

## جداسازی باکتریهای مقاوم به سیانید از سد باطله معدن طلا با کاربرد حذف زیستی

زهرا خمر<sup>۱</sup>، علی مخدومی کاخکی<sup>۲</sup>، محمد حسین محمودی قرایی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی ارشد زمین شناسی زیست محیطی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی

۲ - عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۳ - عضو هیات علمی، گروه زمین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

z.geology90@gmail.com ; a.makhdomi@um.ac.ir

### چکیده

سیانید یک ترکیب نیتروژندار سمی برای موجودات زنده است. این ترکیب با پروتئینهای دارای آهن (مانند سیتوکرومها که در فرآیند تنفس نقش دارند) پیوند ایجاد و آنها را غیرفعال میکند. در طبیعت باکتریها، قارچها، جلبکها و درختان زیادی می توانند سیانید تولید کنند، با این وجود آلودگی محیط زیست به سیانید بیشتر بواسطه فعالیتهای بشر (معدنکاری، آبکاری فلزات و صنایع طلا و جواهرسازی) است. روشهای متفاوتی برای اصلاح پسابهای حاوی سیانید وجود دارد. حذف زیستی سیانید به دلیل این که روشی سازگار با محیط زیست، ارزان و ساده میباشد از بهترین روشها برای حذف این ترکیب آلاینده از محیط است. در این پژوهش به منظور شناسایی میکروارگانیسمهای کارا در حذف سیانید در شرایط قلیایی، باکتریهای قلیادوست مقاوم به سیانید از سد باطله فرآوری طلا در معدن زرمهر (شهرستان تربت حیدریه) جداسازی و سویههای با بیشترین میزان مقاومت شناسایی شدند. ۳۱۳ جدایه باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار با pH ۹ بدست آمد. تعیین حداقل غلظت بازدارنده سویهها در محیط مایع با غلظتهای اولیه سیانید متفاوت نشان داد که از این تعداد: ۹ سویه تا غلظت ۶۰۰ ppm، ۴۷ سویه تا غلظت ۵۰۰ ppm، ۳۷ سویه تا غلظت ۴۰۰ ppm، ۲۲ سویه تا غلظت ۳۰۰ ppm، ۴۵ سویه تا غلظت ۲۰۰ ppm، ۹۵ سویه تا غلظت ۱۰۰ ppm و ۵۸ سویه تا غلظت ۵۰ ppm رشد کردند. باکتریهای جداسازی شده گزینهای مناسبی جهت کاربرد حذف زیستی سیانید از محیطهای آلوده میباشند.

کلمات کلیدی: سیانید، حذف زیستی، باکتریهای قلیادوست

### مقدمه

سیانید به آنیونی با یک بار منفی اطلاق میشود که از اتصال یک اتم کربن به یک اتم نیتروژن با پیوند سهگانه ایجاد شده است. سیانید به صورت ترکیبات آلی و معدنی حاوی گروه CN- مشاهده میشود (۱،۳). طبقهبندی انواع سیانید برحسب خواص فیزیکی و شیمیایی بدین صورت است: یون سیانید، هیدروژن سیانید، نمکهای ساده سیانید، کمپلکسهای فلزی ضعیف سیانید، کمپلکسهای فلزی قوی سیانید، سیانات، تیوسیانات و سیانورهای آلی. در یک محلول، یون سیانید و مولکول هیدروژن سیانید با یکدیگر در تعادل بوده و تغییر نسبت آنها بستگی به pH و دمای محلول دارد (pKa=9.2). نمکهای سیانید در محلول رقیق یونیزه شده و سیانید آن به شکل سیانید آزاد ظاهر میشود (۴). سیانید به دو طریق طبیعی و مصنوعی وارد طبیعت میشود. تولید طبیعی آن به مقدرا کم توسط برخی از باکتریها، جلبکها، قارچها و گیاهان است. (۶)

