

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
 سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۸۶-۷۳
 تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

جداسازی و شناسایی سویه‌های سودوموناس تجزیه‌کننده استونیتریل از آب‌انبار گنجعلی خان کرمان

نرجس رضائی‌پور: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، ramezany22@yahoo.com
ارسطو بدویی دلفارذ*: دانشیار بیوشیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، badoei@uk.ac.ir
عبدالحمید نمکی شوشتری: دانشیار ژنتیک، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، genabns2@yahoo.com
زهرا کریمی: استادیار بیوفیزیکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، karami@uk.ac.ir

چکیده

مقدمه: نیتریل‌ها ترکیباتی سمی و بسیار خطرناک برای موجودات زنده هستند که به‌طور گسترده توسط بشر تولید و موجب آلودگی محیط‌زیست می‌شوند. بهترین روش برای تجزیه نیتریل‌های موجود در فاضلاب، تجزیه زیستی است. هدف اصلی پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل از فاضلاب شهری در محل آب‌انبارهای کرمان است.

مواد و روش‌ها: برای غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل از محیط کشت اختصاصی حاوی ۱ درصد استونیتریل به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن استفاده شد. فعالیت آنزیم و تولید آمونیاک در محیط کشت توسط روش فنل-هیپوکلریت سنجیده شد. باکتری‌های جدا شده توسط آزمون‌های بیوشیمیایی-میکروبی و مولکولی شناسایی شدند. بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف کربن، نیتروژن و اسیدیته بررسی و مقدار نیتریل و اسید حاصل توسط کروماتوگرافی گازی تعیین شد.

نتایج: از بین سه جدایه مولد نیتریل هیدرولاز با عنوان FA11، FA8، AB19 جدایه FA8 بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را نشان داد. نتایج آزمون‌های شناسایی جدایه‌ها نشان داد که این باکتری‌ها به جنس سودوموناس تعلق دارند. بررسی مولکولی ژن *16S rRNA* نشان داد که جدایه FA11 و FA8 با سودوموناس *اوتیتیدیس* و جدایه AB19 با سودوموناس *جنیکولاتا* به ترتیب دارای ۹۹ و ۱۰۰ درصد همولوژی هستند. بررسی اثر منابع مختلف بر تولید آنزیم نشان داد که جدایه برتر سودوموناس FA8 با وجود گلوکز و عصاره مخمر در محیط کشت با اسیدیته خنثی دارای بیش‌ترین مقدار تولید آنزیم است. نتایج کروماتوگرافی گازی نشان داد که FA8 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۵۸ درصد استیک‌اسید تولید کرده است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که جدایه برتر FA8، گزینه مناسبی برای تجزیه استونیتریل است که می‌تواند برای تجزیه استونیتریل از پساب صنایع و مکان‌های آلوده، استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: نیتریل، غربال‌گری، نیتریل هیدرولاز، سودوموناس

* نویسنده مسؤل مکاتبات

مقدمه

نیتریل‌ها^۱ از جمله ترکیبات آلی با گروه فعال سیانو هستند که در شکل‌های مختلف طبیعی و مصنوعی به‌طور رو به افزایشی تولید می‌شوند (۱). این ترکیبات به شکل طبیعی در شکل‌هایی از سیانوگلیکوزید^۲، سیانولپید^۳، ایندول^۳-استونیتریل^۴ و بتا-سیانو-ال-آلانین^۵ توسط طیف گسترده‌ای از گیاهان تولید می‌شوند (۲). در این میان سیانوگلیکوزیدها که از محصولات متابولیسم ثانویه گیاهی به شمار می‌آیند در اثر صدمات وارده بر بافت گیاهی به سرعت تجزیه و به محصولاتی مانند: قند، ترکیبات کتون^۶، آلدهید^۷ و همچنین، هیدروژن سیانید^۸ که یک ترکیب فوق‌العاده سمی است تبدیل می‌شوند. از طرف دیگر ترکیبات نیتریلی به‌طور گسترده در شکل محصولات مختلف صنعتی مانند: حلال، پلاستیک، لاستیک‌های سنتزی، علف‌کش و دارو تولید می‌شوند (۳). این نیتریل‌ها به شکل غیر قابل کنترلی از فاضلاب صنایع و پساب کشاورزی وارد محیط زیست شده و به عنوان یک عامل مهم تهدید برای محیط زیست و سلامت موجودات زنده به شمار می‌روند (۴). یکی از مهم‌ترین روش‌های تبدیل و یا حذف نیتریل‌ها، هیدرولیز شیمیایی است که معمولاً در شرایط سخت اسیدی یا بازی و درجه حرارت بالا انجام می‌شود. این روش دارای معایبی از جمله تولید محصولات جانبی نامطلوب و هزینه زیاد است (۵). امروزه استفاده از روش‌های زیستی برای تجزیه آلاینده‌های نیتریلی مورد توجه قرار گرفته است.

نیتریل‌های هیدرولازها^۹، آنزیم‌هایی هستند که هیدرولیز پیوند کربن-نیتروژن غیر پپتیدی ترکیبات نیتریلی را کاتالیز می‌کنند. به‌طور معمول این خانواده بزرگ آنزیمی بر اساس تشابه توالی و فعالیت کاتالیزوری به ۱۳

شاخه تقسیم می‌شوند که در این میان ۳ شاخه نیتریلاز^{۱۰}، نیتریل‌هیدراتاز^{۱۱} و آمیداز^{۱۲} بسیار مطرح هستند. هیدرولیز آنزیمی نیتریل‌ها با دو مسیر آنزیمی متفاوت انجام می‌شود. در مسیر اول یک نیتریلاز (E.C.3.5.5.1) هیدرولیز مستقیم نیتریل‌ها به اسیدهای مربوطه را کاتالیز می‌کند (۳) و در مسیر دیگر نیتریل‌هیدراتاز (E.C.4.2.1.84)، یک نیتریل را به آمیدهای مربوطه تبدیل می‌کند (۶). این آنزیم در باکتری‌ها معمولاً به‌طور همزمان با یک آمیداز بیان می‌شود که آمید تولید شده را با آزادسازی آمونیاک به یک اسید تبدیل می‌کند.

