زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 2، پاییز و زمستان 1394

تجزیه زیستی بنزآمید توسط سویه‌های بومی *آکروموباکتر*

نرجس رمضانی‌پور[1]، ارسطو بدویی دلفارد[2*]، عبدالحمید نمکی شوشتری[3]، زهرا کرمی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
2- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
3- دانشیار ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
4- استادیار بیوفیزیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

* کرمان، صندوق پستی 76169133
Badoei@uk.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/12/25 پذیرش مقاله: 94/2/9)

چکیده- آمیدها، ترکیباتی سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا هستند. باکتری‌های مولد آمیداز با تجزیه زیستی این ترکیبات، موجب حذف یا تبدیل آن‌ها از محیط زیست می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف بررسی پتانسیل هیدرولیز بنزآمید توسط سویه‌های بومی *آکروموباکتر* جدا شده از فاضلاب شهر کرمان انجام شد. جداسازی باکتری‌های هیدرولیز کننده بنزآمید با نمونه‌گیری از فاضلاب شهر کرمان و استفاده از روش غنی‌سازی در محیط MM_1 با یک درصد بنزآمید و در حضور شناساگر برموتیمول بلو انتخاب شدند. در مجموع 7 سویه باکتریایی هیدرولیز کننده بنزآمید جداسازی گردید. از این بین، 2 سویه به نام‌های AB37 و FA1 با پتانسیل هیدرولیز بنزآمید، به عنوان سویه‌های برتر شناخته شدند. در فرایند بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم، مشخص شد که گلوکز، پپتون، کلسیم و pH 7/0 تولید آنزیم را در دو سویه افزایش می‌دهند. گلوکز 3 برابر و کلسیم 2/6 برابر میزان تولید آنزیم در سویه FA1 را افزایش داده‌اند. پتانسیل هیدرولیز بنزآمید نشان داد که سویه AB37 در زمان 15 ساعت بیشترین هیدرولیز بنزآمید و آمونیاک تولیدی را به میزان 1/79 و 1/26 میلی‌مولار در غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید دارد. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن 16S rRNA باکتری‌های جداسازی شده به عنوان *آکروموباکتر زایلوکسیدان* و *آکروموباکتر اسپانیوس* شناسایی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های جداسازی شده فعالیت قابل توجهی را در هیدرولیز بنزآمید دارند. بنابراین ارزیابی پتانسیل آنزیمی و کاربردی این سویه‌ها به منظور هیدرولیز بنزآمید از فاضلاب شهری، صنایع و پساب کشاورزی پیشنهاد می‌شود.

کلید واژگان: جداسازی، *آکروموباکتر*، بنزآمید، تجزیه زیستی.

1- مقدمه

ترکیبات آمیدی با ساختار کلی $CO.NH_2$– همواره به عنوان واسطه در مسیر سنتز و تجزیه ترکیبات شیمیایی مؤثر تولید و مصرف می‌شوند. صنایع مختلف، انواع خطی و حلقوی آمیدها را در زمینه‌های مختلف مانند تولید علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، دارو، محصولات آرایشی و بهداشتی و ... به مصرف می‌رسانند [1]. در کنار مصرف مستقیم این ترکیبات، برخی از آن‌ها در صنایع شیمیایی به

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

صورت محصول جانبی تولید و در شکل فاضلاب یا پساب به محیط آزاد می‌شوند. آزادسازی این ترکیبات مسأله‌ای است که در کنار تمامی جنبه‌های مثبت، باید به آن توجه داشت. این ترکیبات آمیدی رها شده، بسیار سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا بوده و در صورت عدم کنترل بر آزادسازی آن‌ها به عنوان ترکیبات پرخطر زیستی به شمار می‌روند [2]. بنزآمید یکی از ترکیبات آمیدی حلقوی است که در مسیر سنتز بسیاری از ترکیبات آلی به خصوص سموم کشاورزی مانند زوکسآمید و پروپیزآمید (با نام تجاری کرب) به عنوان حدواسط تولید می‌شود. این ترکیب از طریق فاضلاب و پساب کشاورزی به هوا (بخار بنزآمید)، خاک و آب وارد می‌شود. در این میان یکی از مهمترین نگرانی‌های سازمان بهداشت جهانی، مسأله مصرف رو به افزایش گروه‌های مختلف آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها می‌باشد. افزایش جمعیت و به دنبال آن افزایش مصرف مواد غذایی، به ویژه محصولات کشاورزی، کشاورزان را بر آن داشته است که میزان محصولات خود را افزایش دهند. افزایش کشت محصولات، افزایش سموم آفت‌کش و علف‌کش را به همراه داشته است. به دلیل بی‌توجهی کشاورزان در مصرف سموم، ریزش‌های جوی و چندین عامل دیگر، سموم کشاورزی وارد محیط زیست می‌شوند [3]. سموم مشتق شده بنزآمیدی با ساختار حلقوی از جمله سمومی هستند که پس از رها شدن در محیط زیست با مهار آنزیم پلیمراز-1 نقش اصلی در سمیت انسان و سایر موجودات دارند [4]. بنابراین تجزیه زیستی این ترکیبات آمیدی سمی با توجه به اثرات بهداشتی زیان‌آور، از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. آمیداز یا آمیدوهیدرولاز یکی از اعضای گروه نیتریل هیدرولازها است [5]. این آنزیم واکنش تبدیل آمیدها به اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند و به عنوان کاتالیزورهای زیستی در تصفیه زیستی فاضلاب نقش دارد [6]. از جمله گزارش‌های منتشر شده در رابطه با باکتری‌های مولد آمیداز هیدرولیز کننده بنزآمید می‌توان به فعالیت آنزیمی باکتری *Enterobacter aerogenes* به میزان 54/82 درصدی در مقایسه با بوتیرآمید به عنوان کنترل اشاره نمود [7]. همچنین کوبایاشی و همکاران در 1998، توانایی 0/00022 درصدی هیدرولیز بنزآمید به عنوان سوبسترا در باکتری *Rhodococcus rhodochrous* J1 را در مقایسه با بنزونیتریل نشان دادند [8]. به این ترتیب، هدف از این پژوهش، بررسی پتانسیل هیدرولیز ترکیب آمیدی حلقوی بنزآمید، توسط سویه‌های بومی *آکروموباکتر زایلواکسیدان* جدا شده از فاضلاب است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه‌برداری

