

بهینه‌سازی شرایط کشت آنزیم خارج سلولی تجزیه‌کننده سیانید باکتری *انتروباکتر ZS* به روش سطح پاسخ

زهره جواهری صفا^۱، سعید امین زاده^{۱*}، محمدرضا زمانی^۱ و مصطفی مطلبی^۱

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

^۲ میمه، موسسه آموزش عالی نوردانش

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۵

چکیده

سیانید ترکیبی بسیار سمی و کشنده است که علی‌رغم این سمیت در بسیاری از صنایع استفاده می‌شود. فاضلاب صنایع در مقیاس وسیعی حاوی غلظت‌های بالایی از سیانید می‌باشند؛ که به‌منظور تجزیه آن از روش‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی استفاده می‌شود. در مقابل استفاده از روش تجزیه زیستی، علاوه بر کاهش هزینه‌ها سازگار با محیط‌زیست نیز هست. در این پژوهش جداسازی باکتری از پساب آلوده به سیانید معدن طلای موه و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و 16S rDNA جهت شناسایی باکتری *انتروباکتر ZS* موردنظر انجام شد. به‌منظور دستیابی به بیشترین میزان تجزیه توسط این باکتری، شرایط کشت به‌گونه‌ای بهینه‌سازی شد که با دستیابی به فاکتورهای تأثیرگذار باعث تسریع روند تجزیه گردید و برای دست یافتن به بیشترین بازدهی از روش سطح پاسخ (RSM= Response Surface Methodology) استفاده شد. با بهینه‌سازی مقادیر فاکتور-های تأثیرگذار و در نظر گرفتن برهمکنش‌های بین فاکتورها، شرایط کشت بهینه شد.

واژه‌های کلیدی: سیانید، تجزیه زیستی، *انتروباکتر*، بهینه‌سازی به روش RSM، آنزیم تجزیه‌کننده سیانید

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۰۳، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

گروه سیانو ($C \equiv N$) وجود دارد که به علت خواص شیمیایی این گروه به اشکال متفاوتی در طبیعت یافت می‌شود (۱۰ و ۱۱). سیانید ممکن است به‌عنوان یک ترکیب طبیعی توسط باکتریها، جلبک‌ها، فارچها و گیاهان پیشرفته و حتی بعضی از حشرات، عمدتاً به‌منظور دفاع یا حمله تولید شود (۱). قوانین زیست‌محیطی بر پایه پساب صنعتی متمرکز می‌شود که از سیانید و یا ترکیبات مرتبط با سیانید استفاده می‌کنند (۱۲). با این وجود مشکلات محیطی زیادی به علت تولید مقادیر انبوه پساب‌های آلوده به سیانید به وجود آمده است که توسط فعالیت‌های صنعتی بشر از جمله تولید نیتربلهای ارگانیک، پلاستیکهای آکریلیک، رنگها، داروها، عناصر کیلیت‌کننده و استفاده از سیانید در

تاریخچه آلودگی با سیانید: سیانید یک مولکول باستانی است که در سنتز پروبیوتیک ترکیبات مختلف نیتروژن‌دار از قبیل آمینواسیدها و بازها شرکت می‌کند (۱۳). از نظر تاریخی، استفاده از HCN به‌عنوان یک جنگ افزار شیمیایی چندان موفقیت‌آمیز نبوده و خاصیت فرار بودن شدید آن، مانع از مصرف وسیع در جنگ جهانی اول گردید. ماده مورد استفاده توسط آلمانها ترکیبی به نام BZyklon یا همان سولفات کلسیم اشباع‌شده با HCN (۴۰ درصد) بود، که به این ترکیبات عوامل خون نیز اطلاق می‌شود (۶). سیانید مانع از فعالیت سیستم تنفسی در میتوکندری سلول می‌شود و برای حیات موجودات بسیار سمی است (۱۴). این ترکیب دارای یک الگوی شیمیایی است که در آن یک

متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) است. این روش در سال ۱۹۵۱ توسط Wilson و Box معرفی شد (۸). طرح Box-Behnken تعداد ۳ سطح را برای هر فاکتور اعمال می‌کند. برای برآزش بهینه‌سازی مدل‌های مرتبه دو به کار گرفته می‌شود و تعداد آزمایشها کمتر از طرح مرکب مرکزی است (۲).