نیتریل‌هیدراتاز به عنوان جزئی از مسیر متابولیکی تجزیه نیتریل در میکروب‌ها برای نخستین بار در تولید نیکوتینامید^{۱۳} و ۵-سیانوالرآمید^{۱۴} شناسایی شد و بیشتر در تولید صنعتی واسطه‌های دارویی و کشاورزی و تولید ۳۰/۰۰۰ تن آکریلامید^{۱۵} در سال نقش دارد (۷). نیتریلاز (نیتریل‌آمینوهیدرولاز^{۱۶}) نخستین آنزیم متابولیزه‌کننده نیتریل‌هاست که در سال ۱۹۶۰ با تخلیص از گیاه جو و باکتری *Sordomonas*^{۱۷} کشف شد (۸ و ۹). نخستین واکنشی که در آن این آنزیم شناسایی شد، تولید ایندول ۳-استیک‌اسید^{۱۸} (اکسین^{۱۹}) از ایندول ۳-استونیتریل در گیاهان بود (۱۰). نیتریلازها آنزیم‌هایی قابل‌القا با یک یا دو زیر واحد در اندازه و تعداد متنوع هستند و به‌طور معمول یک گروه سولفیدریل دارند که برای فعالیت آن‌ها ضروری است.

از جمله کاربردهای صنعتی مهم نیتریلازها علاوه بر شرکت در پاک‌سازی زیستی خاک و آب‌های حاوی ترکیبات سمی نیتریلی می‌توان به مواردی همچون سنتز کربوکسیلیک‌اسیدهای مهم صنعتی، تولید نیکوتینیک‌اسید^{۲۰} (نیاسین^{۲۱}) از ۳-سیانوپیریدین^{۲۲} با

جنوبی) سنتز شد. حلال‌های آلی مورد نیاز نیز از شرکت مرک خریداری شدند.

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل:

نمونه‌برداری از آب‌انبارهای قدیمی شهر کرمان که سطح فاضلاب شهری کرمان بسیار بالا آمده بود، انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه، برای غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل، حجم ۵ میلی‌لیتر از نمونه آب به محیط کشت مایع حداقل نمک‌های معدنی (MM1)^{۳۷} (حاوی: ۶/۸ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات^{۳۸}، ۱/۲ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات^{۳۹}، ۰/۱ گرم سولفات منیزیم^{۴۰}، ۰/۱ گرم سولفات منگنز^{۴۱}، ۰/۱ گرم کلسیم دی‌کلرید^{۴۲}، ۰/۱ گرم سولفات آهن^{۴۳} و ۰/۰۰۶ گرم سدیم مولیبدات^{۴۴} در یک لیتر آب مقطر و یک درصد سوبسترای استونیتریل) افزوده شد (۱۳). محیط کشت به وسیله کلریدریک اسید^{۴۵} و سدیم هیدروکسید^{۴۶} یک مولار، در اسیدیته ۷ تنظیم شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. پس از ۳ کشت متوالی در محیط کشت حداقل نمک‌های معدنی، غنی‌سازی میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده استونیتریل انجام شد. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل ۱۰۰ میکرولیتر از کشت غنی‌شده به محیط کشت جامد حداقل حاوی ۱/۵ درصد آگار^{۴۷} و ۰/۰۲ درصد فنل‌رد^{۴۸} به عنوان شناساگر و ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل، تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از سه دوره کشت از میان سه جدایه با فعالیت تجزیه‌کننده استونیتریل، جدایه FA8 که بیش‌ترین هاله و میزان شدت رنگ در محیط جامد و مایع حاوی سوبسترا و فنل‌رد، پس از ۴۸ ساعت

مصارف کاربردی در پزشکی و تغذیه و تولید تجاری R-ماندلیک‌اسید^{۳۳} از ماندلونیتریل^{۳۴} به عنوان واسطه و عوامل حل‌کننده برای تولید بسیاری از محصولات دارویی و کشاورزی و... اشاره کرد (۱۱). فعالیت تجزیه‌کننده نیتریل‌ها به ندرت در طبیعت دیده می‌شود. میزان کم فعالیت آنزیمی فقط در سه خانواده از ۲۱ خانواده گیاهی و شمار محدودی از جنس‌های قارچی مشاهده شده است. این فعالیت در باکتری‌ها غالب‌تر است. برخی از آن‌ها مانند: اسیتوباکتر^{۳۵}، رودوکوکوس^{۳۶}، کلبسیلا^{۳۷}، سودوموناس، آرتروباکتر^{۳۸}، کورینه‌باکتریوم^{۳۹} و نوکاردیا^{۴۰} می‌توانند از نیتریل‌ها به عنوان منابع نیتروژن و کربن استفاده کنند (۱۲). یکی از مشکلات سال‌های اخیر شهر کرمان بالا آمدن سطح آب‌های زیر زمینی است که متأسفانه باعث آلودگی شدید اماکن و ابنیه تاریخی از جمله آب‌انبارهای قدیمی، توسط فاضلاب شهری و خانگی شده است.

در پژوهش حاضر، سه باکتری مولد نیتریل هیدرولاز با توانایی تجزیه استونیتریل^{۳۱} از آب آلوده آب‌انبارهای قدیمی شهر کرمان جداسازی و توسط روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد و پتانسیل تجزیه استونیتریل جدایه برتر سودوموناس اوتیتیدیس^{۳۲} FA8 در حضور ترکیبات مختلف بررسی و بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: تمامی ترکیبات محیط کشت غربال‌گری از شرکت سیگما آلدریچ^{۳۳} و مرک خریداری شد. مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^{۳۴} از شرکت سیناژن و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک^{۳۵} (آلمان) خریداری شد. همین‌طور پرایمرهای مورد نیاز توسط شرکت بیونیر^{۳۶} (کره