در این مطالعه، تعداد 5 نمونه فاضلاب از مناطق مختلف شهر کرمان جمع آوری و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

2-2- غربالگری باکتری‌های هیدرولیز کننده بنزآمید

فعالیت هیدرولیزی مطابق با روش سانتاشکومار و همکاران در سال 2010 با استفاده از محیط کشت حداقلی (MM_1) (اسیدیته 7) حاوی 6/8 گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، 1/2 گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، 0/1 گرم سولفات منیزیم، 0/1 گرم سولفات منگنز، 0/1 گرم کلسیم دی‌کلرید، 0/1 گرم سولفات آهن، 0/006 گرم سدیم مولیبدات، 0/02 گرم برموتیمول بلو، 1 درصد (W/V) بنزآمید به عنوان منبع کربن و انرژی، 15 گرم آگار و 1000 میلی‌لیتر آب مقطر مورد بررسی قرار گرفت [9]. برای غنی‌سازی باکتری‌های هیدرولیز کننده بنزآمید، حجم 5 میلی‌لیتر از نمونه آب به محیط کشت مایع MM_1 حاوی یک درصد (W/V) سوبسترای بنزآمید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن تلقیح گردید. ارلن‌ها در دمای 30 درجه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

سانتی‌گراد و 160 rpm به مدت یک هفته درون شیکر-انکوباتور گرماگذاری شدند. هر 3 روز یکبار از ارلن‌ها به محیط تازه تلقیح گردید [9]. در پایان، برای جداسازی باکتری‌های مولد آمیداز هیدرولیز کننده بنزآمید، میزان 100 میکرولیتر از محیط کشت غنی شده، به محیط کشت جامد MM_1 حاوی 100 میکرولیتر بنزآمید که حاوی 0/02 درصد برموتیمول بلو به عنوان شناساگر بود، تلقیح شد و پلیت‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در همه آزمایش‌های انجام شده به منظور یکسان بودن تعداد باکتری‌های مورد آزمایش از یک غلظت مشخص باکتری (OD=0.4) استفاده شد. بنزآمید ابتدا با غلظت مورد نظر تهیه و پس از فیلتر شدن به محیط‌های جامد قبل از کشت دادن باکتری افزوده شد. برموتیمول بلو بعنوان یک معرف pH مورد استفاده قرار می‌گیرد که آزاد شدن آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط و آبی‌رنگ شدن محیط کشت می‌شود. پس از رشد در دمای 30 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آمیدازی در این آزمون به وسیله ناحیه آبی‌رنگ اطراف کلنی‌ها مشخص شد. با اندازه‌گیری میانگین قطر هاله رشد و فعالیت آنزیمی در مدت زمان 30 ساعت، برترین باکتری‌های مولد آمیداز هیدرولیز کننده بنزآمید انتخاب شدند.

2-3- اندازه‌گیری فعالیت آمیداز

در این پژوهش، به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم آمیداز، از روش رنگ‌سنجی توصیف شده توسط فاست و اسکات در سال 1960 استفاده شد [10]. به مقدار 100 میکرولیتر محلول رویی محیط مایع حاوی باکتری/محیط کشت فاقد باکتری، 100 میکرولیتر بنزآمید 25 میلی‌مولار و 200 میکرولیتر بافر فسفات 50 میلی‌مولار با اسیدیته 7 اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 20 دقیقه در دمای 45 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از آن، مقادیر 400 میکرولیتر محلول A (فنل 0/59 مولار و سدیم نیتروپروساید 1 میلی‌مولار) و 400 میکرولیتر محلول B (سدیم هیپوکلریت 0/11 مولار و سدیم هیدروکسید 2 مولار) به آن اضافه شد. در نهایت مقدار آمونیاک آزاد شده پس از پدیدار شدن رنگ آبی در طول‌موج 600 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهدی که در آن آنزیم پس از انکوباسیون مخلوط واکنش به آن اضافه شده بود استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیم برحسب واحد بین‌المللی (IU) با استفاده از منحنی استاندارد آمونیوم کلراید محاسبه شد [11].

