتصادی خاک و آب آلوده شده‌است. در مطالعه حاضر به صورت تصادفی از پساب معدن طلا نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در محیط‌کشت PDA کشت داده‌شد و و سپس برای سنجش توان قارچ‌ها در تجزیه سیانید، از روش اندازه‌گیری پیکریک‌اسید استفاده شد. در این پژوهش همچنین به بررسی میزان فعالیت ویژه آنزیم تجزیه‌کننده سیانید به نام نیتریلاز در غلظت‌های ۰، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار سیانید، در محیط‌کشت قارچ پنی‌سیلیوم پرداخته‌شد. بنزونیتریل در حضور آنزیم نیتریلاز تولید بنزوئیک‌اسید و آمونیاک می‌کند. جهت تعیین فعالیت آنزیم نیتریلاز میزانمیزان تولید بنزوئیک‌اسید در ۲۳۸ نانومتر ارزیابی ارزیابی‌شد. با کمک منحنی استاندارد بدست‌آمده از جذب بنزوئیک‌اسید، فعالیت آنزیم نیتریلاز بدست‌آمد. به‌منظور بررسی سطح معناداری داده‌ها از آزمون‌های آماری ANOVA و t-test استفاده شد. نتایج حاکی از افزایش میزان فعالیت ویژه این آنزیم همگام با افزایش غلظت سیانید به محیط‌کشت است، به‌نحوی که از غلظت ۰ تا ۱۰ میلی‌مولار سیانید، فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز ۲۶ درصد افزایش یافته‌است. همچنین در محیط‌کشت قارچ حاوی غلظت‌های مختلف سیانید، غلظت سیانید باقی مانده ۵۲ درصد کاهش یافته است. نتایج بیانگر آن است که قارچ پنی سیلیوم تا غلظت ۱۰ میلی مولار توانائی تجزیه سیانید را به خوبی داشته و مقاومت بالائی از خود نشان می دهد و همچنین اضافه کردن سیانید به محیط‌کشت دارای اثر القایی است و فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده را افزایش می دهد و متقابلاً همراه با بالا رفتن فعالیت آنزیم، میزان تجزیه سیانید نیز افزایش‌یافته‌است.

واژه های کلیدی: تجزیه زیستی، سیانید، آنزیم نیتریلاز، قارچ پنی‌سیلیوم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۰۹۹۴۵۵ ، پست الکترونیکی: Mahdiyeh.shahabi@gmail.com

مقدمه

ترکیبات سیانید به طور گسترده‌ای در روی کره زمین منتشر شده است (۸). در اثر در اثر فعالیت‌های صنعتی، ترکیبات آلوده به سیانید از قبیل هیدروژن سیانید، تیوسیانات (SCN^-) و سیانات CNO^-) به عنوان پساب‌های صنعتی به محیط‌زیست تخلیه می‌شوند. سیانید به‌طور طبیعی نیز توسط بسیاری از موجودات تولید می‌شود. گیاهان یک منبع شناخته‌شده از تولید سیانید هستند. سیانید در گیاهان به عنوان یک مکانیسم دفاعی است. بندپایان، باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز می‌توانند سیانید را تولید کنند. سیانید به میزان زیادی در کشاورزی به‌دلیل استفاده از آفت‌کش‌های نیتریل تولید می‌شود. سیانید به منظور استخراج طلا از سنگ معدن در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیانید با فلزات سنگین مانند طلا مجتمع می‌شود و آن‌ها را حل

می‌کند و امکان شسته‌شدن طلا از سنگ معدن را ایجاد می‌کند (۶ و ۱۱).

سیانید مولکولی است که در سنتز پروبیوتیک ترکیبات نیتروژن دار مختلف از قبیل آمینواسیدها و بازهای نیتروژن دار شرکت می‌کند (۲۱). سیانید دارای یک الگوی شیمیایی است که در آن یک گروه سیانو(C≡N) وجود دارد (۱۵ و ۱۶). سیانید به دو صورت معدنی (HCN) و آلی یا نیتریل (RCN) تولید می‌شود (۱۴).

سیانید فعالیت ATP سنتتاز را در میتوکندری متوقف می‌کند و به سرعت تنفس کاهش می یابد؛ اما گیاهان و موجودات مختلفی وجود دارند که به سیانید مقاوم هستند چون مسیرهای متناوب تولید ATP را توسعه داده‌اند. با وجود سیانید انتقال الکترون به اتم اکسیژن توسط مسیر آلترناتیو (AOX) انجام می‌گیرد (۱۰). زیست پالایی استفاده از ریزموجودات در حضور شرایط محیطی مطلوب و مواد مغذی کافی به‌منظور تجزیه مواد آلوده است (۴). با وجود سمیّتی که سیانید دارد؛ طیف وسیعی از ریز-موجودات شناخته‌شده‌اند که آن را تجزیه یا مصرف می‌کنند (۱۲).

تولید سیانید هیدروژن بوسیله ریزموجودات بوسیله Von loseoke در ۱۸۷۱ نمایش داده‌شد، زمانی که او آن‌را در *Marasmius oreades* مشاهده کرد.

Locquin در سال ۱۹۸۹ بیان نموده که ۳۰۰ گونه بازیدیومیست از ۵۲ جنس و چندین آسکومیست وجود دارند که تولید سیانید می‌کنند. فعالیت آنتی‌بیوتیکی چندین قارچ سیانوژن علیه دیگر قارچ‌ها و باکتری‌ها مرتبط با تولید سیانید آن‌هاست و سیانید توسط *Fomes scutelatus* تولید شده‌است که از رویش دانه‌های کاهو و رشد جوانه جلوگیری می‌کند (۱).

