

بررسی تجزیه زیستی سیانید توسط آنزیم نیتریلاز ترش‌حی از قارچ پنی‌سیلیوم

مهديه شهابی‌نژاد^{۱*}، محمدرضا زمانی^۲، فاطمه حیدریان^۱ و علی‌رضا منصوریان^۳

^۱ ایران، میمه، موسسه آموزش عالی نوردانش، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری مولکولی گیاهی

^۳ 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 و سلامت انسان می‌گذارد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی جهت حذف آلودگی برای مساحت‌های بالا، پرهزینه هستند. این مهم منجر به درک کامل‌تر از توان ریزموجودات از جمله قارچ‌ها در پالایش مؤثر و اقتصادی خاک و آب آلوده شده است. در مطالعه حاضر به صورت تصادفی از پساب معدن طلا نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در محیط‌کشت PDA کشت داده شد 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 پرداخته شد. بنزونیتریل در حضور آنزیم نیتریلاز تولید بنزونیک‌اسید و آمونیاک می‌کند. جهت تعیین فعالیت آنزیم نیتریلاز میزانی از تولید بنزونیک‌اسید در ۲۳۸ نانومتر ارزیابی ارزیابی شد. با کمک منحنی استاندارد بدست‌آمده از جذب بنزونیک‌اسید، 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 یافته است. همچنین در محیط‌کشت قارچ حاوی غلظت‌های مختلف سیانید، غلظت سیانید باقی مانده ۵۲ درصد کاهش یافته است. نتایج بیانگر آن است که قارچ پنی‌سیلیوم تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار توانایی تجزیه سیانید را به خوبی داشته و مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهد و همچنین اضافه کردن سیانید به محیط‌کشت دارای اثر القایی است و فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده را افزایش می‌دهد و متقابلاً همراه با بالا رفتن فعالیت آنزیم، میزان تجزیه سیانید نیز افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، سیانید، آنزیم نیتریلاز، قارچ پنی‌سیلیوم

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

مقدمه

به عنوان یک مکانیسم دفاعی است. بندپایان، باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز می‌توانند سیانید را تولید کنند. سیانید به میزان زیادی در کشاورزی به دلیل 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 می‌-

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

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 مساحت‌های 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 آگاهانه 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 روش‌های 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، کم‌هزینه‌تر و بدون خطر است.

نولز (۱۹۹۸) در پژوهشی بیان کرد *Marasmius Ordeades* و بازیدیومسیت کپک برفی از طریق هیدرلیز سیانید به فراماید با استفاده از آنزیم سیانید هیدراتاز، به‌عنوان تجزیه‌کننده سیانید شناخته شده‌اند.

کند 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 ($C \equiv N$) وجود دارد (۱۵)، (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 می‌یابد؛ 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). زیست‌پالایی استفاده از ریزموجودات در حضور شرایط محیطی مطلوب و مواد مغذی کافی به‌منظور تجزیه مواد آلوده است (۴). با وجود سمیتی که سیانید دارد؛ طیف وسیعی از ریزموجودات شناخته شده‌اند که آن را تجزیه یا مصرف می‌کنند (۱۲).

تولید سیانید هیدروژن بوسیله ریزموجودات بوسیله Von loseoke در ۱۸۷۱ نمایش داده شد، زمانی که او آن را در *Marasmius oreades* مشاهده کرد.

Locquin در سال ۱۹۸۹ بیان نموده که ۳۰۰ گونه بازیدیومسیت از ۵۲ جنس و چندین آسکومیسیت 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 scutellatus* 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

می‌پردازند و بیان می‌کنند که بسیاری از ریزموجودات با استفاده از سیانید به تولید آلانین، گلوتامیک اسید، آلفاآمینو- بوتیریک اسید و بتا سیانوآلانین می‌پردازند.