محللول رقیق شده DNA (با رقت ۱۰۰) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رابطه $\text{Conc. DNA } (\mu\text{g/ml}) = 50 \cdot d \cdot A_{260}$ و نسبت A_{260}/A_{280} به ترتیب غلظت DNA و میزان خلوص آن تخمین زده شد. پرایمرها مطابق با پرایمرهای عمومی برای تکثیر ژن *16S rRNA* به شکل زیر با استفاده از نرم‌افزار Gene runner طراحی شدند (۱۵). پرایمر Forward: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCCAG-3' با $T_m = 53.7$ درجه سانتی‌گراد و پرایمر Reverse: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3' با $T_m = 53.4$ °C واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مطابق با برنامه ذیل انجام شد. دمای اولیه برای جداشدن دو رشته DNA، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، طولیل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و مرحله طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۸ دقیقه. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پس از الکتروفورز ژل آگاروز^{۵۶} یک درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص‌سازی شد. سپس، توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA توسط شرکت بیونیر (کره جنوبی) تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن *16S rRNA* جدایه‌های تجزیه‌کننده به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم بانک ژنی^{۵۷} مقایسه شد (۱۶). به این ترتیب نزدیک‌ترین جدایه‌ها با ترادف *16S rRNA* جدایه‌های FA11، FA8 و AB19 تعیین شد. همچنین، توالی‌های به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی مرکز ملی بیوتکنولوژی^{۵۸} ثبت و شماره دستیابی^{۵۹} ژنی مربوطه

انکوباسیون را نشان داد، به عنوان جدایه برتر مولد نیتریل‌هیدرولاز تجزیه‌کننده استونیتریل برای مطالعات آنزیمی انتخاب شد (۱۳).

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌کننده

استونیتریل: شناسایی باکتری‌های جدا شده، بر اساس صفات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی هر یک از جدایه‌ها روی محیط کشت تریپتیکال سوی آگار (TSA^{۴۹}) (مرک، آلمان) بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم^{۵۰}، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آن‌ها مطالعه شد. همچنین، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل: فعالیت کاتالازی، اکسیدازی، مصرف گلوکز از مسیر تخمیر اسیدهای مخلوط (متیل‌رد^{۵۱}) یا مسیر تخمیر بوتانیدیول (ورژ پروسکوئر^{۵۲})، تولید پیگمان، مصرف سیترات، احیای نیترات، هیدرولیز اوره، ژلاتین و کازین، انجام و حرکت باکتری مطابق جداول شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگگی^{۵۳}، بررسی شد (۱۴). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کننده

استونیتریل: به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار^{۵۴} کشت چمنی داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. باکتری‌های رشد یافته به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع‌آوری و سوسپانسیونی از آن‌ها در آب مقطر استریل تهیه شد. با سانتریفیوژ^{۵۵} سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۸۰۰۰g رسوب باکتری به دست آمد. جداسازی DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن انجام شد. به منظور تخمین کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده، جذب

FA8 به مدت ۴۸ ساعت در محیط تولید حداقل نمک‌های معدنی حاوی استونیتریل در حضور منابع مختلف کربن (گلوکز^{۶۷}، مالتوز^{۶۸}، فروکتوز^{۶۹} و نشاسته^{۷۰})، منابع مختلف نیتروژن (پیتون^{۷۱}، عصاره مخمر^{۷۲}) و اسیدیت‌های مختلف (۵، ۶، ۷ و ۸) انکوبه شد. از محیط تولید بدون منابع به عنوان شاهد سنجش استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیمی بر اساس آمونیاک تولیدی طبق روش فنل - هیپوکلریت در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد و میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری شد (۱۹).

بررسی مقدار استیک‌اسید تولیدی توسط جدایه

FA8: ابتدا جدایه FA8 درون ارلن‌های محیط غنی‌سازی حاوی (گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۲ گرم، سدیم کلرید ۱ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم در یک لیتر آب مقطر) و ۲۰ میلی‌مولار استونیتریل، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. پس از آن سلول‌های باکتری توسط سانتریفیوژ برداشته و سوسپانسیونی از آن‌ها در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، اسیدیت ۷/۵ تهیه شد. در مخلوط واکنش، به ۲۰ میلی‌گرم رسوب باکتریایی، استونیتریل ۲۰ میلی‌مولار و بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۶/۵ اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۶۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. ۱۰۰ میکرولیتر نمونه در فواصل معین از مخلوط واکنش برداشته و سپس، سانتریفیوژ شد. سنجش مقدار آمونیاک تولیدی طبق روش یاد شده سنجیده شد. تحلیل مقدار استیک‌اسید تولید شده از فعالیت نیتریل‌هیدرولازی FA8 با تزریق ۵ میکرولیتر محلول رویی حاصل از واکنش مربوطه در بافر فسفات حاوی استونیتریل، به دستگاه کروماتوگرافی

دریافت شد. درخت فیلوژنی توالی جدایه‌ها با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی به کمک نرم‌افزار مگا^{۶۴} با روش neighbour joining رسم شد (۱۷).

سنجش فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیمی جدایه برتر

FA8 بر اساس مقدار آمونیاک تولیدی با استفاده از روش فنل - هیپوکلریت^{۶۱} سنجیده شد (۱۸). به ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی محیط مایع حاوی باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل ۲۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیت 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^{۶۲} ۰/۵۹ - مولار و سدیم‌نیتروپروپوساید^{۶۳} ۱ میلی‌مولار) و ۴۰۰ میکرولیتر محلول B (سدیم‌هیپوکلریت^{۶۴} ۰/۱۱ - مولار و سدیم‌هیدروکسید ۲ مولار) به آن اضافه شد (۱۸). پس از پدیدار شدن رنگ آبی مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^{۶۵} خوانده شد. پس از رسوب دادن باکتری‌ها علاوه بر فعالیت آنزیمی محیط کشت فاقد باکتری، فعالیت آنزیمی عصاره باکتری لیز شده نیز سنجش شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهدی که در آن آنزیم پس از انکوباسیون مخلوط واکنش به آن اضافه شده بود استفاده شد. از این رو، یک واحد فعالیت آنزیم عبارت است از مقدار آنزیمی که قادر است ۱ میکرومول آمونیاک به ازای ۱ دقیقه در شرایط استاندارد واکنش آزاد کند. آزمایشات ۳ بار تکرار و منحنی استاندارد توسط آمونیوم کلراید^{۶۶} رسم شد (۱۱ و ۱۳).

بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع

مختلف: برای بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم، جدایه

انجام و ویژگی‌های میکروبیولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها، بررسی شد (جدول ۱).



شکل ۱- تغییر رنگ محیط مایع حاوی فنل‌رد و استونیتریل از زرد به شکلی توسط جدایه FA8. لوله ۱ (محیط پایه)، لوله ۲ (محیط پایه + فنل‌رد)، لوله ۳ (محیط پایه + سوبسترا + فنل‌رد)، لوله ۴ (محیط پایه + سوبسترا + فنل‌رد + باکتری فاقد فعالیت آنزیمی نیتریل هیدرولاز) و لوله ۵ (محیط پایه + سوبسترا + فنل‌رد + جدایه FA8).