مغانلو و همکاران (۱۳۹۱) به این نتیجه رسیدند که افزایش ریزموجودات همزیست با گیاهان میزان توانایی تجزیه آلاینده‌ها توسط گیاهان را افزایش می‌دهد. بیشترین میزان تجزیه آلاینده‌ها با مقدار ۸۵ درصد، با تیمار قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر مشاهده شده‌است.

روش‌های فیزیکی و شیمیایی جهت حذف آلودگی از مناطق با وسعت نسبتاً کم کاربرد دارند و برای مساحت-های زیاد نظیر خاک‌های آلوده به مواد صنعتی، مواد نفتی، محل‌های معدنکاری و نظایر آن بسیار پرهزینه هستند. کشورهای صنعتی در تلاش برای دستیابی به فن‌آوری‌های پالایش ارزان و کارآمد، پیشگام و پیشتاز هستند که این نشانی از درک صحیح از اهمیت مسایل زیست‌محیطی و تلاش آگاهانهٔ آن‌ها در برخورد با معضلات زیست‌محیطی می‌باشد. مجموعه این تلاش‌ها به درک کامل‌تر از توان میکروارگانیسم‌ها در پالایش مؤثر و اقتصادی خاک و آب آلوده انجامیده است (۴).

زمانی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه‌ای نشان دادند که حضور مواد آلاینده در خاک سبب کاهش رشد و توسعه ریشه در خاک و نیز کاهش عملکرد اندام هوایی گیاه ذرت گردید و حضور قارچ اندوفایت در گیاه ذرت ضمن افزایش رشد ریشه‌ها در خاک سبب افزایش ریشه‌های فرعی در مناطق آلوده به مواد نفتی نیز گردید. حضور قارچ *Piriformospora indica* در گیاه سبب کاهش بیشتر کل مواد نفتی در ریزوسفر نسبت به گیاهان بدون قارچ شده-بود.

آلماگرو و همکاران (۲۰۱۱) برای حذف سیانید، از روش-های شیمیایی استفاده می‌شود که این روش‌ها بسیار پرهزینه بوده و از طرفی محصولات جانبی خطرناک دیگری را تولید می‌کنند. در مقابل، حذف سیانید به روش زیستی، کم هزینه‌تر و بدون خطر است.

نولز (۱۹۹۸) در پژوهشی بیان کرد Marasmus Ordeades و بازیدیومسیت کپک برفی از طریق هیدرلیز سیانید به فرمامید با استفاده از آنزیم سیانید هیدراتاز، به‌عنوان تجزیه‌کننده سیانید شناخته‌شده‌اند .

ریناگلوا (۲۰۱۴) سیانید هیدراتاز (CHTS) هیدروژن سیانیدی که از گلیکوزیدهای سیانوژنیک آزاد می‌شود را سم‌زدایی می‌کنند، سیانید هیدراتاز اولین¬بار در قارچ‌های پاتوژن گیاه (*Stemphylume loti Leptopheria maculuns, Gloeocercospora sorghi, Fusarium geneus*) گزارش شد.

ازی (۲۰۰۵) در پژوهشی اعلام نمود که دو گونه مورد بررسی از *Trichoderma* قادر به تجزیه ترکیبات سیانید هستند. این سویه‌ها از سیانید به عنوان منبع کربن و گلوکز استفاده می‌کنند. همچنین این پژوهش نشان می‌دهد در صورتی که به سوبسترا گلوکز اضافه شود میزان تخریب افزایش می‌یابد.

ازی (۲۰۰۲) در پژوهشی به بررسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده هیدروژن سیانید پرداخته و به این نتیجه رسید که سویه‌های مورد بررسی از قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *T. pseudokoningi* با کمک دو آنزیم سیانید هیدراتاز و ردوناز قادر به تجزیه سیانید هستند.

پریرا و همکاران (۱۹۹۶) به این نتیجه رسید که از میان ۱۴ قارچ جدا شده از پساب صنعتی آلوده به سیانید یک سویه از *Fusarium oxysporum* قادر به تحمل سیانید در پساب صنعتی و محیط‌کشت حاوی سیانید است و این توانایی به دلیل تبدیل سیانید به فرم¬آمید غیر سمی توسط آنزیم فرم‌آمید هیدرولیاز می‌باشد.

در پژوهشی باسیل و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که قارچ‌هایی مانند *Neurospora crassa* و *Aspergillus nidulans* قادر به تخریب سیانید با کمک سیانید هیدراتاز و نیتریلازها می باشند.*N .crassa* میزان بیشتری از ترکیبات سیانیدی را تخریب می کند و در طیف وسیعی ازPH و دمای بالا پایدار است.

گوپتا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی مکانیزم‌ها و مسیرهای آنزیمی مربوط به پاکسازی سیانید از پساب های صنعتی می‌پردازند و بیان می‌کنند که بسیاری از ریزموجودات با استفاده از سیانید به تولید آلانین، گلوتامیک اسید، آلفاآمینو-بوتیریک اسید و بتا سیانوآلانین می‌پردازند.

ازی و همکاران (۲۰۰۵) در پژوهشی نشان دادند که در محیط آلوده به سیانید در صورتی که دانه نخود و گندم به قارچ *Trichoderma* و *Fusarium* آغشته شده‌باشند، به دلیل افزایش کاتابولیسم سیانید گیاه رشد خوبی دارد.

نولز (۱۹۷۶) بسیاری از قارچ‌هایی که پاتوژن گیاهان سیانوژن هستند، سیانیدهیدراتازی را تولید می‌کنند که توسط سیانید القا می‌شود و به این روش HCN را به فرم-آمید تبدیل می‌کنند.

ریبوک (۱۹۹۲) بیان داشته است که تجزیه سیانید در قارچ‌های پاتوژن گیاهی با آنزیم سیانید هیدراتاز صورت می‌گیرد که فرم‌آمید تولید می‌کند.