2-4- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌ها

برخی از ویژگی‌های شکل‌شناسی و بیوشیمیایی دو سویه انتخاب شده به کمک رنگ‌آمیزی گرم و برخی تست‌های بیوشیمیایی-میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند [12]. شناسایی تکمیلی باکتری‌ها به وسیله آنالیز ژن 16S rRNA صورت پذیرفت. به وسیله پرایمرهای Forward:

T_m = 53.7 ºC با 5' AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

و پرایمر Reverse:

T_m = 53.4 ºC با 5́-GGCTACCTTGTTAACGACT-3́

قطعه 1500 جفت بازی مربوط به ژن 16S rRNA تکثیر گردید. واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 2 میکرولیتر DNAی الگو، 0/5 میکرولیتر از هر پرایمر، 2 میکرولیتر dNTP Mix 100 mM، 1 میکرولیتر (50 mM) $MgCl_2$، 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 0/2 میکرولیتر آنزیم DNA Taq Polymerase و 16/8 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام گردید. در ادامه، واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad با شرایط دمایی یک دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و در ادامه 30 چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای 52 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، تکثیر در دمای 72

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز 1 درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه ژل-اسکن مشاهده و عکس‌برداری شدند. سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA توسط شرکت بیونیر (کره) تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rRNA سویه هیدرولیز کننده به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی-های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد [13]. به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف16S rRNA با سویه، تعیین شد. همچنین، توالی به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره دستیابی ژنی[7] مربوطه دریافت شد. درخت فیلوژنی توالی سویه با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به کمک نرم‌افزار MEGA5 نیز رسم شد [14].

2-5- بررسی میزان تغییرات pH و هیدرولیز بنزآمید در طی زمان

برای تعیین بهترین زمان فعالیت هیدرولیزکنندگی بنزآمید به وسیله آمیداز، 2 باکتری در محیط MM_1 حاوی یک درصد بنزآمید و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و rpm 160کشت داده و به مدت 3 روز با روش فنل-هیپوکلریت میزان آمونیاک آزاد شده از فعالیت آنزیمی و هیدرولیز بنزآمید آن‌ها اندازه‌گیری گردید. به این ترتیب، بازه زمانی که در آن بیشترین غلظت آمونیاک آزاد در محیط حاصل شود، به عنوان زمان بهینه فعالیت در نظر گرفته شد. هم‌زمان با تعیین بهینه زمان فعالیت آمیدازی و هیدرولیز بنزآمید، pH اولیه محیط کشت MM_1 نیز اندازه‌گیری (7/0 pH) و سپس در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت نیز pH محیط تعیین شد. علاوه بر رشد باکتری، آمونیاک آزاد شده در اثر فعالیت آمیدازی و هیدرولیز بنزآمید نیز باعث تغییر pH محیط می‌شود که در این آزمایش سنجیده گردید [9].

2-6- بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف

برای بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم، هر سویه به مدت 48 ساعت در محیط MM_1 حاوی بنزآمید در حضور منابع مختلف کربن (گلوکز، مالتوز، فروکتوز و نشاسته) با غلظت 10 گرم بر لیتر، نیتروژن (پپتون و عصاره مخمر) با غلظت 5 گرم بر لیتر، و یکی از یون‌های کلسیم، منیزیم، سدیم، آهن با غلظت 2 گرم بر لیتر و اسیدیته (5، 6، 7، 8) انکوبه شد. از محیط تولید بدون منابع به عنوان شاهد سنجش استفاده شد. در زمان تغییر هر منبع فقط از محیط MM1 و بنزامید استفاده می‌شود [15]. بنزامید هم بعنوان منبع کربن و هم بعنوان منبع نیتروژن توسط باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. سنجش فعالیت آنزیمی بر اساس آمونیاک تولیدی طبق روش فنل-هیپوکلریت در زمان‌های 24 و 48 ساعت انجام شد [16].

2-7- بررسی میزان هیدرولیز بنزآمید

توانایی رشد و هیدرولیز غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در محیط مایع MM1 بررسی شد. در این مرحله، حجم 500 میکرولیتر از باکتری رشد یافته در محیط نوترینت براث به 50 میلی‌لیتر ارلن‌های محیط MM1 حاوی بنزآمید 2 و 5 میلی‌مولار تلقیح و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و rpm 160 به مدت 72 ساعت گرماگذاری شد. سنجش میزان رشد و تولید آمونیاک در بازه‌های زمانی 24 ساعت یک بار و به مدت 3 روز انجام شد. وزن خشک باکتریایی نیز بعنوان معیاری از میزان رشد باکتری در نظر گرفته شد. توانایی استفاده سویه باکتریایی از بنزآمید از طریق سنجش رشد و همچنین میزان آمونیاک تولیدی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