گازی^{۳۳} دارای ستون موئینه^{۳۴} FFAP و شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای^{۳۵} FID در محدوده دمایی ۱۵۰ تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل^{۳۶} در دستگاه استفاده شد (۲۰).

نتایج

غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل:

آب‌انبارهای نمونه‌برداری شده در قسمت مرکزی شهر کرمان و در مجموعه گنجعلی‌خان واقع شده است. پس از بررسی اولیه توانایی جدایه‌ها در تجزیه استونیتریل، جدایه سودوموناس FA8 با ایجاد بیش‌ترین شدت رنگ صورتی در محیط مایع حاوی فنل‌رد برای ادامه مطالعات انتخاب شد (شکل ۱).

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌کننده

استونیتریل: برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل FA8، FA11 و AB19 رنگ‌آمیزی گرم

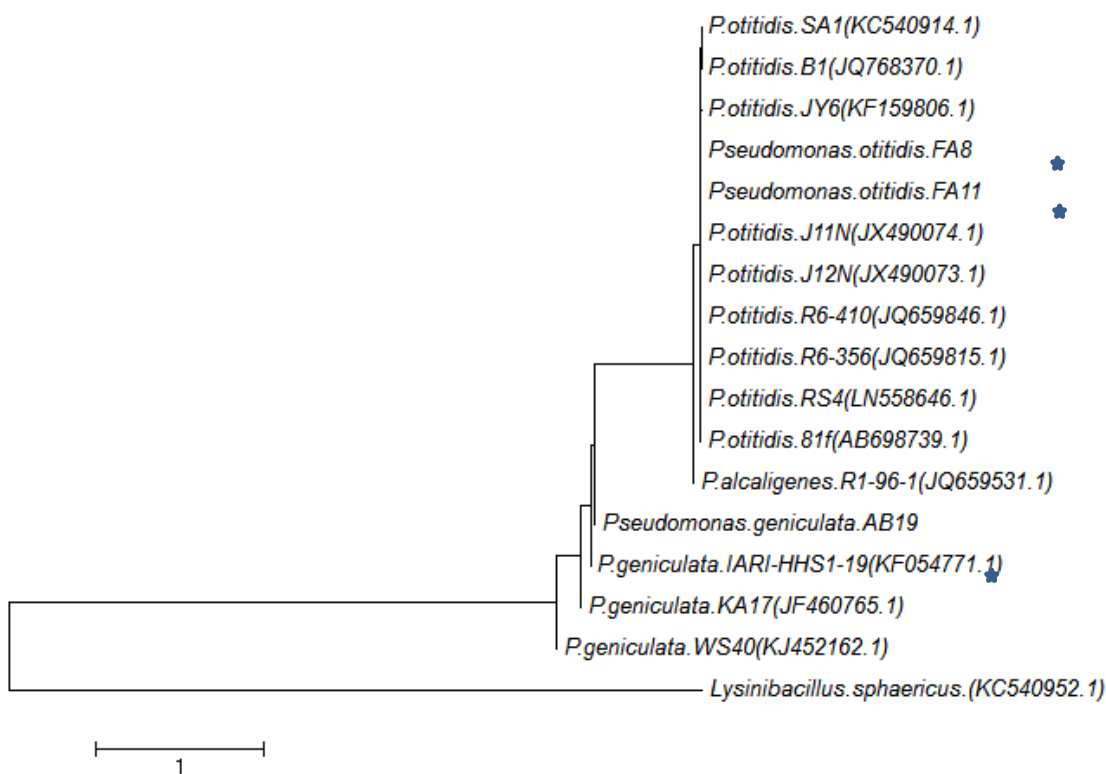
جدول ۱- نتایج میکروبیولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌کننده استونیتریل

آزمون	FA11	FA8	AB19	آزمون	FA11	FA8	AB19
شکل باکتری	کو کوباسیل	کو کوباسیل	کو کوباسیل	هیدرولیز کازئین	+	+	+
واکنش گرم	-	-	-	گاز	-	-	-
ویژگی‌های کلونی	متوسط مقعر سفید	متوسط مقعر سفید	کوچک محدب زرد	اندول	-	-	-
اوره‌آز	-	-	+	سولفید هیدروژن	-	-	-
اسپور	-	-	-	متیل‌رد	-	-	-
پیگمان	-	-	-	وزز پروسکوئر	-	-	-
احیا نیترات	+	+	-	مصرف نشاسته	-	-	-
حرکت	+	+	+	هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
تریپل شوگر آبرون	قلیا/قلیا	قلیا/قلیا	قلیا/قلیا	مصرف سترات	+	+	+
فعالیت کاتالازی	+	+	+	مصرف گلوکز	+	+	+
فعالیت اکسیدازی	+	+	+	رشد در ۴ درصد نمک	+	+	+

درخت فیلوژنتیکی برای آن‌ها رسم شد (شکل ۲). رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار مگا ۴ انجام شد. نتایج به دست آمده از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که جدایه‌های FA8 و FA11 به گونه سودوموناس اوتیدیس و جدایه AB19 نیز به گونه سودوموناس جنیکولاتا^{۷۷} با میزان شباهت نوکلئوتیدی ۹۹ و ۱۰۰ درصد به ترتیب نزدیک هستند. توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های FA8، FA11 و AB19 به ترتیب با شماره دسترسی KM229752.1، KM229748.1 و KM229753.1 در بانک ژن ثبت شد.

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از تعیین توالی ژن

I6s rRNA: شناسایی جدایه‌ها با استفاده از تعیین توالی ژن *I6s rRNA* انجام شد. برای تهیه DNA ژنومی باکتری از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده شد و DNA تکثیر یافته با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط کیت تخلیص DNA از شرکت سیناژن تخلیص شد و سپس، برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره جنوبی) ارسال شد. پس از تعیین توالی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سه جدایه و مقایسه با سایر ژن‌های *I6s rRNA*



شکل ۲- درخت فیلوژنی جدایه‌های تجزیه‌کننده استونیتریل، سودوموناس FA8، سودوموناس FA11 و سودوموناس AB19 جدا شده از آب‌انبار. اعداد یاد شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری bootstrape از ۱۰۰۰ نمونه است. لیزینی باسیلوس اسفاریکوس نیز به عنوان outgroup در نظر گرفته شد.