مواد و روشها

جداسازی باکتری مقاوم به سیانید: نمونه‌های آب، خاک و پساب از معدن طلای موله گرفته شده است، که این معدن در ۲۷۰ کیلومتری جنوب غرب تهران واقع در رشته‌کوه‌های نسبتاً پست در جنوب دلیجان - شمال غربی میمه و شمال شرقی گلپایگان است. ارتفاع منطقه از سطح دریا ۱۹۰۰ تا ۲۳۰۰ متر هست.

غربالگری باکتری با مقاومت بیشتر به سیانید: به منظور غربال باکتریایی با مقاومت بالاتر نسبت به سیانید، یک کلنی از باکتریایی که در محیط کشت جامد رشد کرده‌اند، برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث تلقیح شدند. بعد از چند ساعت، با رسیدن باکتریها به غلظت نیم مک فارلند، پتاسیم سیانید را با غلظتهای ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت حاوی باکتری اضافه کرده، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، pH=۷/۵ و شیک rpm ۱۸۰ در انکوباتور قرار داده شدند.

شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: در مرحله بعد برای شناسایی باکتری، طبق روشهای شناسایی از منابعی مثل Bergey's manual of systematic bacteriology مشخصات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی باکتری مدنظر مورد بررسی قرار گرفت. و مشخص شد باکتری مورد نظر بیشترین شباهت را به *نتروباکتر* دارد. اطلاعات مربوطه در جدولهای ۱ و ۲ آورده شده است (نرم‌افزار GraphPad Prism 6.0) (۴).

معادن طلا و فلز و صنایع جواهرسازی است که به طرق مختلف وارد محیط زیست می‌شوند (۱۰). فعالیتهای صنعتی، ترکیبات آلوده به سیانید از قبیل هیدروژن سیانید، تیوسیانات (SCN) و سیانات (CNO) را به عنوان ضایعات صنعتی به محیط زیست تخلیه می‌کنند (۵). صنایعی که در ارتباط با ترکیبات سیانیدی می‌باشند، معمولاً از روشهای شیمیایی و فیزیکی برای حذف این ترکیب استفاده می‌کنند. این روشها علاوه بر اینکه پرهزینه هستند؛ در صورت اختلاط با سایر مواد، ترکیبات خطرناک‌تری را نیز تولید می‌کنند. مشاهده شده است که سیستمهای میکروبی و گیاهی می‌توانند سیانید را به ترکیبات غیر سمی تبدیل کنند. سیانید به شدت برای حیات موجودات سمی است و با سه مکانیسم عمده مانع رشد آنها می‌شود: ۱. پیوند محکمی با فلزات دو و سه‌گانه در متالوآنزیمها برقرار می‌کند (مثل سیتوکروم اکسیداز) ۲. واکنش با ترکیبات کتونی به منظور تشکیل مشتقات سیانویدرین از سوبستراهای آنزیم می‌دهد و ۳. واکنش با واسطه‌های باز شیف، هنگام فعالیت آنزیمی برای تشکیل مشتقات نیتریل پایدار (۷). سمیت در انسان می‌تواند منجر به تشنج، استفراغ، کما و مرگ شود. میزان کشنده آن در گستره ۰/۵ تا ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است. اثرات دوره طولانی تر آن به خوبی درک نشده است اما می‌تواند شامل اختلالات عصبی، آتروفی بینایی و آنمی کشنده باشد (۱۰).