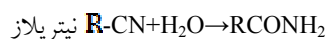
ازی و همکاران (۲۰۰۵) در پژوهشی نشان دادند که در محیط آلوده به سیانید در صورتی که دانه نخود و گندم به قارچ *Trichoderma* و *Fusarium* آغشته شده باشند، به دلیل افزایش کاتابولیسم سیانید گیاه رشد خوبی دارد.

نولز (۱۹۷۶) بسیاری از قارچ‌هایی که پاتوژن گیاهان سیانوژن هستند، سیانید هیدراتاز 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 بیوستز پروتئین‌ها و تغییرات پس از ترجمه در گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و برخی پروکاریوت‌ها می‌شوند.



نیتریلاز در کل فعالیتش را با طیف وسیعی از سوبستراهای نیتریل نشان می‌دهد، باین‌وجود 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).

ریناگلو (۲۰۱۴) سیانید هیدراتاز (CHTS) هیدروژن سیانیدی که از گلیکوزیدهای سیانوژنیک آزاد می‌شود را سم‌زدایی می‌کند، سیانید هیدراتاز اولین بار در قارچ‌های پاتوژن گیاه (*Stemphyllum loti* *Leptoptheria maculuns*), گزارش شد. (*Gloeocercospora sorghi*, *Fusarium geneus*)

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.

پیرا 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 هیدرولیز 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 می‌باشند. *N. crassa* میزان بیشتری از ترکیبات سیانیدی را تخریب می‌کند و در طیف وسیعی از PH و دمای بالا پایدار است.

گوپتا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی مکانیزم‌ها و مسیرهای آنزیمی مربوط به پاکسازی سیانید از پساب‌های صنعتی

مواد و روشها

در این پژوهش به بررسی میزان تجزیه سیانید آزاد توسط قارچ پنی‌سیلیوم پرداخته شد. ابتدا قارچ در محیط‌کشت مایع در غلظت‌های مختلف سیانید (۲، ۵ و ۱۰ میلی-مولار) کشت داده شد. بعد از گذشت هفت روز محیط‌کشت را با کاغذ صافی فیلتر کرده و قارچ در درون فویل پیچیده و در آن به منظور 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 به منظور 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 استفاده شد. 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 اضافه شد. سپس به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو گردید. بعد از اینکه دمای آن به ۵۰ °C تا ۶۰ °C کاهش یافت به پلیت‌های یک‌بار مصرف ریخته شد. پس از منعقد شدن محیط‌کشت، آن‌ها به یخچال با دمای ۴°C منتقل گردیدند (۲).

محیط‌کشت مایع PD= Potato dextrose : به منظور تهیه محیط‌کشت PD می‌توان سیب‌زمینی قطعه‌قطعه شده را در آب مقطر پخته و به صورت یک سوسپانسیون نسبتاً غلیظ درآورد. سپس مایع صاف شده سیب‌زمینی را به یک ارلن

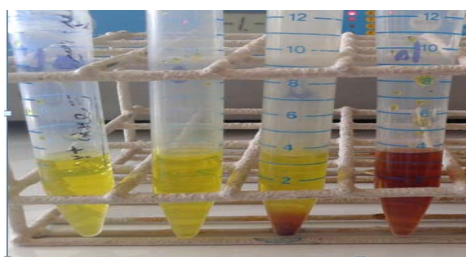
نیتریلازها براساس اختصاصیت سویسترا به سه دسته تقسیم می‌شوند ۱. نیتریلازهای آروماتیک که از گیاهان جدا شده‌اند. ارگانیسیم‌هایی از قبیل *Nocardia sp.* و *Fusarium solani* قادر به تجزیه نیتریل‌های آروماتیک، مثل بنزونیتریل هستند. ۲. نیتریلازهایی که نیتریل‌های آروماتیک را تجزیه می‌کنند نمی‌توانند بر روی نیتریل‌های آلیفاتیک تأثیری داشته باشند. *Rhodococcus rhodochrous K22* از نیتریل‌های آلیفاتیک مثل آکریلونیتریل، به‌عنوان سویسترای اختصاصی استفاده می‌کند. ۳. نوع جدیدی از نیتریلاز میکروبی که در *آلکالیژنز فکالیس JM3 (Alcaligenes faecalis JM3)* وجود دارد که به‌عنوان آریل استونیتریلاز (*arylacetonitrilase*) طبقه‌بندی شده 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 پروتونه کردن 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 زیست‌پالایی می‌توان به این نتیجه رسید که استفاده از موجودات زنده یکی از فناوری‌های 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 ریزوموجودات و نقش کلیدی آنزیم نیتریلاز در فرایند تجزیه سیانید در قارچ‌ها، هدف اصلی این تحقیق بررسی میزان فعالیت این آنزیم تحت تأثیر 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.