در محدوده ۶ تا ۷ افزایش و سپس، به آرامی در اسیدیته ۸ دچار کاهش شده است. اسیدیته بهینه برای تولید آنزیم ۷ است، به این ترتیب قبل از انجام استریلیزاسیون محیط، اسیدیته آن بین ۶ تا ۷ تنظیم شد.

جدول ۲- مقایسه تجزیه استونیتریل پس از ۷۲ ساعت در حضور و عدم حضور سوپسترا در جدایه FA8

زمان (ساعت)	۰	۷۲
عدم حضور سوپسترا	0.125 ± 0.2	0.365 ± 0.2
در حضور سوپسترا	0.135 ± 0.2	0.515 ± 0.2

جدول ۳- اثر منابع مختلف کربن بر فعالیت آنزیمی سودوموناس FA8

منبع کربن	تولید آمونیاک (درصد)	جذب ۶۰۰ نانومتر
کنترل	۱۰۰	0.3 ± 0.610
گلوکز	۴۴۳	0.3 ± 1.678
فروکتوز	۱۳۷	0.3 ± 1.217
مالتوز	۹۳	0.3 ± 0.910
نشاسته	۳۸۷	0.3 ± 1.504

جدول ۴- اثر منابع مختلف نیتروژن بر فعالیت آنزیمی سودوموناس FA8

منبع نیتروژن	تولید آمونیاک (درصد)	جذب ۶۰۰ نانومتر
کنترل	۱۰۰	0.2 ± 1.215
پپتون	۱۱۸	$\pm 0.2 1.428$
عصاره مخمر	۴۲۷	$\pm 0.2 1.921$

جدول ۵- اثر منابع مختلف اسیدیته بر فعالیت آنزیمی سودوموناس FA8

اسیدیته	تولید آمونیاک (درصد)	جذب ۶۰۰ نانومتر
۵	۶۲	0.3 ± 0.774
۶	۷۴	0.3 ± 0.933
۷	۱۰۰	0.3 ± 0.953
۸	۶۵	0.3 ± 1.141

بررسی میزان تجزیه استونیتریل در طی زمان:

مقایسه تجزیه استونیتریل پس از ۷۲ ساعت در حضور و عدم حضور سوپسترا در سودوموناس FA8 در جدول ۲ نشان داده شد. در حالت سنجش با سوپسترا علاوه بر میزان آمونیاک تولیدی حاصل از تجزیه استونیتریل، فعالیت نیتریل هیدرولازی نیز سنجیده می‌شود. این در حالی است که در حالت بدون سوپسترا فقط میزان آمونیاک تولیدی سنجیده می‌شود. این موضوع در نتایج به دست آمده از سودوموناس FA8 کاملاً صدق می‌کند.

بررسی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف:

اثر منابع مختلف کربن: اثر منابع مختلف کربن به میزان ۱۰ گرم بر لیتر (گلوکز، فروکتوز، مالتوز و نشاسته)، بر فعالیت آنزیمی سودوموناس FA8 در جدول ۳ نشان داده شد. نتایج نشان دادند که مالتوز در مقایسه با شاهد باعث کاهش تولید آنزیم شده است. در مقابل گلوکز، نشاسته و تا حدودی فروکتوز موجب افزایش تولید آنزیم شده است. در بین منابع مورد بررسی گلوکز اثر در خور توجهی بر تولید آنزیم دارد.

اثر منابع نیتروژن: اثر منابع نیتروژن عصاره مخمر و

پپتون (۵ گرم بر لیتر)، بر فعالیت آنزیمی سودوموناس FA8 در جدول ۴ نشان داده شد. نتایج نشان دادند که عصاره مخمر در مقایسه با کنترل و پپتون اثر در خور توجهی بر تولید آنزیم دارد.

اثر اسیدیته بر تولید آنزیم: بررسی تاثیر اسیدیته بر

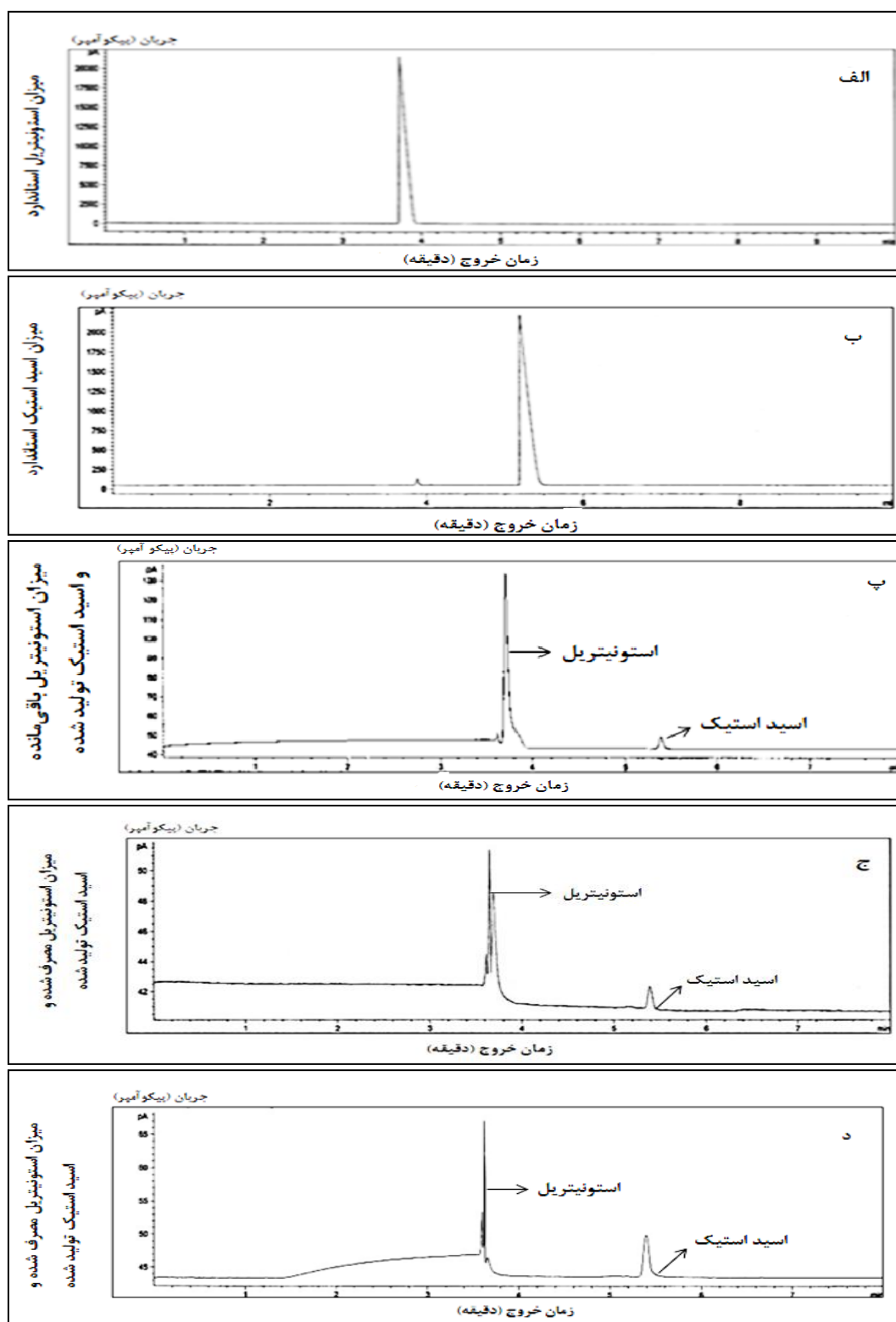
روی تولید آنزیم سودوموناس FA8 با انتخاب اسیدیته‌های مختلف ۵ تا ۸ در محیط کشت انجام شد (جدول ۵). نتایج پس از ۴۸ ساعت رشد باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که فعالیت آنزیمی