مارتینکوا (۲۰۱۶) در پژوهشی به بررسی حذف همزمان فنل و سیانید توسط تیروزیناز و سیانید هیدراتاز در فاضلاب کک پرداخته است و نتایج نشان می‌دهد که ادغام سیانید هیدراتاز و تیروزیناز راه‌های جدیدی را برای اصلاح زیستی فاضلاب‌ها با آلودگی پیچیده فراهم می‌کند.

آنزیم نیتریلاز هیدرولیز نیتریل‌ها به آمونیاک و کربوکسیلیک‌اسید را کاتالیز می‌کنند. نیتریلازها منجر به بیوسنتز پروتئین‌ها و تغییرات پس از ترجمه در گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و برخی پروکاریوت‌ها می‌شوند.

نیتریلاز $R\text{-}CN+H_2O \rightarrow RCONH_2$

نیتریلاز در کل فعالیتش را با طیف وسیعی از سوبستراهای نیتریل نشان می‌دهد، بااین‌وجود CHT و CynD (Cyanide dihydratase) اختصاصیت بالایی برای هیدروژن سیانید نشان می‌دهند؛ اما فعالیت خیلی کمی با نیتریل‌ها بروز می‌دهند. اگرچه آن‌ها به‌عنوان هیدرولیزکننده نیتریل‌ها به اسید مربوطه و آمونیاک شناخته شدند، اما سوبستراهای طبیعی بیشتر نیتریلازها مشخص نشده است (۱۰).

نیتریلازها براساس اختصاصیت سوبسترا به سه دسته تقسیم می‌شوند ۱. نیتریلازهای آروماتیک که از گیاهان جداشده‌اند. ارگانیسم‌هایی از قبیل *Nocardia sp.* و *Fusarium solani* قادر به تجزیه نیتریل‌های آروماتیک، مثل بنزونیتریل هستند. ۲. نیتریلازهایی که نیتریل‌های آروماتیک را تجزیه می‌کنند نمی‌توانند بر روی نیتریل‌های آلیفاتیک تأثیری داشته باشند. *Rhodococcus rhodochrous K22* از نیتریل‌های آلیفاتیک مثل آکریلونیتریل، به‌عنوان سوبسترای اختصاصی استفاده می‌کند ۳. نوع جدیدی از نیتریلاز میکروبی که در *آلکالیژنز فکالیس JM3* (*Alcaligenes faecalis JM3*) وجود دارد که به‌عنوان آریل استونیتریلاز (arylacetonitrilase) طبقه‌بندی‌شده است (۲، ۶). مکانیسم عمل آنزیم نیتریلاز به این صورت است که توسط گروه تیول یک حمله نوکلئوفیلی به کربن نیتریل صورت می‌گیرد. مراحل بعدی حمله توسط دو مولکول آب و پروتونه‌کردن اتم نیتروژن است که به فرم آمونیاک تبدیل شده‌است (۱۰).

با توجه به خطرات و معایب سیانید برای سلامت انسان و محیط‌زیست و با در نظر گرفتن نتایج مطالعات صورت گرفته در رابطه با زیست پالایی می‌توان به این نتیجه رسید که استفاده از موجودات زنده یکی از فناوری های پیشرفته در این زمینه است که می‌تواند با هزینه کمتر (در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی)، در مقیاس وسیع‌تر و اثر-بخشی بالاتر به کمک جوامع بشری آمده و این مشکل بزرگ را رفع نماید. با توجه به اهمیت تجزیه سیانید توسط ریزموجودات و نقش کلیدی آنزیم نیتریلاز در فرایند تجزیه سیانید در قارچ‌ها، هدف اصلی این تحقیق بررسی میزان فعالیت این آنزیم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سیانید و اندازه‌گیری میزان تجزیه سیانید است. این پژوهش به بررسی تجزیه زیستی سیانید توسط آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم پرداخته‌است تا راهکار مناسب به منظور تجزیه زیستی آلاینده‌های زیست محیطی صنایع مختلف از جمله معدن طلا را ارائه دهد.

مواد و روشها

در این پژوهش به بررسی میزان تجزیه سیانید آزاد توسط قارچ پنی‌سیلیوم پرداخته‌شد. ابتدا قارچ در محیط‌کشت مایع در غلظت‌های مختلف سیانید (۲، ۵ و ۱۰ میلی-مولار)کشت داده‌شد. بعد از گذشت هفت روز محیط‌کشت را با کاغذ صافی فیلتر کرده و قارچ در درون فویل پیچیده و در آون به‌منظور بررسی وزن خشک در دمای ۶۰ درجه قرار داده شد. بعد از گذشت ۴۸ الی ۷۲ ساعت وزن خشک قارچ اندازه‌گیری شد. از محلول زیری نیز به‌منظور تعیین میزان سیانید باقی‌مانده در محیط‌کشت قارچ، از طریق رنگ‌سنجی پیکریک‌اسید استفاده شد. در این روش از پیکریک‌اسید ۰/۵ درصد و سدیم‌کربنات ۵۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. برای اندازه‌گیری سیانید محیط‌کشت در یک واکنش ۱۸۰ میکرولیتری، ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت حاوی سیانید که در آن قارچ رشد کرده‌است به همراه ۸۰ میکرولیتر پیکریک‌اسید اضافه شد. به‌عنوان نمونه‌ی شاهد از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۸۰ میکرولیتر پیکریک‌اسید استفاده‌شد. بعد از تغییر رنگ جذب آن در ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان سیانید مصرفی توسط قارچ از طریق اندازه‌گیری اختلاف جذب بین کنترل منفی و محیط‌کشت قارچ تعیین شد (۳، ۱۸).