3- نتایج

3-1- غربال‌گری باکتری‌های هیدرولیز کننده بنزآمید

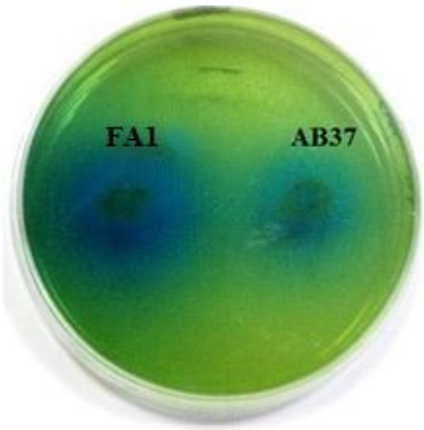
در این مطالعه، از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده، 40 کلنی جداسازی گردید. از این میان 7 کلنی بر روی محیط MM_1 حاوی بنزآمید و برموتیمول بلو رشد کردند. این امر نشان‌دهنده توانایی تولید و فعالیت آنزیم می‌باشد. این سویه‌ها با ترشح آنزیم نیتریل هیدرولازی، بنزآمید موجود در محیط کشت را به آمونیاک و اسید تجزیه کرده و در نتیجه اطراف کلنی به دلیل تغییر pH محیط و حضور معرف برموتیمول بلو هاله آبی‌رنگ ایجاد می‌شود. با توجه به جدول 1 با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده از فعالیت آنزیم از میان 7 کلنی، 2 سویه AB37 و FA1 که توانایی ایجاد کمترین قطر رشد و بیشترین قطر فعالیت را بر روی محیط حاوی برموتیمول بلو داشته، برای ادامه کار در مراحل بعدی انتخاب شدند. در شکل 1 قطر هاله ایجاد شده از تولید آنزیم و فعالیت هیدرولیز کنندگی بنزآمید توسط دو سویه برتر نشان داده شده است.

3-2- بررسی میزان هیدرولیز بنزآمید در طی زمان

نمودار میزان هیدرولیز سوبسترای بنزآمید و تغییرات pH محیط کشت ناشی از رشد و فعالیت آنزیم دو سویه برتر در بازه زمانی 0 تا 72 ساعت (هر 24 ساعت یک بار) رسم گردید (شکل 2). نتایج، فعالیت قابل‌توجه آمیدازی در محیط خارج سلولی را نسبت محیط داخل سلولی نشان می‌دهد. با وجود تفاوت بین فعالیت هیدرولیز کنندگی، دو سویه باکتریایی در بازه زمانی 48-24 ساعت بیشترین میزان فعالیت را نشان دادند. همزمان با تعیین زمان بهینه فعالیت در مدت 3 روز، pH محیط کشت نیز اندازه‌گیری شد. pH اولیه محیط کشت 7/0 بود که بعد از 24 ساعت میزان آن افزایش یافت و محیط قلیایی‌تر شد (شکل 2). افزایش pH در دو سویه باکتریایی در بازه زمانی 48-24 ساعت مشاهده گردید.

جدول 1 میانگین قطر هاله رشد و فعالیت سویه‌ها در محیط جامد MM1 حاوی برموتیمول بلو (میلی‌متر)

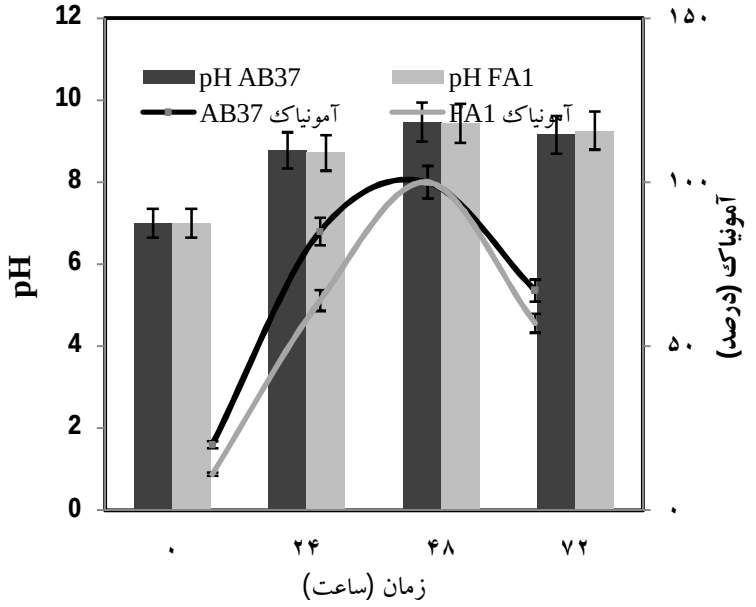
شماره دسترسی	قطر هاله رشد	قطرهاله فعالیت	سویه
KM229750.1	5 ± 0/5	35 ± 2	**FA1**
KM229751.1	18 ± 0/5	29 ± 2	**AB37**
KM229756.1	13 ± 0/5	27 ± 2	**FA13**
KM229755.1	19 ± 0/5	22 ± 2	**FA6**
KM229758.1	9 ± 0/5	19 ± 2	**FA29**
KM229754.1	16 ± 0/5	18 ± 2	**SH36**
KM229759.1	10 ± 0/5	13 ± 2	**AKH10**



شکل 1 بررسی میزان فعالیت آنزیمی و هیدرولیز بنزآمید دو سویه برتر در محیط جامد MM_1 حاوی بنزآمید و برموتیمول بلو پس از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 30 درجه سانتی‌گراد

بیشینه فعالیت و تغییر pH در زمان 48 ساعت انکوباسیون گزارش شد که این مطلب با زمان بهینه فعالیت سویه نیز مطابقت دارد. با توجه به نمودار، در هر دو سویه بعد از 48 ساعت (زمان بهینه فعالیت)، روند افزایش pH محیط متوقف و حرکت نزولی مشاهده شده است که این مطلب بیانگر ارتباط فعالیت هیدرولیز کنندگی بنزآمید با تغییرات pH محیط می‌باشد. به طوری که با کاهش میزان سوبسترا در محیط به تدریج از فعالیت آنزیمی کاسته شده و میزان آمونیاک تولیدی و pH کاهش می‌یابد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]



شکل 2 میزان آمونیاک تولیدی از هیدرولیز بنزآمید و تغییرات pH محیط ناشی از آن در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون دو سویه

از طرف دیگر، استفاده باکتری از محصولات تولیدی نیز بر روند کاهش pH بی‌تاثیر نیست. به این ترتیب، دو سویه برای تعیین شرایط بهینه فعالیت آنزیم و سایر مطالعات بعدی، مورد بررسی قرار گرفتند.