بهینه‌سازی: سطوح بهینه برای فاکتورها، به هدف انجام فرآیند بستگی دارند. به عنوان مثال، ممکن است هدف رسیدن به بیشترین میزان بازده فرآیند و یا کاهش توان تولیدی فرآیند باشد. طراحی سطح پاسخ از جمله روشهای بهینه‌سازی است که با استفاده از مجموعه‌ای از تکنیکهای ریاضی و آماری، مسائل را مدل‌سازی می‌کند و نه تنها باعث می‌شود توسط شبیه‌سازی اجرای پرهزینه تمامی آزمایشها کاهش یابد بلکه روند طبیعی بهینه‌سازی فرآیند را که اغلب غیرخطی است مدل می‌کند. هدف روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی متغیر خروجی است که متأثر از چندین

تعیین توالی بر اساس 16S rDNA : در مرحله بعد به منظور تأیید شناساییهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، توالی یابی 16S rDNA باکتری انجام شد. بدین منظور

جدول ۱- توالی پرایمرهای یونیورسال 27F و 1492R

نام	توالی
27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'
1492R	5'TACGGYTACCTGTTACGACTT3'

طراحی آزمایش به منظور بهینه‌سازی میزان تجزیه سیانید: استفاده شد و براساس آن، هر فاکتور در سه سطح بررسی گردید (جدول ۲). به منظور انجام بهینه‌سازی به روش RSM از نرم‌افزار Design Expert7 استفاده شد.

جدول ۲- محدوده تغییرات فاکتورها در طراحی سطح پاسخ به روش طرح Box-Behnken

متغیرها	واحد	فاکتوریل پایین (-۱)	مرکز (۰)	فاکتوریل بالا (+۱)
دما	°C	۲۶	۳۸	۵۰
pH	-	۶	۷/۵	۹
پتاسیم سیانید	mg.ml ⁻¹	۰/۱۵۰	۰/۵۷۵	۱/۰۰۰

محاسبه میزان آمونیاک:

$$\text{Ammonia } [\mu\text{g/dl}] = \frac{\Delta A \text{ sample}}{\Delta A \text{ standard}} \times \text{conc. standard}$$

$$\text{Ammonia } [\mu\text{g/dl}] \times 0,588 = \text{Ammonia } [\mu\text{mol/l}]$$

نتایج

نتایج غربالگری باکتری با مقاومت بیشتر به سیانید: به منظور غربال باکتریهای با مقاومت بالاتر نسبت به سیانید، بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ خوانده شد. اختلاف جذب اولیه و جذب نهایی باکتری در سه روز متوالی در منحنی ۱ نشان داده شده است.

نتایج شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: ویژگیهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی باکتری مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد باکتری مورد نظر بیشترین شباهت را به *انتروباکتر* دارد. اطلاعات مربوطه در جدولهای ۳ و ۴ آورده شده است.

بر اساس طرح مرکب مرکزی، ۱۵ آزمایش برای سه فاکتور مؤثر بر پاسخ طراحی شد که شامل تکرارهایی در نقطه مرکزی است. برای بهینه‌سازی یک فرآیند فرآیند شیمیایی (y)، با توجه به فرمول زیر، این بازدهی تابعی از سطوح دو فاکتور x_1 و x_2 است. رابطه بین پاسخ و متغیرهای غیر وابسته با استفاده از یک معادله درجه دوم توضیح داده می‌شود. در این معادله $\beta_1 x_1$ و $\beta_2 x_2$ اثرات اصلی و $\beta_3 x_1 x_2$ اثرات متقابل هستند.

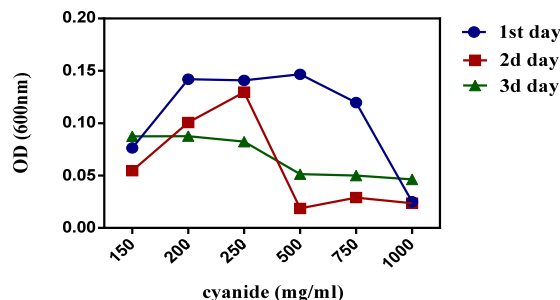
$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2$$

معادله درجه دوم به دست آمده به منظور توضیح رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ در قالب یک نمودار سه بعدی نشان داده می‌شود که نمودار سطح پاسخ سه بعدی نامیده می‌شود که در قسمت نتایج به آن اشاره شده است.