محیط‌کشت جامد **PDA=** Potato dextrose agar : مقدار مورد نیاز از پودر پوتیتو دکستروز آگار به مقدار آب مقطر مورد نیاز اضافه‌شد. سپس به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای $121\ ^{\circ}C$ اتوکلاو گردید. بعد از اینکه دمای آن به ۵۰ تا $60\ ^{\circ}C$ کاهش یافت به پلیت‌های یک‌بار مصرف ریخته-شد. پس از منعقد شدن محیط‌کشت، آن‌ها به یخچال با دمای $4^{\circ}C$ منتقل گردیدند(۲).

محیط‌کشت مایع **PD=** Potato dextrose : به‌منظور تهیه محیط‌کشت PD می‌توان سیب‌زمینی قطعه قطعه شده را در آب‌مقطر پخته و به‌صورت یک سوسپانسیون نسبتا غلیظ درآورد. سپس مایع صاف شده سیب‌زمینی را به یک ارلن

منتقل نموده و به میزان لازم قند دکستروز را به آن افزوده و با افزودن مجدد آب‌مقطر، حجم را به یک لیتر رسانیده و با کمک اتوکلاو محلول تهیه شده استریل می‌شود(۲).

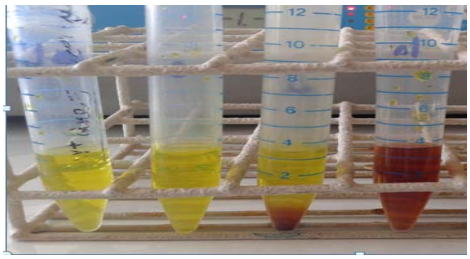
جهت تعیین فعالیت آنزیم نیتریلاز از جذب ببنزوئیک اسید در ۲۳۸ نانومتر استفاده گردید. در این روش ۱۵ میکرولیتر از بنزونیتریل ۱۰ میلی‌مولار در متانول، ۲۵۰ میکرولیتر بافر بافر Tris/ Hcl ۵۰ میلی‌مولار با ۸ = ppH، به همراه ۵ میکرولیتر از آنزیم ترشحی در محیط‌کشت در ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده‌شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه واکنش با ۳۰ میکرولیتر HCl ۱ مولار متوقف می‌شود و جذب در ۲۳۸ نانومتر خوانده‌شد (۲۲). بنزونیتریل در حضور آنزیم نیتریلاز تولید بنزوئیک‌اسید و آمونیاک می‌کند (۱۷). با کمک منحنی استاندارد بدست‌آمده از جذب بنزوئیک‌اسید، فعالیت آنزیم نیتریلاز بدست‌آمد. در این پژوهش یک یونیت (Unit) آنزیم برابر است با مقدار آنزیمی که یک میکرومول محصول در دقیقه ایجاد کند.

همچنین به منظور محاسبه فعالیت ویژه آنزیم از طریق روش برادفورد غلظت آنزیم ترشحی در محیط‌کشتغلظت پروتئین اندازه گیری و و فعالیت ویژه آنزیم ترشحی در محیط‌کشت از رابطه زیر بدست‌آمد:

$$\text{فعالیت ویژه} = \frac{\text{Unit}}{\text{غلظت پروتئین}}$$

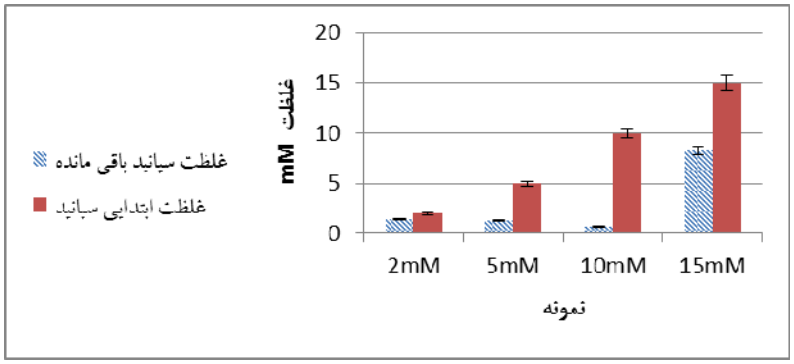
نتایج

در حضور سیانید، پیکریک‌اسید به ایزوپروپیک اسید تبدیل‌شده و شدت رنگ رابطه مستقیم با غلظت سیانید آزاد دارد. پس از گذشت هفت روز از کشت قارچ در غلظت‌های مختلف سیانید (۰، ۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار) نتایج رنگ سنجی پیکریک‌اسید که در شکل ۱ نشان داده شده است بیانگر آن است که با افزایش غلظت سیانید طیفی از رنگ پرتقالی روشن تا تیره ایجاد شده‌است.



شکل ۱- تغییر در شدت رنگ محیط‌کشت قارچ حاوی سیانید

در شکل ۱غلظت سیانید باقی‌مانده در محیط‌کشت قارچ، با غلظت اولیه سیانید که بترتیب ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار می‌باشد مقایسه شده‌است.



شکل ۲- غلظت ابتدایی سیانید و غلظت سیانید باقی‌مانده در محیط‌کشت قارچ

همان‌طور که شکل ۲نشان می‌دهد با افزایش غلظت سیانید تا ۱۰ میلی‌مولار توان تجزیه سیانید توسط قارچ نیز بالا می‌رود، اما در غلظت ۱۵ میلی‌مولار توان تجزیه سیانید کاهش یافته‌است.