3-3- بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف

نتایج حاصل از اثر منابع مختلف کربن، نیتروژن، یون و pH بر رشد و تولید آنزیم باکتری AB37 و FA1 در جدول‌های 2، 3، 4 و 5 آمده است. در باکتری AB37 نشاسته، فروکتوز و مالتوز، با غلظت 10 گرم بر لیتر در مقایسه با کنترل فعالیت آنزیم را کاهش داده‌اند. این در حالی است که گلوکز در مقایسه با کنترل، منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم شده است. در باکتری FA1، فعالیت آنزیم در مقایسه با کنترل، با حضور هر 4 منبع استفاده شده افزایش یافته است که در مورد قند ساده گلوکز و قند دی‌ساکاریدی مالتوز، این مقدار به صورت تقریبی 1/5 برابر کنترل به دست آمده است. در بررسی بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم با منابع مختلف یون (2 گرم بر لیتر)، دو منبع یونی سدیم و کلسیم به میزان 1/5 تا 2 برابر کنترل، موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم در دو سویه شده است. همچنین کاهش میزان 20 و 80 درصدی فعالیت آنزیمی در حضور منبع آهن در دو باکتری AB37 و FA1 نیز مشاهده گردید. نتایج حاصل از مقایسه دو منبع نیتروژنی پپتون و عصاره مخمر با غلظت 5 گرم بر لیتر نشان می‌دهد که در مقایسه با کنترل، هر دو منبع ذکر شده بین 5 تا 10 برابر افزایش در میزان فعالیت آنزیم دو باکتری ایجاد کرده است.

جدول 2 میزان فعالیت آنزیم دو سویه FA1 و AB37 در حضور منابع مختلف کربن

منبع کربن	AB37	FA1
کنترل	100	100
گلوکز	134 ±0/2	308 ±0/2
فروکتوز	78 ±0/2	130 ±0/2
مالتوز	58 ±0/2	290 ±0/2
نشاسته	69 ±0/2	180 ±0/2

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

جدول 3 میزان فعالیت آنزیم دو سویه FA1 و AB37 در حضور منابع مختلف یون

منبع یون	AB37	FA1
کنترل	100	100
کلسیم	145 ±0/4	266 ±0/4
منیزیم	114 ±0/4	173 ±0/4
سدیم	164 ±0/4	209 ±0/4
آهن	85 ±0/4	20 ±0/4

جدول 4 میزان فعالیت آنزیم دو سویه FA1 و AB37 در حضور منابع مختلف نیتروژن

منبع نیتروژن	AB37	FA1
کنترل	100	100
پپتون	370 ±0/05	223 ±0/05
عصاره مخمر	124 ±0/05	161 ±0/05

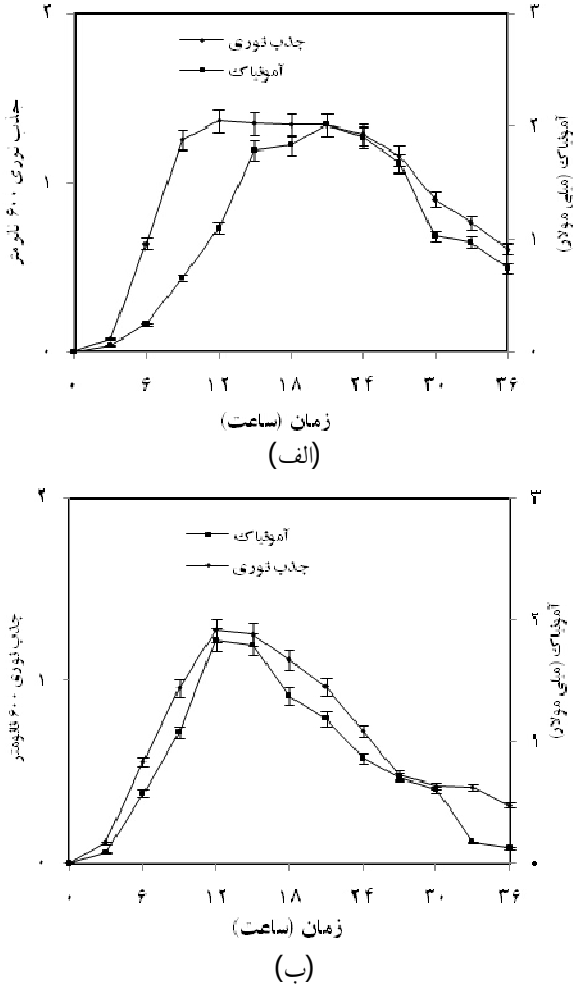
جدول 5 میزان فعالیت آنزیم دو سویه FA1 و AB37 در حضور منابع مختلف pH

منبع pH	AB37	FA1
5	55 ±0/05	58 ±0/05
6	93 ±0/05	95 ±0/05
7	100	100
8	83 ±0/05	78 ±0/05

آنچه که از مشاهده نتایج اثر pHهای مختلف در هر دو باکتری مشاهده گردید، بهینه فعالیت آنزیم هر دو سویه باکتریایی در pH 7 است. در تمامی آزمایش‌ها محلول کنترل، محلولی است که تمامی اجزای واکنش به غیر از پارامتر مورد استفاده را دارا می‌باشد.