سنجش آمونیاک: به منظور سنجش میزان آمونیاک از کیت آمونیاک گرینر استفاده شد.

مختلف سیانید و سه بار تکرار.

نتیجه ثبت ژن بر اساس 16S rDNA: توالی‌یابی ژنوم باکتری بر اساس نواحی محافظت شده 16S rDNA با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفت. باکتری موردنظر دارای ۱۰۰ درصد یکسانی با انتروباکتر بود که ZS نام‌گذاری شد و در پایگاه داده GenBank با شماره دسترسی KU609073 ثبت گردید.



منحنی ۱- منحنی رشد انتروباکتر در سه روز متوالی با غلظتهای

جدول ۳- ویژگی‌های مورفولوژیکی باکتری انتروباکتر ZS

ویژگی‌های مورفولوژیکی	پیگمان	اسپور	حرکت	گرم	شکل
	موکونیدی	منفی	منفی	منفی	میله ای

جدول ۴- ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری انتروباکتر ZS

ویژگی‌های بیوشیمیایی	سیترات	اندول	VP	ONPG	اینوزیتول	اوره	لیزین	مانیتول	لاکتوز	مالتوز	گزیلوز
	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت

جدول ۵- طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ با استفاده از سه فاکتور مستقل دما، pH و سیانید و میزان تجزیه در آزمایش‌های انجام‌شده.

میزان تجزیه (IU)	سیانید (mg.ml ⁻¹)	pH	دما (°C)	ردیف
۰/۳۳	۰/۵۷	۶/۰	۲۶	۱
۰/۳۲	۰/۵۷	۹/۰	۲۶	۲
۰/۱۷	۰/۵۷	۹/۰	۵۰	۳
۰/۱۹	۰/۱۵	۷/۵	۲۶	۴
۰/۳۴	۰/۱۵	۷/۵	۵۰	۵
۰/۲۱	۱/۰۰	۷/۵	۲۶	۶
۰/۴۹	۱/۰۰	۷/۵	۵۰	۷
۰/۲۵	۰/۱۵	۶/۰	۳۸	۸
۰/۱۴	۰/۱۵	۹/۰	۳۸	۹
۰/۲۷	۱/۰۰	۶/۰	۳۸	۱۰
۰/۱۶	۱/۰۰	۹/۰	۳۸	۱۱
۰/۱۰	۰/۵۷	۷/۵	۳۸	۱۲
۰/۱۰	۰/۵۷	۷/۵	۲۸	۱۳
۰/۱۰	۰/۵۷	۷/۵	۳۸	۱۴
۰/۱۰	۰/۵۷	۷/۵	۳۸	۱۵

نتایج بهینه‌سازی با طراحی آزمایش به روش RSM: تجزیه و تحلیل آماری: طراحی آزمایش به روش Box-Behnken به منظور تعیین میزان اثر سه فاکتور دما، pH و پتاسیم سیانید بر پاسخ بهینه و برهمکنش بین این فاکتورها، توسط نرم‌افزار Minitab 17.0 و در سه سطح انجام شد. ۱۵ آزمایش توسط این نرم‌افزار طراحی و انجام گردید و میزان آمونیاک تولیدشده به عنوان پاسخ محاسبه شد (جدول ۵). پس از وارد کردن داده‌ها، پاسخ فرآیند، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج بهینه‌سازی عامل‌های فرآیند: نرم‌افزار Minitab 17.0 در بخش بهینه‌سازی، پس از آنالیز نتایج آزمایش، ترکیبی از سطوح عامل‌هایی را ارائه می‌دهد که شرایط بهینه را (پاسخ بیشینه یا کمینه) برای هر پاسخ فراهم می‌نماید. در اینجا، هدف، دستیابی به شرایط بهینه (بیشینه درصد سیانید تجزیه‌شده) مورد نظر است. شرایط بهینه پیشنهاد شده و مقادیر پیش‌بینی شده در شرایط بهینه توسط نرم‌افزار به ترتیب در جدول ۶ آمده است.