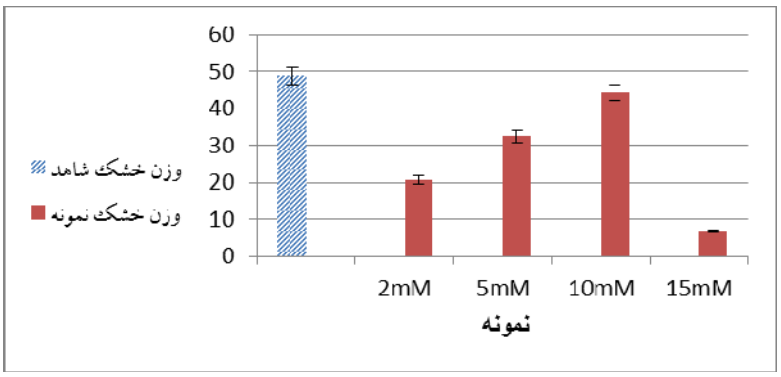
بمنظور بررسی وجود تفاوت معنادار بین داده‌ها از آزمون آماری تی‌تست استفاده‌شد.

جدول ۱- آزمون t-test در غلظت‌های مختلف سیانید در قارچ پنی‌سیلیوم

	میانگین	انحراف معیار	انحراف از میانگین	95% confidence interval of the difference		T	درجه آزادی	Sig(2- tailed)
				کمترین	بیشترین			
غلظت ۲ mM	۰/۵۹ mM	۰/۱۶۴	۰/۰۹۴	۰/۱۸	۱	۶/۲۳	۲	۰/۰۲۵
غلظت ۵ mM	۳/۶۸ mM	۰/۱۱۹	۰/۰۶۸	۳/۳۸	۳/۹۸	۵۳/۴۳	۲	۰/۰۰۰
غلظت ۱۰ mM	۹/۲۶ mM	۰/۱۲۲	۰/۰۷	۸/۹۵	۹/۵۶	/۷۶	۲	۰/۰۰۰
غلظت ۱۵ mM	۶/۶۸ mM	۰/۲۱	۰/۱۲۳	۶/۱۵۳	۷/۲۱	۵۴/۰۵	۲	۰/۰۰۰

نتایج آزمون تی‌تست نیز حاکی از وجود اختلاف معنادار بین غلظت اولیه اولیه سیانید و غلظت سیانید باقی‌مانده در محیط‌کشت قارچ می‌باشد.

در مرحله بعد وزن خشک قارچ مطابق آنچه در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، بدست‌آمد.



شکل ۳- مقایسه وزن خشک قارچ در غلظت‌های ۲، ۵ ، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار و وزن خشک شاهد

شکل ۳ نیز نشان می‌دهد که در اثر اضافه شدن سیانید به محیط‌کشت قارچ، رشد قارچ متوقف نشده‌است و قارچ از طریق تجزیه سیانید توانسته‌است منابع غذایی را در اختیار خود قرار داده و رشد کند و تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار وزن قارچ زیادتر شده‌است، یعنی منابع غذایی زیادتری در اختیار قارچ بوده‌است. اما در غلظت ۱۵ میلی‌مولار رشد قارچ کاهش یافته‌است، ولی با این وجود این قارچ توانسته در این غلظت نیز زنده بماند و از بین نرفته‌است.

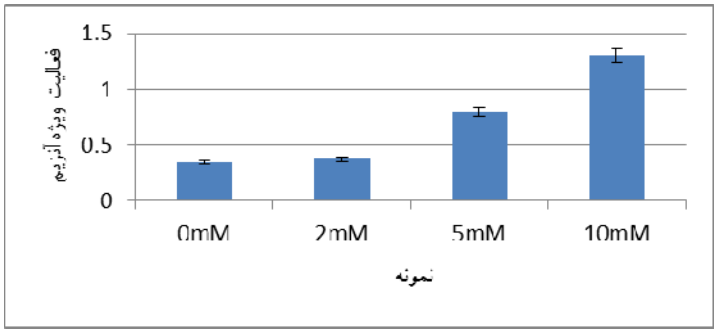
جدول ۲- آزمون t-test مربوط به وزن خشک قارچ پنی‌سیلیوم در غلظت‌های مختلف

	میانگین	انحراف معیار	انحراف از میانگین	95% confidence interval of the difference		T	درجه آزادی	Sig(2- tailed)
				کمترین	بیشترین			
وزن شاهد در غلظت ۲mM	۰/۰۲۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۶۶	۰/۰۲۵	۰/۰۳۱	۴۳	۲	۰/۰۰۱
وزن شاهد در غلظت ۵ mM	۰/۰۱۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۸	۰/۰۲۵	۸/۱۶	۲	۰/۰۱۵
وزن شاهد در غلظت ۱۰ mM	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۸	۲۰	۲	۰/۰۰۲
وزن شاهد در غلظت ۱۵ mM	۰/۰۴۲	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰۴۱	۰/۰۴۴	۱۲۸	۲	۰/۰۰۰

نتایج جدول ۲ نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار بین وزن خشک شاهد و نمونه‌ها در غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار می‌باشد.

بنزونیتریل در حضور آنزیم نیتریلاز تولید بنزوئیک اسید و آمونیاک می‌کند. با کمک منحنی استاندارد بدست آمده از جذب بنزوئیک اسید، فعالیت آنزیم نیتریلاز بدست‌آمد.

در رابطه با فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم نیز، فعالیت ویژه در غلظت‌های مختلف سیانید مطابق شکل ۴ می‌باشد.



شکل ۴- فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در غلظت‌های مختلف سیانید در قارچ پنی‌سیلیوم

همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد همراه با افزایش غلظت سیانید فعالیت آنزیم نیتریلاز هم بالا می‌رود. در رابطه با فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم نیز، فعالیت ویژه در غلظتهای مختلف سیانید مطابق جدول ۳ می باشد.

جدول ۳ بیانگر آن است که با افزایش غلظت سیانید، فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافته‌است.