3-4- بررسی میزان هیدرولیز غلظت‌های مختلف بنزآمید

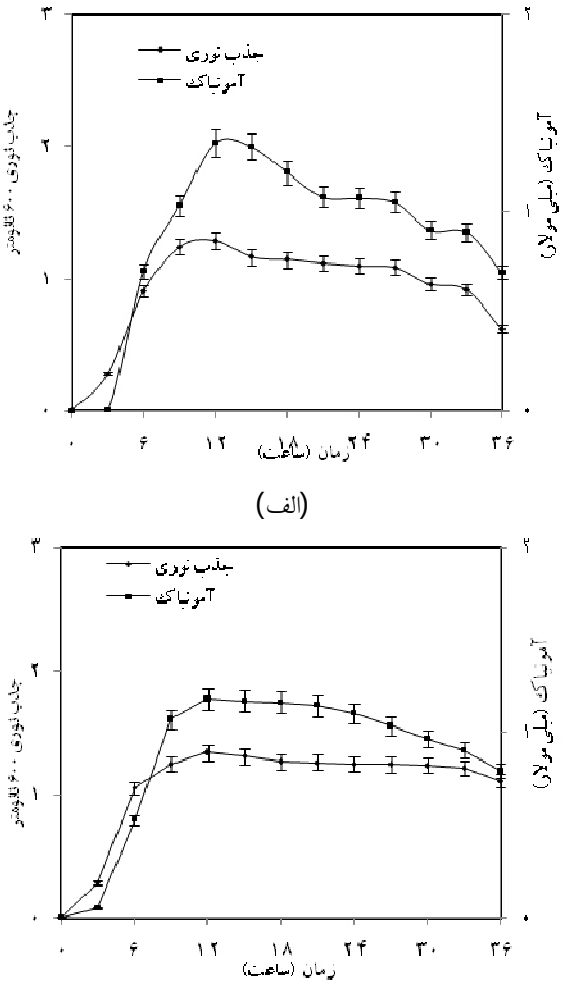
میزان رشد و توانایی هیدرولیز بنزآمید به وسیله دو سویه باکتریایی در حضور غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار سوبسترا در زمان 36 ساعت و فواصل زمانی 3 ساعت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نمودارهای حاصل از رشد در طول موج 600 نانومتر و میزان آمونیاک تولید شده ناشی از هیدرولیز دو غلظت 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید رسم گردید (شکل‌های 3 و 4). نتایج در سویه FA1، بیشینه رشد و فعالیت آنزیمی در حضور غلظت 2 میلی-مولار بنزآمید در مقایسه با غلظت دیگر را نشان می‌دهد. زمان 15 ساعت پس از انکوباسیون، زمانی است که باکتری بیشینه رشد، تولید آنزیم و هیدرولیز سوبسترای بنزآمید را در هر دو غلظت نشان داده است.



شکل 3 منحنی رشد و میزان آمونیاک تولیدی حاصل از هیدرولیز بنزآمید توسط سویه FA1. الف) غلظت 2 میلی‌مولار، ب) غلظت 5 میلی‌مولار

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

پس از آن به تدریج روند کاهش در رشد و فعالیت باکتری مشاهده می‌شود به طوری که پس از گذشت 36 ساعت از انکوباسیون باکتری، میزان آمونیاک تولید شده در غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار به ترتیب به میزان 0/74 و 0/13 میلی‌مولار می‌باشد (شکل 3).



شکل 4 منحنی رشد و میزان آمونیاک تولیدی حاصل از هیدرولیز بنزآمید توسط سویه AB37. الف) غلظت 2 میلی‌مولار. ب) غلظت 5 میلی‌مولار

نتایج در مورد سویه AB37، نیز نشان می‌دهد که این سویه در زمان 15 ساعت دارای بیشینه رشد و فعالیت آنزیمی به مانند سویه FA1 در حضور غلظت 2 میلی‌مولار بنزآمید می‌باشد (شکل 4). زمان 15 ساعت پس از انکوباسیون، زمانی است که این باکتری بیشینه رشد، تولید آنزیم و هیدرولیز سوبسترای بنزآمید را در هر دو غلظت نشان داده است. پس از آن روند ثابتی در میزان تولید و فعالیت آنزیمی در مقایسه با میزان رشد برای غلظت 5 میلی‌مولار بنزآمید مشاهده گردید. در پایان بررسی نیز (زمان 36 ساعت) مقادیر 0/70 و 0/79 میلی‌مولار آمونیاک در غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید مشاهده گردید (شکل 4).