Source	DF	F Value	p-value	Prob > F
Model	8	66.34	< 0.0001	Significant
A-Temperature	1	98.25	< 0.0001	Significant
B-pH	1	0.98	0.3546	
C-Cyanide	1	0.37	0.5630	
AB	1	29.84	0.0009	Significant
BC	1	0.000	1.0000	
A2	1	18.57	0.0035	Significant
B2	1	399.28	< 0.0001	Significant
C2	1	34.54	0.0006	Significant
Residual	7			
Lack of Fit	3	1.83	0.2813	not significant
Pure Error	4			
Cor Total	15			

R-Squared= 0.98, Adj R-Squared 0.97

نتایج بررسی اثر دما و pH: پس از وارد کردن نتایج به دست آمده از آزمایشهای طراحی شده توسط برنامه RSM، بررسی آماری واریانس داده‌ها (جدول ANOVA) نشان داد که بیشترین میزان تداخل در مورد دو فاکتور دما و pH رخ می‌دهد. در دمای پایین و افزایش pH منجر به کاهش میزان پاسخ (درصد تجزیه سیانید) می‌شود و در دمای بالا و pH خنثی کاهش میزان پاسخ دیده می‌شود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

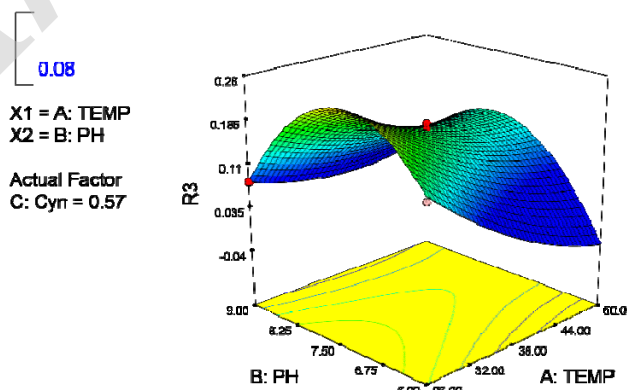
جدول ۶- شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به روش سطح پاسخ.

پتاسیم سیانید (mg ml ⁻¹)	pH	دما (°C)
۰/۱۵۰	۶	۵۰

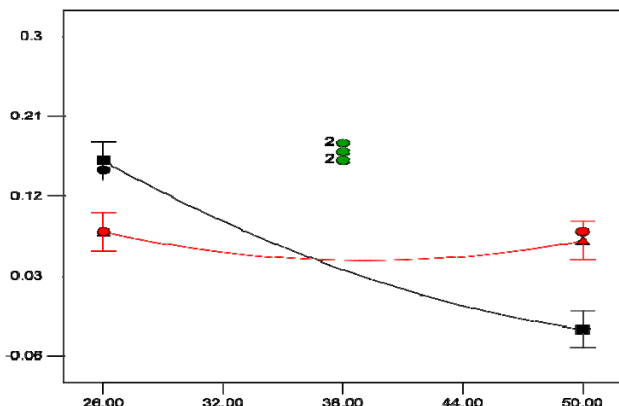
عموماً در آزمایشهای طراحی شده، از تحلیل واریانس به منظور تعیین عاملهای مهم و از رگرسیون، در ارائه مدل کمی برای نشان دادن ارتباط بین عاملهای مهم و پاسخ استفاده می‌شود. برای تعیین کمیت یک متغیر مجهول با استفاده از متغیرهای معلوم به صورت یک رابطه ریاضی از رگرسیون استفاده می‌شود. پس از پیش‌بینی این رابطه ریاضی، اعتبار کل مدل رگرسیون با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها (جدول ANOVA) مورد آزمون قرار می‌گیرد. در این تحقیق، تحلیل واریانس داده‌ها (جدول ۷) نشان می‌دهد که مدل ارائه شده (رابطه ۱) با ۹۵ درصد اطمینان، دارای اثر معنی‌دار است. رابطه ۱-۳ مدل ارائه شده برای میزان تجزیه صورت گرفته را برحسب عاملهای کد شده نشان می‌دهد.