جدول ۳- فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در غلظت‌های مختلف سیانید در قارچ پنی‌سیلیوم

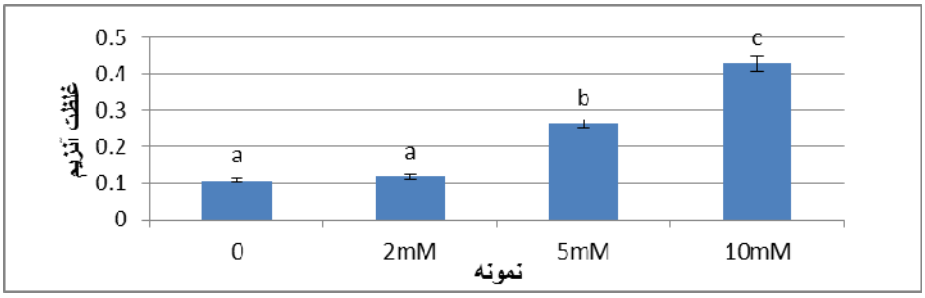
فعالیت ویژه آنزیم	غلظت سیانید
۰/۳۴۲	۰
۰/۳۷۲	۲mM
۰/۷۹۷	۵mM
۱/۳۰۱	۱۰mM

جدول ۴- تحلیل واریانس غلظت آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم

	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	Sig
بین گروهی	۰/۲۰۸	۳	۰/۰۶۹	۱۶۹/۸	۰/۰۰۰
درون گروهی	۰/۰۰۳	۸	۰/۰۰۰		
کل	۰/۲۱۲	۱۱			

تحلیل واریانس غلظت آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم نشان‌دهنده معنادار بودن آزمون است. در واقع در مقایسه بین میانگین گروه‌های مختلف تفاوت معنادار وجود دارد.

شکل ۵ بیانگر آن است که با افزایش غلظت سیانید، فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافته‌است. نتایج آزمون دانکن نشان می‌دهد که همه‌ی میانگین‌ها به جز در غلظت ۰ و ۲ میلی‌مولار سیانید با هم تفاوت معنادار دارند.



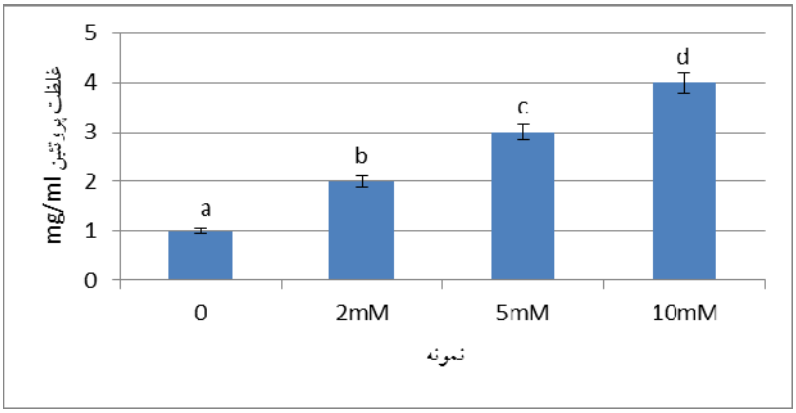
شکل ۵- مقایسات میانگین غلظت آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی‌سیلیوم

جدول ۵- تحلیل واریانس غلظت پروتئین در قارچ پنی‌سیلیوم

	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	Sig
بین گروهی	۰/۰۰۰	۳	۰/۰۰۰	۳۸۹/۵	۰/۰۰۰
درون گروهی	۰/۰۰۰	۸	۰/۰۰۰		
کل	۰/۰۰۰	۱۱			

جدول ۵ تحلیل واریانس قارچ پنی‌سیلیوم نشان‌دهنده معنادار بودن آزمون است.

شکل ۶ بیانگر تفاوت غلظت پروتئین کل در قارچ پنی سیلیوم در غلظت‌های مختلف است که نتایج آزمون دانکن نیز بر روی ستون‌ها به نمایش گذاشته شده‌است.



شکل ۶- مقایسات میانگین غلظت پروتئین در قارچ پنی‌سیلیوم

آنچه ملاحظه می‌شود بیانگر آن است که با افزایش غلظت سیانید در محیط‌کشت قارچ فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز نیز افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان تجزیه سیانید در محیط بالا می‌رود و منابع غذایی لازم برای رشد قارچ در اختیار قارچ قرار داده می‌شود. در غلظت ۱۵ میلی‌مولار که توان قارچ برای تجزیه سیانید کاهش یافته‌است، متقابلاً وزن قارچ نیز کاهش‌یافته و علاوه بر این میزان آنزیم هم کاهش می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده بر تحقیقات گذشته بیانگر آن است که در اکثر این تحقیقات تمرکز اصلی بر روی دو جنس اصلی تریکودرما و فوزاریوم و گونه‌های مختلف این دو جنس برای تجزیه سیانید و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

نیتریلاز انجام گرفته و در تحقیقات معدودی به فعالیت تجزیه سیانید توسط قارچ پنی‌سیلیوم اشاره گردیده‌است که می توان به دو تحقیق زیر اشاره نمود.

بارکلی و همکاران (۱۹۹۸) به این نتیجه رسیدند که *Fusarium solani* , *Trichoderma polysporum,Fusarium oxysporum, Scytalidium thermophilum, Penicillium miczynski* قادر به رشد در محیط کشت با وجود هگزا سیانو فرات [K4Fe(CN)6] به عنوان تنها منبع نیتروژن تحت شرایط اسیدی هستند. رشد با حذف تدریجی سیانید از مایع‌رویی کشت همراه بود، پس از پایان رشد، حداقل ۵۰٪ از سیانید کل کاهش یافته‌است.