سیانید در صنایع مختلف آبکاری، رنگسازی، صنایع دارویی و بویژه صنعت فرآوری مواد معدنی مصرف گسترده دارد. در فرآیند استخراج طلا برای استحصال طلا و نقره از کانسنگ، محلول سیانید سدیم به عنوان عامل انحلال و آبشویی این فلزات مورد استفاده قرار میگیرد که پساب حاصل از این فرآیند حجم بسیار زیادی از سیانید را وارد سدهای باطله میکند. (۱،۳) سیانید در غلظت بالا یک سم قوی و فوری روی موجودات زنده است. در بدن انسان وقتی سیانید وارد خون میشود با آنزیم سیتوکروم اکسیداز موجود در میتوکندری سلول تشکیل یک کمپلکس پایدار میدهد و باعث اختلال در عملکرد تنفسی این آنزیم میشود. در چنین شرایطی سلولها قادر به مصرف اکسیژن خون نیستند و در نهایت موجب مرگ میشود. ماهیان و دیگر آبریان نسبت به سیانید حساستر از انسان و دیگر جانوران و گیاهان هستند (۴).

روشهای متعددی برای حذف سیانید پیشنهاد شده است: فرآیند قلیایی کردن، کلر زنی، اکسیداسیون با هوا و فرآیندهای غشایی مانند اسمز معکوس و الکترودیالیز از روشهای حذف سیانید محسوب میشود. بکارگیری این فرآیندها به دلیل عدم حذف کامل سیانید و همچنین هزینههای نسبتا بالا دارای محدودیت است. همچنین این روشها معمولا تولید مقادیر قابل توجهی لجن میکنند که مشکلات زیست محیطی دیگری را به دنبال دارد (۴). روشهای زیستی به دلیل کارایی بالا، ارزان قیمت بودن و عدم تولید آلودگی ثانویه گزینههای مناسبی برای حذف سیانید میباشند. باکتریها قادر به حذف سیانید به هر دو شیوه هوازی و غیرهوازی هستند. سیانید به عنوان منبع کربن و نیتروژن برای رشد باکتریها مورد استفاده قرار میگیرد و تبدیل به آمونیاک و دی اکسید کربن میشود (۵ و ۲). با توجه به تبخیر سیانید در pH کمتر از ۹ باکتریهای بکاربرده شده در حذف زیستی سیانید باید قادر به انجام این فرآیند در شرایط pH قلیایی باشند. پژوهش پیش رو به منظور جداسازی باکتریهای مقاوم به سیانید از سد باطله معدن استخراج طلا و بررسی میزان مقاومت سویههای جداسازی شده و انتخاب سویههای مناسب جهت بکارگیری در حذف زیستی سیانید انجام شده است.

### مواد و روش

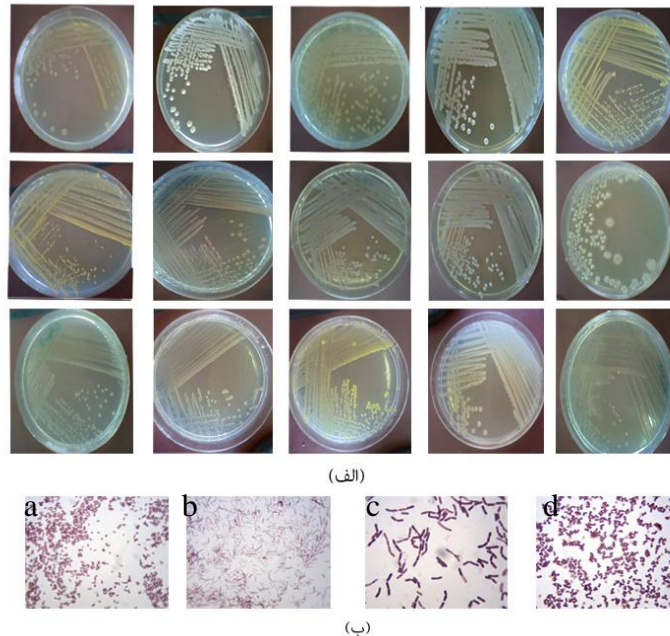
نمونهبرداری: نمونههای محیطی از سد باطله معدن طلای زرمهر واقع در ۳۵ کیلومتری غرب تربت حیدریه در استان خراسان رضوی در ظروف در دار استریل جمعآوری گردید. نمونهها تا زمان انجام آزمایشات در تاریکی و دمای محیط نگهداری شد. در آزمایشگاه غلظت سیانید نمونهها و pH آنها توسط pH متر رومی (Accument, model 15) اندازهگیری شد. جداسازی باکتریها از سد باطله: جهت بدست آوردن حداکثر تنوع باکتریهای ساکن حوضچه باطله روش - محیط های کشت زیر بکار رفته است: (۱) کشت مستقیم نمونه بر روی محیط نوترینت آگار با pH ۹، (۲) کشت نمونه محیطی در محیط نوترینت برات با pH ۹ به همراه ۵۰ ppm سیانید و نگهداری در شیکر انکوباتور ۳۰°C و ۱۵۰ rpm به مدت ۳ روز و انتقال نمونه غنی شده به محیط جامد، (۳) کشت نمونه محیطی در محیط حداقل شامل (گرم در لیتر): NaCl (۲۸)،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (۲۸)،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۱/۱۲۵) (۱۰)، pH ۹، به همراه ۵۰ ppm سیانید و نگهداری در شیکر انکوباتور ۳۰°C و ۱۵۰ rpm به مدت ۳ روز و انتقال نمونه غنی شده به محیط جامد. نمونههای محیطی جامد در دمای ۳۰°C تا زمان مشاهده کلنی باکتریها نگهداری گردید. با انجام کشت های متوالی جدایه های خالص بدست آمدند. تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد<sup>۱</sup>: جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد سیانید بر روی سویههای جدا شده، از محیط کشت نوترینت برات با pH ۹ به همراه غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ ppm سیانید استفاده گردید. با