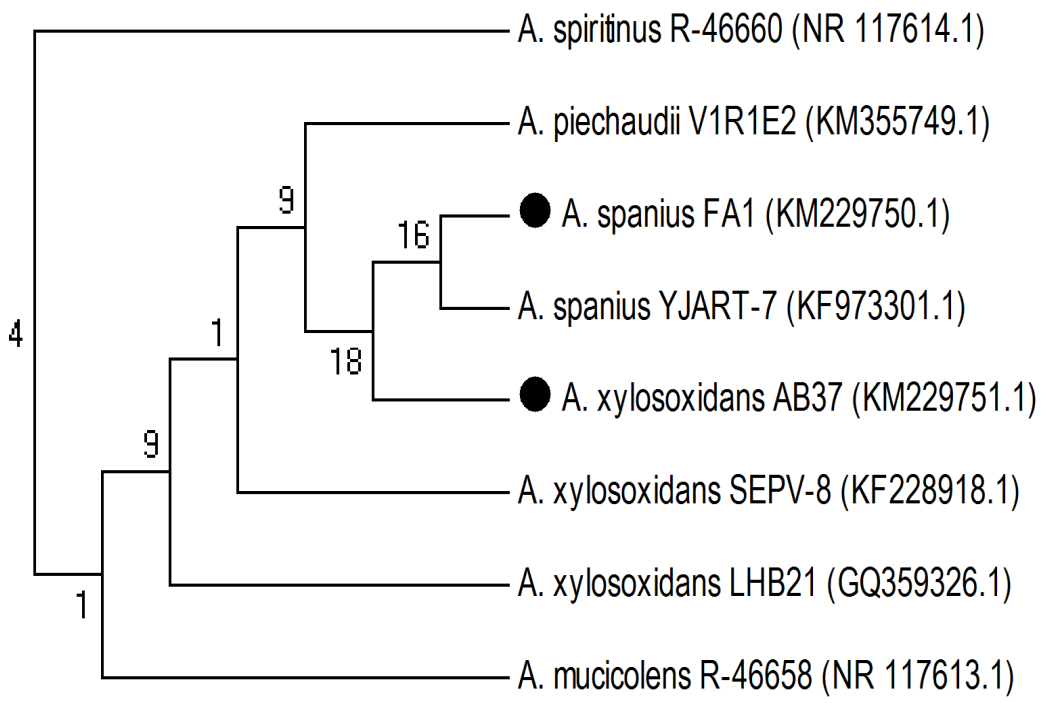
3-5- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

نتایج حاصل از شناسایی با برخی تست‌های بیوشیمیایی- میکروبی نشان داد که دو سویه AB37 و FA1 از جمله باکتری‌های کوکوباسیل، گرم منفی، هوازی و متحرک هستند. در روش مولکولی نیز، نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن16S rRNA، حضور باند 1500 جفت بازی را تأیید نمود. بیشترین درصد تشابه توالی‌های بلاست شده با توالی‌های موجود در باکتری‌های دیگر در پایگاه مرکز ملی بیوتکنولوژی (NCBI) به عنوان جنس و گونه دو باکتری تعیین گردید. آنالیز توالی ژن16S rRNA نشان داد که دو سویه به جنس *آکروموباکتر* تعلق داشتند. درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 رسم شد (شکل 5). همچنین توالی‌های دو سویه متعلق به *آکروموباکتر زایلواکسیدان* و *آکروموباکتر اسپانیوس* در پایگاه داده‌های ژنی مرکز ملی بیوتکنولوژی ثبت و شماره دسترسی به ترتیب KM229751.1 و KM229750.1 دریافت گردید.

4- بحث

در مطالعه حاضر، دو سویه باکتریایی با بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و تجزیه سوبسترای بنزآمید جداسازی و شناسایی شدند. بررسی‌های بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که این دو سویه به جنس *آکروموباکتر* تعلق دارند.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]



شکل 5 درخت فیلوژنیتیکی حاصل از توالی ژن 16s rRNA دو سویه هیدرولیز کننده بنزآمید که به جنس *آکروموباکتر* نزدیکی نشان دادند

در سال 1997 کرمپ و همکاران از جداسازی باکتری *Bacillus pallidus* Dac521 با توانایی رشد در محیط حاوی بنزآمید گزارشی منتشر کردند [17]. دو سویه AB37 و FA1 مورد مطالعه، در محیط کشت و اطراف ناحیه رشد، هاله آبی‌رنگی ایجاد کرده که توانایی آن‌ها در تولید آنزیم و هیدرولیز بنزآمید را نشان می‌دهد. در اثر هیدرولیز سوبسترا آمونیاک به عنوان محصول اصلی تولید می‌شود. با تجمع آمونیاک در ناحیه رشد باکتری، pH محیط افزایش یافته و هاله آبی‌رنگ در اطراف کلنی باکتری دیده می‌شود. در مطالعه‌ای که هیلد و همکاران در 2001 انجام دادند، از تولید 68 درصد آمونیاک آزاد شده در طی مسیر تبدیل بنزونیتریل به بنزآمید با فعالیت نیتریل هیدرولازی باکتری *Rhodococcus erythropolis* 67-BEN001 گزارش شد [18]. کرمپ و همکاران در 1997 آنزیم آمیداز القایی به وسیله سوبسترای بنزآمید در باکتری *Bacillus pallidus* Dac521 گزارش دادند [17]. در این پژوهش دو باکتری در زمان بهینه 48 ساعت بیشینه فعالیت آنزیمی، تولید آمونیاک و مقدار pH بالای 9/44 را نشان دادند. با بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف کربن، نیتروژن، یون و pH، نشان داده شد که حضور منابعی مانند گلوکز (10 گرم بر لیتر)، کلسیم (2 گرم بر لیتر) و پپتون (5 گرم بر لیتر) در محیط کشت با pH 7/0 موجب افزایش میزان رشد و تولید آنزیم در هر دو سویه مورد مطالعه می‌شود. دانگ و همکاران در 2011، غلظت 20 گرم بر لیتر گلوکز را به عنوان بهترین غلظت در تولید آنزیم نیتریل هیدرولازی نشان دادند. همچنین در مورد باکتری *Rhodococcus erythropolis* ZJB-0910 گزارش شده است که فعالیت باکتری در حضور یون منیزیم افزایش یافته ولی به وسیله یون کلسیم، در محیط کشت مهار شده است که در مورد دو