بررسی میزان استونیتریل و استیک‌اسید با

کروماتوگرافی گازی: کروماتوگرافی گازی به‌طور مستدل از دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش‌های کروماتوگرافی است. با این روش می‌توان اجزای موجود در یک مخلوط را از نظر کیفی و کمی، البته با در دست داشتن شاهد جداسازی کرد (۲۱). در یک کروماتوگرام^{۷۸} حاصل از جداسازی، به‌طور معمول مساحت زیر منحنی به دست آمده که به شکل درصد نشان داده می‌شود که مقدار ماده موجود در مخلوط را نشان می‌دهد. به‌طور کلی تجزیه ترکیبات نیتریل توسط دو مسیر آنزیمی انجام می‌شود. در مسیر اول، آنزیم نیتریلاز به شکل مستقیم ترکیبات نیتریلی را به اسیدهای مربوطه تبدیل می‌کند و مقدار زیادی آمونیاک نیز به عنوان محصول اصلی تولید می‌شود. در مسیر دوم، آنزیم نیتریل هیدراتاز با همکاری آنزیم آمیداز، ترکیبات نیتریلی را با تولید حد واسط آمید مربوطه به اسید تبدیل می‌کند.

کروماتوگرام به دست آمده از فعالیت سودوموناس FA8 در شکل ۳ نشان داده شده است. در پژوهش حاضر، محلول رویی حاصل از واکنش تغییر شکل زیستی سودوموناس FA8 در حضور سوبسترای استونیتریل در زمان‌های ۱۶، ۳۰ و ۴۸ ساعت تحلیل شد و کروماتوگرام به دست آمده با نمونه‌های استاندارد استونیتریل، استامید^{۷۹} و استیک‌اسید^{۸۰} مقایسه شد. نتایج نشان داد که سودوموناس FA8 دارای توانایی تجزیه استونیتریل موجود در محیط کشت به استیک‌اسید است.

البته این نکته شایان توجه است که مقداری از محصول تولیدی، پس از یک بازه زمانی و به علت کمبود منابع انرژی در محیط توسط باکتری مصرف می‌شود. کاهش مساحت زیر منحنی استونیتریل در زمان ۳/۶۹ دقیقه پس از تزریق، نشان‌دهنده مصرف تدریجی این ماده در طی زمان انکوباسیون و از طرفی افزایش مساحت زیر منحنی استیک‌اسید در زمان ۵/۳۹، تولید این محصول را به شکل تدریجی نشان می‌دهد. به‌طور کلی، در طی یک تحلیل فعالیت آنزیمی، کاهش مساحت زیر منحنی در مورد سوبسترا و افزایش مساحت زیر منحنی در مورد محصول تولیدی در مقایسه با زمان خروج مواد استاندارد تزریق شده، از روند درست تجزیه خبر می‌دهد که این امر در مورد سودوموناس FA8 طبق نتایج به دست آمده در ۱۶ ساعت اولیه سنجش به دست آمده است و تا زمان ۴۸ ساعت ادامه دارد. سودوموناس FA8 در زمان ۱۶ ساعت اولیه، به میزان ۵ درصد استیک‌اسید از تجزیه ۷ درصد استونیتریل تولید کرده است که در زمان ۳۰ ساعت این مقدار به ۱۶ درصد محصول از ۷۳ درصد سوبسترا رسیده است. در پایان، بررسی فعالیت آنزیم و تولید محصول تنها ۲۳ درصد استونیتریل باقی مانده است و باکتری توانسته است با تجزیه ۷۷ درصد استونیتریل، ۵۸ درصد استیک‌اسید تولید کند که به نوبه خود عدد در خور توجهی است و توانایی بالقوه باکتری در تجزیه استونیتریل را نشان می‌دهد (شکل ۳). بنابراین، باکتری در بازه زمانی ۳۰ تا ۴۸ ساعت بیش‌ترین فعالیت تغییر شکل زیستی استونیتریل را داشته است.