$$\text{Response} = + 0.17 - 0.050 * A + 5.000E-003 * B - 2.500E-003 * C + 0.045 * A * B + 0.000 * B * C + 0.027 * A^2 - 0.13 * B^2 + 0.038 * C^2 \quad (\text{رابطه ۱})$$

جدول ۷- تجزیه و تحلیل فرآیند بهینه‌سازی و بررسی فاکتورها با آنالیز واریانس (ANOVA)



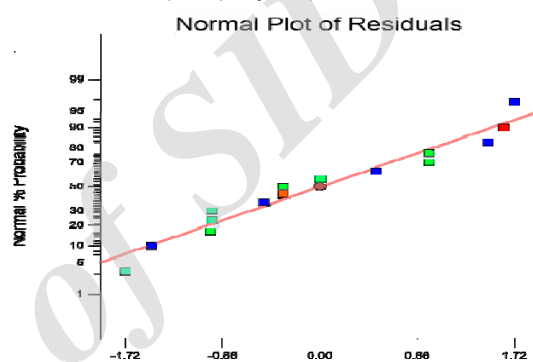
شکل ۱- نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثر تغییر فاکتورهای دما و pH بر مقدار تولید آمونیاک. تأثیر متقابل دما و pH بر میزان تولید کاملاً مشخص است؛ به طوری که بیشترین میزان تجزیه در دمای بالا و pH پایین است.



شکل ۳- نمودار اثر متقابل فاکتورهای تأثیرگذار دما و pH بر مقدار تجزیه سیانید. در این نمودار محور افقی نشان‌دهنده دما و محور عمودی، pH و رنگ نمودار میزان تولید آمونیاک است که رنگهای متمایل به قرمز درصدهای تجزیه بالاتر را نشان می‌دهد.

است، که در این مطالعه، P-value مدل، $0/0001 <$ به دست آمد. Lack off fit نشان می‌دهد، خطا در مدل پیشنهادی RSM تأثیری نداشته است و باید مقدار Lack off fit بی‌معنی باشد ($P\text{-value} >> 0/05$). در مدل آزمایش در این تحقیق Lack off fit برابر $0/28$ به دست آمد که مقدار آن مورد تأیید است. اگر این پارامتر معنی‌دار باشد، کل مدل و آزمایش بی‌معنی بوده و ارزشی ندارد. ضریب همبستگی (R^2) مدل، احتمال درست بودن مدل پیشنهادی نرم‌افزار را نشان می‌دهد. با آنالیز انجام‌شده، میزان ضریب همبستگی (R^2) 98 درصد به دست آمد. نزدیک بودن $AdjR^2$ به R^2 تأییدکننده R^2 است. اختلاف قابل قبولی بین 98 درصد R^2 و 97 درصد $AdjR^2$ مشاهده شد. Residual در ANOVA نشان‌دهنده صحت تعداد نمونه‌ها است که باید $6 \leq$ باشد که در این مطالعه 7 گزارش شد. همه این سنجشها تأیید می‌کند که مدل استفاده‌شده برای پیش‌گویی درصد تجزیه سیانید در طیفی از مقادیر داده شده معنی‌دار است.

ارتباط بین فاکتورها و تأثیرات متقابل بین آنها در رابطه ۱ آورده شده است. به طوری که Y ، درصد تجزیه سیانید را به‌عنوان عملکرد متغیرهای آزمایش (X_i) نشان می‌دهد. بر-همکنش فاکتورهایی که معنی‌دار بوده و $P\text{-value} < 0/05$ دارند، بر روند تجزیه سیانید تأثیر می‌گذارند. در این