اوزل و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهشی به بررسی برخی ویژگی‌های مربوط به تخریب زیستی در برخی از سویه‌های بازیدیومیست‌ها شامل *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllumcommune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192),*Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30) و *Ganoderma lucidum* (D 33), *Schizophyllum commune* (D 35) پرداخته‌است. از میان آنها *P. arcularius*, *S. commune* و *G. lucidum* نقش بیشتری در تجزیه سیانید داشتند و از بین این سه سویه نیز *P. arcularius* به عنوان بهترین سویه با توجه به شرایط اپتیمم پیشنهاد شده‌است.

نتایج بدست‌آمده از مقالات نشان‌دهنده توانایی بسیاری از قارچ‌ها از جمله*Trichoderma harzianum*، *T pseudokoningi* ، *Fusarium oxysporum* ، *Aspergillus nidulans* ، *Neurospora crassa* و *Penicillium* و غیره برای تجزیه زیستی سیانید است. دیگر تحقیقات انجام گرفته بر روی قارچ‌های دیگر است که مواردی از آنها به شرح زیر می‌باشند:

ازی (۲۰۰۵) در پژوهشی اعلام نمود که دو گونه مورد بررسی از *Trichoderma* قادر به تجزیه ترکیبات سیانید هستند. این سویه‌ها از سیانید به عنوان منبع کربن و گلوکز استفاده می‌کنند (۸). آزمایش‌های انجام‌شده سرعت بالای کاتابولیکی سیانید توسط گونه‌های *Trichoderma* را در مقایسه با گونه‌های *Fusarium* نشان می‌دهد. به‌نظر می‌رسد اگر گلوکز به‌عنوان متابولیت همراه باشد، به‌طور تأثیرگذاری سرعت تجزیه سیانید را از طریق گذر زمان افزایش می‌دهد (۱۳). ازی (۲۰۰۲) در پژوهشی به بررسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده هیدروژن سیانید پرداخته و به این نتیجه رسید که سویه‌های مورد بررسی از قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *T. pseudokoningi* با کمک دو آنزیم سیانید هیدراتاز و رودانس قادر به تجزیه سیانید هستند (۷). پریرا و همکاران (۱۹۹۶) به این نتیجه رسیدند که از میان ۱۴ قارچ جدا شده از پساب صنعتی آلوده به سیانید یک سویه از *Fusarium oxysporum* قادر به تحمل سیانید در پساب صنعتی و محیط‌کشت حاوی سیانید است و این توانایی به دلیل تبدیل سیانید به فرم‌آمید غیرسمی توسط آنزیم فرم‌آمید هیدرولیاز می‌باشد (۱۹). در پژوهشی باسیل و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که قارچ‌هایی مانند *Neurospora crassa* و *Aspergillus nidulans* قادر به تخریب سیانید با کمک سیانید هیدراتاز و نیتریلازها می‌باشند (۶). ازی و لینچ در پژوهشی در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت سیانید در محیط‌کشت قارچ منجر به افزایش وزن خشک قارچ می‌شود (۸). داده‌های حاصل از آزمون تی‌تست در این پژوهش نیز نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین غلظت‌های اولیه و غلظت‌های نهایی سیانید در محیط‌کشت و وزن خشک شاهد و وزن خشک نمونه در غلظت‌های مختلف می‌باشد که بیانگر آن‌است که، همراه با افزایش غلظت سیانید میزان تجزیه سیانید و وزن خشک نمونه بالا رفته‌است.

طبق نتایج مقالات مورد مطالعه و این پژوهش برخی قارچ‌ها قادر به تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده سیانید هستند و از این طریق هم کربن و گلوکز مورد نیاز برای رشد را در اختیار خود قرار می‌دهند و هم به تجزیه‌زیستی سیانید

می‌پردازند. در مطالعه حاضر برای سنجش تجزیه سیانید، از روش اندازه‌گیری پیکریک‌اسید استفاده شد. این روش برای سنجش سیانید آزاد و کمپلکس‌های ضعیف سیانید- فلز مورد استفاده قرار می‌گیرد. که نتایج نشان‌دهنده کاهش ۵۲ درصدی غلظت سیانید در محیط‌کشت حاوی قارچ پنی‌سیلیوم است. در رابطه با فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز نتایج نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین داده‌ها می‌باشد به این معنی که، با افزایش غلظت سیانید، فعالیت ویژه آنزیم نیز افزایش یافته‌است، بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که اضافه کردن سیانید به محیط‌کشت دارای اثر القایی است و فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده را بالا می‌برد و متقابلاً همراه با بالا رفتن فعالیت آنزیم، میزان تجزیه سیانید افزایش‌یافته و در نتیجه منابع کربن و نیتروژن بیشتری در اختیار قارچ قرار گرفته که منجر به رشد بیشتر قارچ شده‌است. بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش، اصلاح زیستی راهکاری موثر و مقرون‌به‌صرفه برای درمان آب‌های آلوده و خاک می‌باشد، که در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی تاثیر کمتری بر محیط می‌گذارد. همچنین با بهبود شرایط محیطی برای فعالیت ریزموجودات، می‌توان میزان تجزیه زیستی توسط آن‌ها را افزایش داد.

منابع

۱. اخوت، س. م و زاد، س. ج. (۱۳۸۴)، قارچ شناسی و بیماری های قارچی گیاهی، ص ۳- ۱۳.

۲. جواهری صفا ، ز. س، امین زاده. م، زمانی و م، مطلبی (۱۳۹۶)، تجزیه زیستی سیانید توسط نیتریلاز: اهمیت نیتریلاز ها به عنوان آنزیم تجزیه کننده سیانید در دو گروه باکتری و قارچ ها ، اولین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران.

۳. محسنی، م. س، فیروزیار و ا، نظری. (۱۳۹۴)، جداسازی و بررسی ویژگی های باسیلوس MF3 تجزیه کننده سیانید در شرایط قلیایی، مجله پژوهش های سلولی و مولکولی(مجله زیست شناسی ایران) ، جلد ۲۸، شماره ۳.