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از تجزیه استونیتریل و تولید استیک‌اسید توسط سویه سودوموناس FA8 (الف) استونیتریل استاندارد در زمان خروج ۳/۶۹ دقیقه. (ب) استیک‌اسید استاندارد در زمان خروج ۵/۳۹ دقیقه. (پ) نمونه ۱۶ ساعت، استونیتریل ۹۲ درصد و استیک‌اسید ۵ درصد. (ج) نمونه ۳۰ ساعت، استونیتریل ۲۷ درصد و استیک‌اسید ۱۶ درصد. (د) نمونه ۴۸ ساعت، استونیتریل ۲۳ درصد و استیک‌اسید ۵۸ درصد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش از میان سه جدایه، سودوموناس FA8 با ایجاد بیش‌ترین قطر هاله و شدت رنگ حاصل از تجزیه استونیتریل به آمونیاک و استیک‌اسید در محیط حداقل نمک‌های معدنی، جداسازی و شناسایی شد. آمونیاک محصول اصلی تجزیه ترکیبات نیتریلی است. اگر باکتری قادر به تجزیه استونیتریل باشد با تبدیل آن به استیک‌اسید و آمونیاک، باعث تجمع آمونیاک در محیط و قلیایی شدن اسیدیته و تغییر رنگ معرف فنل رد از زرد به صورتی می‌شود (۱۳). مقدار آمونیاک تولیدی حاصل از فعالیت آنزیم جدایه در این پژوهش بر اساس روش فنل - هیپوکلریت و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. این مطلب واضح است که تجزیه استونیتریل آغاز تجمع آمونیاک در محیط کشت است. آمونیاک اضافی در محیط، به افزایش اسیدیته محیط از مقدار اولیه آن منجر می‌شود. ناگشوار^{۸۱} و همکاران از تغییر میزان اسیدیته محیط در اثر تجزیه استونیتریل در ۶۰ ساعت اول، از مقدار ۷ به ۹/۲ اشاره کردند (۱۳). این مورد در مورد جدایه FA8 در ۴۸ ساعت اولیه رشد از مقدار ۷ به ۹/۲۸ به دست آمده است. افزایش میزان جذب که در زمان استفاده از سوبسترا در زمان ۷۲ ساعت سنجش مشاهده می‌شود، نشانگر فعالیت آنزیمی علاوه بر تولید آمونیاک است که در حالت عدم حضور سوبسترا دیده نمی‌شود. بیش‌ترین فعالیت نیتریل‌هیدرولازی جدایه، در محیط خنثی حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن است. اسیدیته خنثی به عنوان مناسب‌ترین اسیدیته برای تولید آنزیم در بیشتر باکتری‌ها گزارش شده است (۲۲). دانگ^{۸۲} و همکاران گزارش کردند که عصاره مخمر و پیتون از جمله منابع نیتروژن مناسب در جهت افزایش تولید فعالیت آنزیم باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس^{۸۳} ZJB-0910 هستند (۲۳).

ناگشوار و همکاران نیز گزارش کردند که مناسب‌ترین تولید آنزیم آلکالیزنر فکالیس^{۸۴} MTCC10757، در زمان استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن است (۱۹). کروماتوگرافی گازی یکی از روش‌های فیزیکی برای جداسازی و خالص‌سازی مواد فرار است. استونیتریل و محصولات حاصل از تجزیه آن از جمله مواد فرار محسوب می‌شوند که سنجش دقیق مقدار مصرفی و تولیدی آن‌ها به کمک روش کروماتوگرافی بسیار توصیه می‌شود (۲۱). در کروماتوگرام حاصل از تحلیل، کاهش مساحت زیر منحنی در مورد سوبسترا و افزایش مساحت زیر منحنی در مورد محصول تولیدی در مقایسه با زمان خروج مواد استاندارد تزریق شده، از روند درست تجزیه خبر می‌دهد که این امر در مورد جدایه FA8 طبق نتایج به دست آمده در طی ۴۸ ساعت سنجش به دست آمده است. نتایج به دست آمده از کروماتوگرام حاصل نشان می‌دهد که این جدایه بیش‌ترین درصد تولید استیک‌اسید (۵۸ درصد) را با تجزیه ۷۷ درصد استونیتریل در زمان ۳۰ تا ۴۸ انکوباسیون را نشان می‌دهد که به نوبه خود عدد در خور توجهی است و نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیمی در این بازه است.

استفاده باکتری سودوموناس FA8 از مواد ارزان و قابل دسترس همچون گلوکز و عصاره مخمر در محیط و تولید آنزیم با فعالیت بالا از جمله ویژگی‌هایی است که این جدایه را در مباحث بیوتکنولوژی شایان توجه می‌سازد. با توجه به ویژگی‌های باکتری و پتانسیل بالای آن در تولید آنزیم، این باکتری می‌تواند ضمن پاک‌سازی آلاینده‌های زیست‌محیطی در تولید زیستی ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی نیز استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- (1) Knowles CJ., Bunch AW. Microbial cyanide metabolism. *Advanced microbial physiology*. London: Academic Press; 1986.
- (2) Vennesland B., Conn EE., Knowles CJ., Westley J., Wissing F. *Biosynthesis of cyanogenic glycosides*. London: Academic Press; 1981.
- (3) Banerjee A., Sharma R., Banerjee UC. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 60 (1- 2): 33- 44.
- (4) He YC., Xu JH., Su JH., Zhou L. Bioproduction of glycolic acid from glycolonitrile with a new bacterial isolate of *Alcaligenes sp. ECU0401*. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010; 37 (7): 741- 50.
- (5) Vogel AL. *Quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis*. 3rd ed. London: Lowe and Bryodne Ltd; 1969.
- (6) Bestwick L., Gronning L., James D., Bones A., Rossiter J. Purification and characterization of a nitrilase from *Brassic napus*. *Plant Physiology* 1993; 89 (43): 611- 18.
- (7) Geronimo MJ., Antoine AD. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100- 21. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 1976; 31 (6): 900- 06.
- (8) O'Reilly C., Turner PD. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes a comparative study. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 95 (6): 1161- 1174.
- (9) Thimann KV., Mahadevan S. Nitrilase; Occurrence, preparation and general properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1964; 105 (1): 133- 41.
- (10) Hook RH., Robinson WG. Ricinine nitrilase II. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry* 1964; 239 (12): 4263- 7.
- (11) Collins P., Knowles C. The utilization of nitriles and amides by *Nocardia rhodochrous*. *Journal of General Microbiology* 1983; 129 (1): 248- 54.
- (12) Bhalla TC., Kumar H. *Nocardia globerula* NHB-2: a versatile nitrile-degrading organism. *Canadian Journal of Microbiology* 2005; 51 (8):705- 08.
- (13) Santoshkumar M., Anand S., Nayak O., Anjaneya B. A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2010; 37 (3): 111- 15.
- (14) Leavesley HB., Li L., Prabhakaran K., Borowitz JL., Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological Sciences* 2008; 101 (1): 101- 11.
- (15) Badoei- Dalfard A., Amiri-Bahrami M., Riahi-Madvar A., Karami Z., Ebrahimi M A. Isolation, identification and characterization of organic solvent tolerant protease from *Bacillus sp. DAF-01*. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (2): 37- 48.
- (16) 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 (3): 716- 21.
- (17) 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. *Nucleic Acids Research* 1989; 17 (19): 7843- 53.
- (18) Fawcett J K., Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology* 1960; 13 (2): 156- 9.