غلظت پروتئین

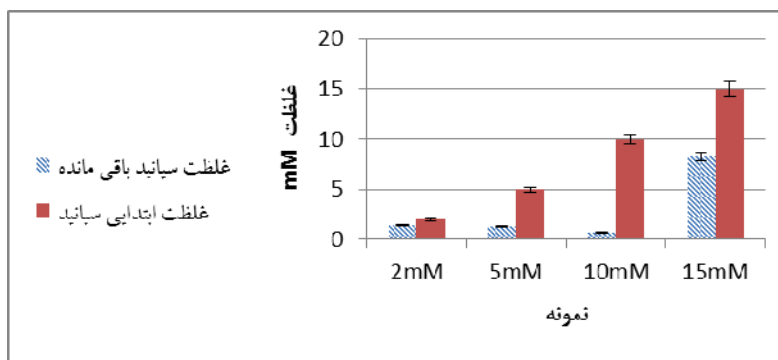
نتایج

در حضور سیانید، پیکریک‌اسید به ایزوپروپیک اسید تبدیل شده 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، 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 پرتفالی روشن تا تیره ایجاد شده‌است.



شکل ۱- تغییر در شدت رنگ محیط‌کشت قارچ حاوی سیانید

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



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

بمنظور بررسی وجود تفاوت معنادار بین داده‌ها از آزمون آماری تی تست استفاده شد.

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

جهت تعیین فعالیت آنزیم نیتریلاز از جذب بنزوئیک اسید در ۲۳۸ نانومتر استفاده گردید. در این روش ۱۵ میکرولیتر از بنزونیتریل ۱۰ میلی مولار در متانول، ۲۵۰ میکرولیتر بافر بافر Tris/ Hcl ۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 8$ ، به همراه ۵ میکرولیتر از آنزیم ترش‌چی در محیط‌کشت در ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه واکنش با ۳۰ میکرولیتر HCl ۱ مولار متوقف می‌شود و جذب در ۲۳۸ نانومتر خوانده شد (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.

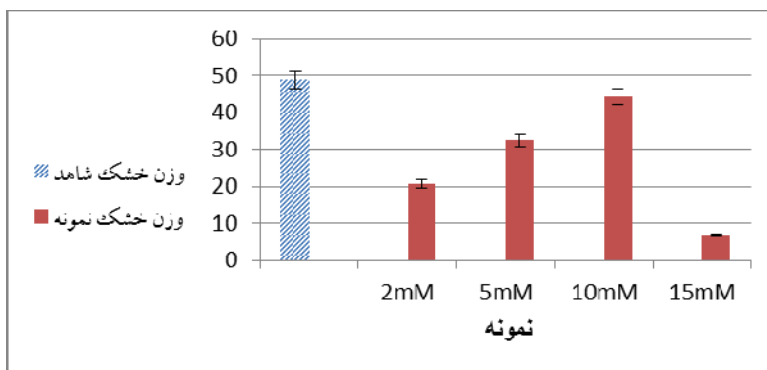
همچنین به منظور محاسبه فعالیت ویژه آنزیم از طریق روش برادفورد غلظت آنزیم ترش‌چی در محیط‌کشت غلظت پروتئین اندازه‌گیری و فعالیت ویژه آنزیم ترش‌چی در محیط‌کشت از رابطه زیر بدست‌آمد:

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

جدول ۱- آزمون t-test در غلظت‌های مختلف سیانید در قارچ پنی سیلیوم

	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	۱/۷۶	۲	۰/۰۰۰
غلظت ۱۵ mM	۶/۶۸ mM	۰/۲۱	۰/۱۲۳	۶/۱۵۳	۷/۲۱	۵۴/۰۵	۲	۰/۰۰۰

نتایج آزمون تی تست نیز حاکی از وجود اختلاف معنادار در مرحله بعد وزن خشک قارچ مطابق آنچه در شکل بین غلظت اولیه اولیه سیانید و غلظت سیانید باقی مانده در محیط کشت قارچ می باشد.



شکل ۳- مقایسه وزن خشک قارچ در غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی مولار و وزن خشک شامه

شکل ۳ نیز نشان می دهد که در اثر اضافه شدن سیانید به محیط کشت قارچ، رشد قارچ متوقف نشده است و قارچ از طریق تجزیه سیانید توانسته است منابع غذایی را در اختیار خود قرار داده و رشد کند و تا غلظت ۱۰ میلی مولار وزن قارچ زیادتر شده است، یعنی منابع غذایی زیادتری در اختیار قارچ بوده است. اما در غلظت ۱۵ میلی مولار رشد قارچ کاهش یافته است، ولی با این وجود این قارچ توانسته در این غلظت نیز زنده بماند و از بین نرفته است.

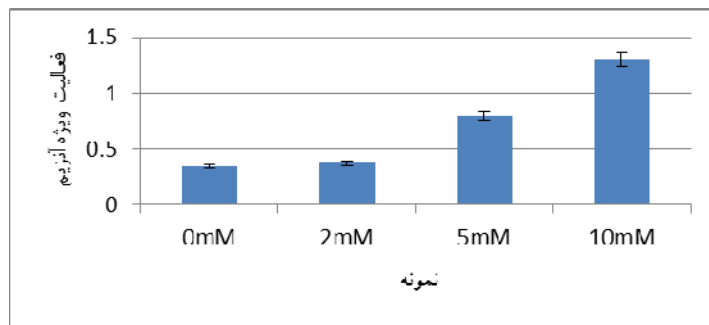
جدول ۲- آزمون t-test مربوط به وزن خشک قارچ پنی سیلیوم در غلظت‌های مختلف

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

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

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 بدست آمد.



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

جدول ۳- فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در غلظت‌های مختلف سیانید

در قارچ پنی سیلیوم

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

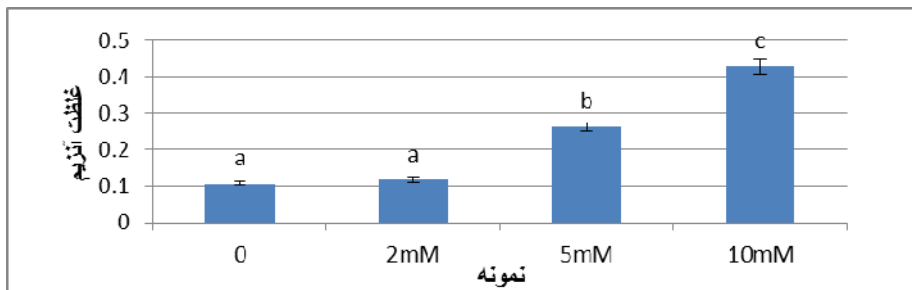
همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد همراه با افزایش غلظت سیانید فعالیت آنزیم نیتریلاز هم بالا می‌رود. در رابطه با فعالیت ویژه آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی سیلیوم نیز، فعالیت ویژه در غلظت‌های مختلف سیانید مطابق جدول ۳ می‌باشد. جدول ۳ بیانگر آن است که با افزایش غلظت سیانید، فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافته‌است.

جدول ۴- تحلیل واریانس غلظت آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی سیلیوم

	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			

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.