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

سویه مورد مطالعه خلاف این موضوع به دست آمد [19]. نتایج حاصل از بررسی میزان هیدرولیز غلظت‌های بنزآمید در دو سویه نیز نشان داد که باکتری AB37 بیشینه مقدار هیدرولیز کنندگی بنزآمید را در زمان 15 ساعت پس از انکوباسیون با تولید 1/79 و 1/26 میلی‌مولار آمونیاک در حضور غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید را دارد. این در حالی است که سویه FA1 در زمان یکسان 15 ساعت، بیشینه مقدار تجزیه کنندگی 1/33 و 1/17 میلی‌مولار آمونیاک در حضور غلظت‌های 2 و 5 میلی‌مولار بنزآمید را نشان داده است. به این ترتیب سویه AB37 در هر دو غلظت توانایی بالاتری از خود نشان داده است. در مطالعه‌ای که در 2011 توسط بوراناسیلپ و همکاران صورت گرفت، توانایی باکتری *Enterobacter aerogenes* جدا شده از فاضلاب شهری در هیدرولیز بنزآمید در مقایسه با سوبسترای کنترل بوتیرآمید به میزان 84 /54 درصد نشان داده شد [7].

5- نتیجه‌گیری

بنزآمید، ترکیب بسیار سمی است که با فعالیت صنعتی و کشاورزی انسان، باعث آلودگی گسترده طبیعت به این آلاینده شده است. با جداسازی و شناسایی باکتری‌های هیدرولیزکننده بنزآمید از فاضلاب و پساب آلوده و ایجاد شرایط بهینه تجزیه زیستی، می‌توان با صرف هزینه کمتر و نیز مشکلات زیست‌محیطی کمتر، پساب آلوده به این ترکیب را پالایش کرد.

6- تشکر و قدردانی

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

7- منابع

[1] Nagasawa, T., and Hideaki, Y. (1989) Microbial transformations of nitriles. *Trends. Biotechnol*. 7(6), 153-158.
[2] Vesela, A. B., Franc, M., Pelantova, H., Kubac, D., Vejvoda, V., Sulc, M., and Bhalla, T. C. (2010) Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. *Biodegradation*. 21(5), 761-770.
[3] Lyr, H. (1995) *Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action*. Gustav Fischer, 595.
[4] Kun, E., Kirsten, E., Milo, G. E., Kurian, P., and Kumari, H. L. (1983). Cell cycle-dependent intervention by benzamide of carcinogen-induced neoplastic transformation and in vitro poly (ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(23), 7219-7223.
[5] Pace, H. C., and Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome. Biol*. 2(1), 1-9.
[6] Madhavan, N. K., Roopesh, K., Chacko, S., and Pandey, A. (2005). Comparative study of amidase production by free and immobilised Escherichia coli cells. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 120(2), 97–108.
[7] Buranasilp, K., and Charoenpanich, J. (2011). Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *J. Environ. Sci*. 23(3), 396-403.
[8] Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1989). Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 182(2), 349-356.
[9] Santoshkumar, M., Anand, S., Nayak, O., and Anjaneya, B. (2010). A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 37(3), 111–115.
[10] Fawcett, J. K., and Scott, J. E. (1960). A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol*. 13(2), 156-159.
[11] Cramp, R., Gilmour, M., and Cowan, D. A. (1997). Novel thermophilic bacteria producing nitrile-degrading enzymes. *Microbiol*. 143(7), 2313-2320.
[12] Leavesley, H. B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J. L., and Isom, G. E. (2008). Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol. Sci*. 101(1), 101-111.
[13] Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., and Na, H. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 62(3), 716- 721.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]

[14] Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids. Res.* 17(19), 7843-7853.

[15] Santoshkumar, M., Anand, S., Nayak, O., Timmanagouda, A., and Karegoudar, B. (2010). A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 37(1), 111–115.

[16] Khandelwal, A. K., Nigam, V. K., Choudhury, B., Mohan, M. K., and Ghosh, P. (2007). Optimization of nitrilase production from a new thermophilic isolate. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 82(7), 646–651.

[17] Cramp, R., Gilmour, M., and Cowan, D. A. (1997). Novel thermophilic bacteria producing nitrile degrading enzymes. *Microbiology*. 143(7), 2313–2320.

[18] Heald, S. C., Brandão, P. F., Hardicre, R., and Bull, A. T. (2001). Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 80(2), 169-183.

[19] Dong, H. P., Liu, Z. Q., Zheng, Y. G., and Shen, Y.C. (2011). Medium optimization for nitrilase production by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* ZJB-0910 Using Statistical Designs. *Chem. Biochem. Eng*. 25(3), 351–358.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-08]