- (19) Nageshwar YVD., Sheelu G., Shambhu RR., Muluka H., Nooreen M., Malik MS., et al. Optimization of nitrilase production from *Alcaligenes faecalis* MTCC 10757 (IICT-A3): effect of inducers on substrate specificity. *Journal of Bioprocess and Biosystems Engineering* 2011; 34 (5): 515-23.
- (20) Jin LQ., Li YF., Liu ZQ., Zheng YG., Shen YC. Characterization of a newly isolated strain *Rhodococcus erythropolis* ZJB-09149 transforming 2-chloro-3-cyanopyridine to 2- chloronicotinic acid. *Journal of New Biotechnology* 2011; 28 (6): 610- 615.
- (21) Skoog DA., Holler JA., Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. London: Sanders College; 1999.
- (22) Robinson WG., Hook RH. Ricinine nitrilase. I. Reaction product and substrate specificity. *Journal of Biology and Chemistry* 1964; 239 (1): 4257- 62.
- (23) Dong HP., Liu ZQ., Zheng YG., Shen YC. Medium optimization for nitrilase production by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* ZJB-0910 using statistical designs. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 25 (3): 351- 8.
- 24- Mandelonitrile
25- *Acinetobacter*
26- *Rhodococcus*
27- *Klebsiella*
28- *Arthrobacter*
29- *Corynebacterium*
30- *Nocardia*
31- Acetonitrile
32- *Pseudomonas otitidis* FA8
33- Sigma Aldrich
34- The polymerase chain reaction
35- Merck
36- Bioneer
37- Mineral Salts Medium
38- K_2HPO_4
39- KH_2PO_4
40- $MgSO_4$
41- $MnSO_4$
42- $CaCl_2$
43- $FeSO_4$
44- Na_2MoO_4
45- HCl
46- NaOH
47- Agar
48- Phenol red
49- Tryptical Soy Agar
50- Gram straining
51- Methyl Red
52- Voges-Proskauer
53- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
54- Nutrient agar
55- Centrifuge
56- Agarose
57- Gene Bank
58- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI)
59- Accession Number
60- MEGA4
61- Phenol/hypochlorite
62- Phenol
63- Sodium nitroprosside
64- Sodium hypochlorite
65- Spectrophotometer
66- Ammonium chloride
67- Glucose
68- Maltose
69- Fructose
70- Starch
71- Peptone
72- Yeast extract
73- Gas Chromatography (Agilent, Santa Clara, N6890 CA)
74- Capillary (FFAP (30 m, 0.25 mm, 0.33 ml))
75- Flame Ionization Detector
76- Carrier Gas
77- *Pseudomonas geniculata*
78- Chromatogram
79- Acetamide
80- Acetic acid
81- Nageshwar
82- Dong
83- *Rhodococcus erythropolis* ZJB-0910
84- *Alcaligenes faecalis* MTCC 10757
- 1- Nitriles
2- Cyanoglycoside
3- Cyanolipid
4- Indole-3-acetonitrile
5- β -cyano-L-alanine
6- Ketone
7- Aldehydes
8- HCN
9- Nitrile hydrolases
10- Nitrilase
11- Nitrile hydratase
12- Amidase
13- Nicotinamide
14- 5-cyanovaleramide
15- Acrylamide
16- Nitrile aminohydrolase
17- *Pseudomonas*
18- Indole-3-acetic acid
19- Auxin
20- Nicotinic acid
21- Niacin
22- 3-cyanopyridine
23- R- (-) -mandelic acid

Isolation and identification of the acetonitrile-degrading *Pseudomonas* from the Ab-anbar-e Ganjali Khan in Kerman

Narjes Ramezani-pour

M.Sc. of Microbiology, Department of Biology, Faculty of sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, ramezany22@yahoo.com

Arastoo Badoei-Dalfard*

Associate Professors of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, badoei@uk.ac.ir

Abdolhamid Namaki-Shoushtari

Associate Professors of Genetics, Department of Biology, Faculty of sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, genabns2@yahoo.com

Zahra Karami

Assistant Professors of Biophysics, Department of Biology, Faculty of sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, karami@uk.ac.ir

Abstract

Introduction: Nitriles are toxic and hazardous compounds for all organisms which are produced enormously by human being and cause environment pollution. Biodegradation is the best method for Nitrile elimination in sewage. The aim of this study was isolation and identification of native bacteria Acetonitrile-degrading from the sewage of the city of Kerman.

Materials and methods: The enrichment and screening of Acetonitrile degrading bacteria was performed in a specific medium containing 1 % Acetonitrile as sole carbon and nitrogen source. Enzyme activity and ammonium production was determined in growth medium using a modification of the phenol/hypochlorite method. Identification of the isolates was undertaken using microbial - biochemical and molecular tests. The optimization of enzyme production was examined. The amount of nitrile and acid were also determined by gas chromatography.

Results: Among three isolated nitrile hydrolyzing producing species (FA3, FA8 and AB19), FA8 isolate showed maximum enzyme productivity. The results of characteristic tests showed that these bacteria belonged to the *Pseudomonas* sp. Moreover, 16S rRNA sequencing and phylogenetic analyses exhibited that FA11, FA8 and AB19 strains were similar to *Pseudomonas Otitidis* and *Pseudomonas geniculate* with 99, 100% homology, respectively. Results of medium optimization of *Pseudomonas* FA8 strain showed that glucose (10 gL⁻¹) and yeast extract (5 gL⁻¹) in neutral medium strongly supported enzyme production. Gas chromatography results showed that FA8 produced 58% acetic acid at 48 h of incubation.

Discussion and conclusion: The results demonstrated that *Pseudomonas* FA8 isolated bacterium is a suitable candidate for degradation of Acetonitrile. This bacterium could be used for treatment of industrial wastewater and sites that contaminated with Acetonitrile.

Key words: Nitrile, Screening, Nitrile hydrolase, *Pseudomonas*

* Corresponding author

Received: November 1, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014