شکل ۲- نمودار نرمال پلات اثر تغییر فاکتورهای دما و pH بر مقدار تجزیه سیانید

بحث

به‌منظور بالا بردن درصد تجزیه سیانید توسط آنتروباکتر ZS، بهینه‌سازی با استفاده از طراحی RSM Box-Behnken در سه سطح انجام شد. با استفاده از آنالیز داده‌ها (ANOVA)، مدل طراحی‌شده با پارامترهای تخمین زده شده مانند P-value و Lack off fit، در جدول ۷ آورده شده است. به‌منظور بررسی دو فاکتور، فرضیه‌ای ایجاد می‌شود که بر اساس این مدل هیچ تفاوت معناداری بین دو فاکتور وجود نداشته باشد، در این صورت صحت فرضیه بر اساس P-value اثبات می‌شود. بدین‌صورت که اگر $P\text{-value} \leq 0/05$ باشد فرضیه نادرست بوده و دو فاکتور اختلاف معنادار دارند ولی فرضیه با $P\text{-value} > 0/05$ درست بوده و فاکتورها اختلاف معناداری ندارند. در صورتی که P-value مدل کمتر از $0/05$ باشد، مدل این تحقیق معنی‌دار

گرم بر لیتر whey-waste انجام دادند. نتیجه این بهینه‌سازی این بود که از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مقدار اولیه سیانید، مقدار ۲۰۶/۵۳ میلی‌گرم بر لیتر سیانید طی ۹۶ ساعت توسط گونه‌های میکروبی تجزیه گردید (۳).

گونه باکتریایی باسیلوس CN-22 جداسازی شده از رسوب گل‌ولای آب‌فلز کاری، با توانایی ذاتی خود قادر به تجزیه سیانید است. با بهینه‌سازی شرایط با pH اولیه ۱۰/۳، دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد، دور چرخش ۱۹۳ r.p.m و میزان تلقیح ۲/۳۸ درصد، روند تجزیه سیانید کنترل شد. به طوری که غلظت اولیه سیانید ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را به ۶/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر تبدیل می‌کند (۱۵).

باکتری *Pseudomonas pseudoalcaligenes* جداسازی شده از معدن طلای Kuala Lipis Pahang، می‌تواند غلظت بالاتر از ۳۹ میلی‌گرم بر لیتر سیانید را تحمل کند اما رشد آن در غلظت ۵۲ میلی‌گرم بر لیتر سیانید متوقف می‌گردد (۱۴). در بررسی دیگری، درصد تجزیه سیانید با غلظت اولیه ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر توسط *Rhizopus oryzae*، ۸۳ درصد و توسط *Stemphylium loti*، ۹۰ درصد گزارش شده است (۱۴).

در این پژوهش تجزیه سیانید توسط آنزیمهای خارج سلولی انجام شده است. از جمله مزایایی این روش نسبت به روشهای داخل سلولی، استفاده مستقیم از باکتری می‌باشد، به این معنی که در این روش نیازی به شکستن سلول و آماده‌سازی عصاره سلولی نمی‌باشد. در نتیجه از این منظر، جنبه اقتصادی داشته و امکان استفاده در صنایع مرتبط با سیانید و ترکیبات سیانید دار را فراهم می‌کند.

آزمایش، P-value برای برهمکنش دما و pH برابر با ۰/۰۰۰۹ بوده و معنی‌دار است.

مدل پیشنهادی این آزمایش از معادله درجه دوم پیروی می‌کند. متمایز کردن متغیرهایی که بیشترین تأثیر را بر نتیجه نهایی دارند؛ کار دشواری است. در این آزمایش، تأثیر برهمکنش دما و pH بر نتیجه نهایی میزان درصد تجزیه سیانید در شکل‌های ۱ و ۳ نشان داده شده است. ارتباط بین این دو، خطی نبوده و این حالت انحنا به علت تأثیر متقابل pH بر فاکتور دما است.

ذز کشنده سیانید برای انسان به صورت بلع یا هضم در گستره‌ای از ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم (۱ تا ۳ میلی‌گرم سیانید آزاد در هر کیلوگرم وزن بدن) است. ذز کشنده به صورت جذب پوستی به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر است و حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است. در عملیات استخراج طلا از محلولهای بسیار رقیق سدیم سیانید در گستره ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد سیانید استفاده می‌گردد (۹).

باکتری *Scenedesmus obliquus* برگرفته شده از پساب معدن طلای Ovacik، سیانید ۷۷/۹۱ میلی‌گرم بر لیتر را به طور تدریجی با pH اولیه ۱۰/۳ تقریباً به ۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش داده است. نتایج آزمایش نشان می‌دهد باکتری *Scenedesmus obliquus* ۹۱ درصد سیانید را طی ۷۷ ساعت تجزیه می‌کند (۳).