<sup>1</sup>Minimum Inhibitory Concentration

استفاده از نمک سدیم سیانید (مرک)، محلول ذخیره تهیه و با عبور از فیلتر  $0.22 \mu\text{m}$  استریل گردید. غلظت‌های متفاوت سیانید در ترکیب محیط کشت با افزودن مقادیر مناسب از این محلول ذخیره به محیط کشت استریل تهیه گردید. جدایه‌های میکروبی غلظت معادل  $0.5$  استاندارد مک فارلند تهیه و به میزان  $1\%$  به هر لوله آزمایش تلقیح و در  $30^\circ\text{C}$  نگهداری شد. رشد یا عدم رشد سویه‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز با اندازه‌گیری کدورت لوله آزمایش نسبت به شاهد ارزیابی گردید. اندازه‌گیری میزان سیانید: مقدار سیانید آزاد نمونه محیطی و محیط‌های کشت با استفاده از روش رنگ سنجی اسید باربیتوریک- پریدین در  $578 \text{ nm}$  توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (WPA) اندازه‌گیری شد (۷).

### نتایج و بحث

توصیف محیط نمونبرداری: میزان غلظت سیانید قبل از رسیدن به سد باطله  $500 \text{ ppm}$  و در سد باطله  $200 \text{ ppm}$  اندازه‌گیری شد. pH نمونه محیطی و دمای سد باطله به ترتیب  $10$  و  $28^\circ\text{C}$  بوده است. تفاوت در غلظت سیانید در نمونه خارج شده از کارخانه با نمونه سد باطله نشان دهنده تبخیر سیانید به گاز هیدروژن سیانید و ورود آن به محیط اطراف می‌باشد.



شکل ۱- (الف) برخی از جدایه‌های بدست آمده (ب) بررسی مورفولوژی جدایه‌ها، اشکال کوکوباسیل (a)، باسیل گرم منفی (b)، باسیل گرم مثبت (c) و کوکسی (d) قابل مشاهده است.

### تعیین میزان مقاومت به سیانید در باکتریها

جداسازی باکتریها از نمونه محیطی: در این پژوهش با استفاده از روش - محیط‌های کشت متفاوت  $313$  جدایه بدست آمد. از این تعداد  $153$  سویه باکتریهای گرم منفی (  $119$  سویه باسیل،  $16$  سویه کوکسی و  $18$  سویه کوکوباسیل) و  $160$  سویه باکتریهای گرم مثبت (  $129$  سویه باسیل و  $28$  سویه کوکسی) بوده است. این باکتریهای دارای کلیه‌های با اشکال و رنگ‌های متفاوت و شکل میکروسکوپی متنوع شامل باسیل، کوکسی، کوکوباسیل بودند (شکل ۱).