4. Adams, G. P, Fufeyin. S, Okoro and I, Ehinomen. (2015)," Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmention: A Review", International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, Vol. 3, No. 1, 28-39.

5. Barclay, M. A, Hart. CH, Knowles. J, Meeussen and V, Tetdl. (1998), "Metabolism and enzymology of cyanide/ metallocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions", Enzyme and microbial technology, 23(5): 321-330.

6. Basile, L. J. (2008), "Cyanide-degrading enzymes for bioremediation", Texas A&M University.

7. Ezzi, M. I and J. M, Lynch. (2002), "Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp*", Enzyme and microbial technology, 31(7): 1042-1047.

8. Ezzi, M. I and J. M, Lynch. (2005), "Biodegradation of cyanide by *Trichoderma spp*. and *Fusarium spp*", Enzyme and microbial technology, 36(7): 849-854.

9. Fernandez.R, Dolghih. E, Kunz. D, (2004), "Enzymatic Assimilation of Cyanide via Pterin-Dependent Oxygenolytic Cleavage to Ammonia and Formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764", Applled and environmental microbiology,p p. 121–128.

10. Gupta, N. CH, Balomajumder and V, Agarwal. (2010), "Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review", Journal of hazardous materials, 176(1): 1-13.

11. Igeño,M.(2007), Biodegradation of cyanide-containing wastes by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344,2007, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. P.100-108.

12. Knowles, C. J. (1988), "Cyanide utilization and degradation by microorganisms.", Cyanide compounds in biology, 140: 3-15.

13. Kitleartpornpairoat , R and S, Potivichayanon. (2010), "Biodegradation of Cyanide by a Novel Cyanide- degrading Bacterium", 4 2010-06-20.

14. Kobayashi, M and S, Shimizu. (2000), "Nitrile hydrolases", Curr Opin Chem Biol ,4:95-102.

15. Luque- Almagro, V. M. F, Mercha´n. R, Blasco. M, Igen˜o. M, Martı´nez-Luque. C, Moreno-

Vivia´n. F, Castillo and M, Rolda´n. (2011), "Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344* involves a malate: quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain", Microbiology, 15,739- 746.

16. Luque- Almagro, V. M. R, Blasco. M, Martínez-Luque. C, Moreno-Vivián. F, Castillo and M, Roldán. (2011), "Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344*, a case of an alkaliphilic cyanotroph", Biochemical Society transactions, 39(1): 269-274.

17. Martinkova. L, Vejvoda. V, Kren. V. 2008, " Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism" Journal of Biotechnology 133 , 318–326

18. Özel, Y.S, Gedikli. P, Aytar. A, Ünal. M, Yamaç. A, Çabuk and N, Kolankaya. (2010), "New fungal biomasses for cyanide biodegradation", Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 110, Issue 4, 431– 435.

19. Pereira, P. J, Arrabaqab and M, Amaral-Collaqo. (1996), "Isolation , selection and characterization of a cyanide- degrading fungus from an industrial effluent", International biodeterioration & biodegradation, 37(1): 45-52.

20. Potivichayanon S., and R. Kitleartpornpairoat. (2010), Biodegradation of cyanide by novel cyanide degrading bacterium, World Academy of Science Engineering and Technology, 42, 2010, 1362–1365.

21. Raybuck, S. A. (1992), "Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation", Biodegradation, 3(1): 3-18.

22. Vejvoda. V, Kubaˇca. D, Davidovaa. A, Kaplana.O, ˇSulca,b. M,ˇSvedaa. O, Chaloupkovac. R, Martinkovaa. L. (2010)," Purification and characterization of nitrilase from Fusarium solani IMI196840" Process Biochemistry 45 , 1115– 1120

Investigation of Biodegradation of Cyanide by Secretory Nitrilase Enzyme in *Penicillium*

Shahabi Nejad M.[1], Zamani M.R.[2], Heydarian F.[1] and Mansoorian A.R.[3]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Science, NourDaneh Institute of Higher Education, Meimeh, I.R. of Iran

[2] Plant Genetic Biotechnology Research Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[3] Malek Ashtar University of Technology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The cyanide is a toxic and very lethal compound that has devastating effects on the environment and human health. Physical and chemical methods are very costly to remove contamination in high large areas. This fact leads to understanding of the potential of microorganisms, including fungi, in the effective and economical purification of soil and contaminated water. In this study, a random sample was taken from a gold mining wastewater. Samples were cultured in a PDA medium. Then, to evaluate the ability of fungus to measure the fungal power in cyanide decomposition, Picric acid method was used. Take In this study, the specific activity of the cyanide degrading enzyme called nitrilase in concentrations of 0, 2, 5 and 10 mM cyanide was investigated in Penicillium fungus culture media. To determine the nitrilase activity of the spectrophotometer and to absorb benzoic acid at 238 nm. Benzonitrile produces benzoic acid and ammonia in the presence of nitrilase enzyme. With the help of the standard curve obtained from the absorption of benzoic acid, the activity of the nitrilase enzyme was obtained. To analyze the significance level of data, ANOVA and T. test tests were used. The results indicate an increase in the specific activity of this enzyme in conjunction with an increase in the concentration of cyanide in the culture medium. As a result of a concentration of 0 to 10 mM cyanide, the specific activity of the nitrilase enzyme increased by 26%. Also, in the culture medium containing different concentrations of cyanide, the remaining cyanide concentration decreased by 52%. Therefore, it can be concluded that the addition of cyanide to the induction-induced environmental medium has increased the activity of the degrading enzyme and, together with the increase in enzyme activity, the cyanide decomposition rate is also increased.

Key words: Biodegradation, Cyanide, Nitrilase enzyme, Penicillium mushroom