در مطالعه دیگری، باکتری باسیلوس را با بهینه‌سازی آزمایش با بررسی فاکتورهای pH، دما و غلظت whey-waste، نقاط بهینه حاصل از بهینه‌سازی را به ترتیب در pH=۹/۸۸، دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱۴/۲۷

منابع

- Basile, L.J., *Cyanide-degrading enzymes for bioremediation*. 2008, Texas A&M University.
- Douglas, C.M., *Design and analysis of experiments*. John Wiley and sons, 2001.
- Gurbuz, F., H. Ciftci, and A. Akcil, *Biodegradation of cyanide containing effluents by Scenedesmus obliquus*. Journal of hazardous materials, 2009. 162(1): p. 74-79.
- Kerstens, K. and M. Vancanneyt, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2005.

5. Kitleartpornpairat, S.P.a.R., *Biodegradation of Cyanide by a Novel Cyanide-degrading Bacterium*. 2010. 4 2010-06-20.
6. Knowles, C.J. and A.W. Bunch, *Microbial cyanide metabolism*. Advances in microbial physiology, 1986. 27: p. 73-111.
7. Knowles, C.J., *Cyanide utilization and degradation by microorganisms*. Cyanide compounds in biology, 1988. 140: p. 3-15.
8. Lazic, Z.R., *Design of experiments in chemical engineering: a practical guide*. 2006: John Wiley & Sons.
9. Logsdon, m.j., *the management of cyanide in gold extraction*. international council on metals and the environment, 1999. 44(international council on metals and the environment).
10. Luque-Almagro, V.M., et al., *Cyanide degradation by Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 involves a malate: quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain*. Microbiology, 2011. 157(3): p. 739-746.
11. Luque-Almagro, V., et al., *Bacterial cyanide degradation is under review: Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph*. Biochemical Society transactions, 2011. 39(1): p. 269-274.
12. Mekuto, L., S.K.O. Ntwampe, and V.A. Jackson, *Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by Bacillus consortia: optimisation using response surface methodology*. Environmental Science and Pollution Research, 2015: p. 1-10.
13. Raybuck, S.A., *Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation*. Biodegradation, 1992. 3(1): p. 3-18.
14. Tiong, B., et al., *Cyanide Degradation by Pseudomonas pseudoalcaligenes Strain W2 Isolated from Mining Effluent*. Sains Malaysiana, 2015. 44(2): p. 233-238.
15. Wu, C.-F., et al., *An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by Bacillus sp. CN-22*. Applied microbiology and biotechnology, 2014. 98(8): p. 3801-3807.

Optimization of culture condition of *Enterobacter* ZS extra cellular cyanide degrading enzyme with Response Surface Methodology

Javaheri Safa Z.^{1,2}, Aminzadeh S.¹, Zamani M.R.¹ and Motalebi M.¹

¹- National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

² Nouredanesh Higher Education Complex,, Meymeh, I.R. of Iran

Abstract

Although cyanide is a poisonous and lethal compound, it is used in several industries. Industrial wastewater contains highly amounts of cyanide. That in order to degrade it, different chemical and physical methods are used. These methods not only include high expenses, but also if they combine with other materials, will produce more hazardous compound as well. On the other hand, utilizing biodegradation method, in addition to decreasing expenses, is environmentally friendly. In this study, bacterium was isolated from Muteh gold mining wastewater. Determination of morphological and biochemical characteristics and 16S rDNA described that the bacterium belong to *Enterobacter* genus. To achieve the maximum degradation by *Enterobacter* ZS, culture conditions has been optimized. The variables parameters that effect on the degradation procedure with maximum efficiency was achieved. By optimizing the values of affective factors and consider the interactions between factors, culture conditions were optimized by response surface methodology (RSM).

Key words: Cyanide, Biodegradation, *Enterobacter*, Optimization by Response Surface Methodology, Cyanide degrading enzyme