تعیین مقاومت جدایه‌های میکروبی: سویه‌های میکروبی جدا شده دامنه مقاومت متفاوت نسبت به سیانید داشتند. از ۳۱۳ جدایه بدست آمده ۹ سویه تا غلظت ۶۰۰ ppm، ۷ سویه تا غلظت ۵۰۰ ppm، ۳۷ سویه تا غلظت ۴۰۰ ppm، ۲۲ سویه تا غلظت ۳۰۰ ppm، ۴۵ سویه تا غلظت ۲۰۰ ppm، ۹۵ سویه تا غلظت ۱۰۰ ppm و ۵۸ سویه تا غلظت ۵۰ ppm رشد کردند. از ۹ سویه‌های که بالاترین مقاومت را داشته اند ۶ سویه (Og<sub>3-3</sub>, Og<sub>4-5</sub>, Og<sub>5-9</sub>, L<sub>3</sub>, Hs<sub>6</sub>, OA<sub>1-B</sub>) باسیل گرم مثبت، یک سویه (HA<sub>8</sub>) باسیل گرم منفی، یک سویه (AA<sub>5</sub>) کوکو باسیل گرم منفی، یک سویه (O<sub>14</sub>) باسیل کوتاه گرم مثبت میباشند. یون سیانید در pH خنثی و اسیدی به سیانید هیدروژن تبدیل و تبخیر میشود. سویه‌های میکروبی با توانایی مصرف سیانید در شرایط قلیایی گزینه‌های مناسبی برای حذف زیستی این ترکیبات خطرناک میباشند. سویه‌های باکتریایی بدست آمده در پژوهش با قابلیت مقاومت به مقادیر بالای سیانید هیدروژن و رشد در شرایط قلیایی گزینه‌های مناسبی جهت بکارگیری حذف سیانید از محیط زیست میباشند.

#### منابع و مراجع مورد استفاده

1. Aitimbetov, T., White, D.M., Seth I., 2005, Biological gold recovery from gold-cyanide solutions, Int. J. Miner. Process. 76 .33- 42
2. Akcil, A., Karahan, A.G., Ciftci, H., Sagdic O., 2003, Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (Pseudomonas sp.), Minerals Engineering 16,643-649
3. Boucabeille, C., Bories, A., 1994, MICROBIAL DEGRADATION OF METAL COMPLEXED CYANIDES AND THIOCYANATE FROM MININGWASTEWATERS, Environmental Pollution 84 .59 67
4. Dzombak, D.A., Ghosh, R.S., Wong-Chong, G.M., 2006, Cyanide in water and soil, Published by Taylor & Francis Group, P.602
5. Luque-Almagro, V.M., Huertas, M.J., martinez-Luque, M., Moreno-Vivian, C., Dolores Roldan, M., Garcia-Gil, L.J., Castillo, F. and Blasco, R., 2005, Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 90-947
6. Logsdon, M.J., Hagelstein, K., Mudder, T.I., 1999, The Management of Cyanide in Gold Extraction, ISBN 1-895720-27-37.P.40
7. Maiti, S.K., 2004, Handbook of Methods in Environmental Studies, Vol. 1: Water and Wastewater Analysis, ABD Publishers, P.307

### Isolation of cyanide tolerant bacteria from Gold mine tailings pond with the application in bioremediation

Zhara Khamar<sup>1</sup>, Ali Makhdoumi-kakhki<sup>2</sup>, Mohamad Hosein Mahmudy Gharaie<sup>3</sup>.

#### Abstract:

Cyanide is a toxic nitrogen compound for almost every living organism since it binds irreversibly to haem-proteins, (i.e. cytochromes involved in all known respiratory processes). In the nature, there are bacteria, algae, fungi, and many plants, which are able to produce cyanide. However, the contamination of the environment with cyanide is mainly due to human activities. In this sense, mining, electroplating and jewellery industries generate effluents with a high concentration of cyanide. There are many possible methods for treating wastes containing cyanide, biodegradation of cyanide as environmental friendly, cheap and simple method is one of the best methods for removal of this environmental pollutant compounds. In this study in order to find microorganisms able to remove cyanide alkaline condition, cyanide tolerant alkaliphilic bacteria were isolated from the gold tailings

ponds Zarmehr. A total of 313 strains were isolated on nutrient agar pH 9. Minimal inhibitory concentrations of cyanide were investigated on nutrient broth medium pH 9 supplemented with different concentration of cyanide including 50, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm. Nine strains showed the highest level of cyanide tolerance up to 600 ppm. The isolated strains are good candidate for removal of cyanide from various industrial waste.

Keywords: Cyanide, bioremediation, alkaliphilic bacteria