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



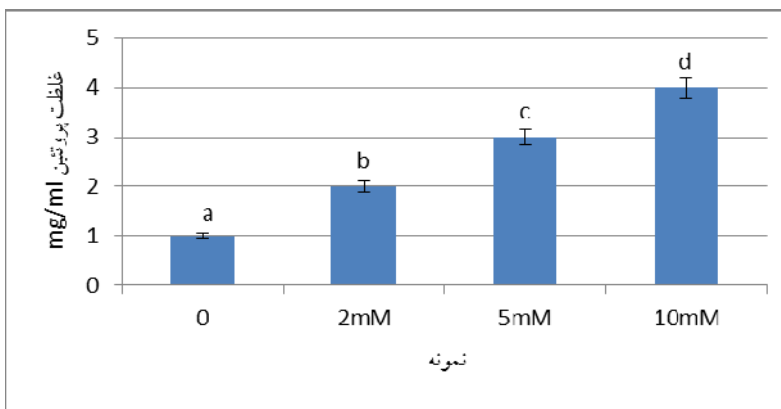
شکل ۵- مقایسات میانگین غلظت آنزیم نیتریلاز در قارچ پنی سیلیوم

جدول ۵- تحلیل واریانس غلظت پروتئین در قارچ پنی سیلیوم

	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			

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 شده است.

جدول ۵ تحلیل واریانس قارچ پنی سیلیوم نشان‌دهنده معنادار بودن آزمون است.



شکل ۶- مقایسات میانگین غلظت پروتئین در قارچ پنی سیلیوم

قارچ نیز کاهش یافته 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

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 یافته است، متقابلاً وزن

هستند. این سویه‌ها از سیانید به عنوان منبع کربن و گلوکز استفاده می‌کنند (۸). آزمایش‌های انجام‌شده سرعت بالای کاتابولیسی سیانید توسط گونه‌های *Trichoderma* را در مقایسه با گونه‌های *Fusarium* نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد اگر گلوکز به عنوان متابولیت همراه باشد، به طور 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 هیدرولیز 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 می‌

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

بارکلی و همکاران (۱۹۹۸) به این نتیجه رسیدند که *Trichoderma solani*, *Fusarium polysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Scytalidium thermophilum*, *Penicillium miczynski* قادر به رشد در محیط کشت با وجود هگزا سیانو فرات $[K_4Fe(CN)_6]$ 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), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30) و *Schizophyllum commune* (D 35) *lucidum* (D 33) پرداخته‌است. از میان آنها، *P. arcularius* و *S. commune* 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*, *Aspergillus pseudokoningi*, *Fusarium oxysporum*, *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

فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده را بالا می‌برد و متقابلاً همراه با بالا رفتن فعالیت آنزیم، میزان تجزیه سیانید افزایش یافته و در نتیجه منابع کربن و نیتروژن بیشتری در اختیار قارچ قرار گرفته که منجر به رشد بیشتر قارچ شده است. 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 ریزوموجودات، می‌توان میزان تجزیه زیستی توسط آن‌ها را افزایش داد.

پردازند. 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 پنی-سیلیوم 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 یافته است، بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که اضافه کردن سیانید به محیط‌کشت دارای اثر القایی است و

منابع

۳. محسنی، م. س، فیروزیار و ا، نظری. (۱۳۹۴)، جداسازی و بررسی ویژگی‌های باسیلوس MF3 تجزیه‌کننده سیانید در شرایط قلیایی، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۳.

۱. اخوت، س. م و زاد، س. ج. (۱۳۸۴)، قارچ‌شناسی و بیماری‌های قارچی گیاهی، ص ۳-۱۳.

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

4. Adams, G. P, Fufeyin. S, Okoro and I, Ehinomen. (2015), "Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: 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", Applied 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. Kitleartpornpaioat, 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, Igeño. M, Mart'nez-Luque. C, Moreno-

- Vivián. F, Castillo and M, Roldán. (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-Collaço. (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. Kitleartpornpairat. (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, Kubačca. D, Davidovaa. A, Kaplana.O, Sulca.b. M, Svedaa. 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

¹Dept. 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