Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم لیپاز از تالاب میانکاله

صدیقه رجایی ملکی[۱]
سلمان احمدی اسب‌چین[۲*]
باقر سیدعلیپور[۳]
غلامحسین ریاضی[۴]

۱، ۲، ۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، ساری، ایران
۴. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
sahmadyas@yahoo.fr

کد مقاله: ۱۳۹۶۰۳۰۴۸۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۹
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

لیپازها یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در بیوتکنولوژی و شیمی آلی هستند و به عنوان سومین آنزیم صنعتی از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشند. بسیاری از ارگانیسم‌ها توانایی ترشح آنزیم لیپاز را دارند اما در میان آن‌ها باکتری‌ها اهمیت بیشتری دارند چراکه لیپازهای حاصل از باکتری‌ها دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند پایداری بالا و عدم ایجاد واکنش‌های جانبی هنگام کاتالیز می‌باشد. ازآنجایی که پروسه‌های صنعتی همواره تحت شرایط ویژه و سختی انجام می‌شوند، یافتن آنزیم‌هایی با توانایی فعالیت در این شرایط حائز اهمیت است. باکتری‌های نمک‌دوست منبع مناسبی از این آنزیم‌ها می‌باشند، چراکه آنزیم‌های تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند فعالیت خود را در دامنه‌های مختلف دما، غلظت نمک و pH حفظ کنند. در شهریور سال ۱۳۹۴ با هدف جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم لیپاز و بهینه سازی شرایط رشد جدایه‌ها نمونه‌برداری از آب، خاک و رسوب تالاب میانکاله واقع در استان مازندران صورت گرفت. برای کشت و خالص‌سازی، نمونه‌های رقیق‌شده در محیط کشت جامد تلقیح و در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری گردید. غربالگری باکتری‌ها منجر به جداسازی ۱۰ جدایه نمک‌دوست شد. سویه‌ها ازنظر تولید آنزیم لیپاز با استفاده از سنجش به روش پلیت مطالعه شدند. نتایج نشان داد که از میان ۶ جدایه منتخب ۳ جدایه توانایی تولید آنزیم لیپاز را دارند. این باکتری‌ها به طور بهینه در محیطی با ۵-۲/۵ درصد نمک، دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد و رشد می‌کنند. بررسی فیلوژنیک ترادف *16S rDNA* برای ۳ سویه انجام شد. این سویه‌ها از نظر فیلوژنیک در جنس‌های *Halomonas*-و*Halobacillus* قرار گرفتند. این مطالعه نخستین بررسی بر روی باکتری‌های تالاب بین‌المللی میانکاله به عنوان یک اکوسیستم حاصلخیز می‌باشد.

واژگان کلیدی: باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز، نمک‌دوست، جداسازی، تالاب میانکاله.

مقدمه

لیپازها یا تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها (Triacylglycerol) (E.C.3.1.1.3) توانایی کاتالیز دو نوع واکنش هیدرولیز و سنتز انواع چربی‌های طبیعی، تری‌گلیسیریدها و استرهای اسیدچرب را دارا می‌باشند. این آنزیم‌ها به میزان قابل توجهی توسط گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند (Li and Zong, 2001). لیپازها پس از پروتئازها و آمیلازها از نظر فروش در دنیا جایگاه سوم را به خود اختصاص داده‌اند (Kempka *et al*, 2008). پرمصرف‌ترین لیپازها از منظر تجاری لیپازهای تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها با منشأ باکتریایی، قارچی و مخمری هستند. این آنزیم‌ها دارای کاربردهای متنوع در صنایع غذایی، صنایع مواد شوینده، صنعت تولید کاغذ و صنایع دارویی می‌باشند (Aryee *et al*, 2007).

به علت دشواری شرایط شیمیایی در فرایندهای صنعتی، این فرایندها نیازمند حضور آنزیم‌هایی با توانایی ویژه هستند؛ بنابراین دست یافتن به آنزیم‌هایی با فعالیت بهینه در دامنه‌های مختلف دما، pH و غلظت نمک می‌تواند حائز اهمیت باشد. باکتری‌های نمک‌دوست (Halophiles) می‌توانند منبع مناسب این آنزیم‌ها باشند. نمک‌دوست‌ها موجوداتی هستند که قابلیت زندگی در محیط‌های نمکی را دارند. آن‌ها شرایط سخت شوری را تحمل می‌کنند و به علت دارا بودن ظرفیت تنظیم فشار اسمزی، در برابر اثرات تخریبی نمک از خود مقاومت نشان می‌دهند. آنزیم‌های

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

تولیدشده توسط این میکروارگانیسم‌ها نه تنها می‌توانند در شوری‌های مختلف فعالیت کنند، بلکه تحمل‌کننده دماها و pHهای مختلف نیز می‌باشند (Das Sarma *et al*, 2001; Gomez and Steiner, 2004; Ventosa *et al*, 1998).

کشف این باکتری‌ها در اواسط قرن ۱۹ پس از مشاهده یک توده چسبناک قرمز رنگ با بوی نامطبوع در مواد نگهداری شده با نمک اتفاق افتاد. با آغاز قرن ۲۰ توجه ویژه به مطالعه و بررسی توانایی‌های مربوط به تولید آنزیم‌های هیدرولازی این میکروارگانیسم‌های افراطی‌پسند معطوف گردید (Ventosa and Nito, 1995). در سال ۲۰۰۵ Kazumi و همکاران بر روی تولید و خالص‌سازی آنزیم سرین پروتئاز توسط باکتری نمک‌دوست *Filobacillus* sp.RF2-5 که از سس ماهی در تایلند جداسازی شده بود، مطالعات موفقیت‌آمیزی انجام دادند. خصوصیات لیپاز تولید شده توسط باکتری نمک‌دوست *Chromohalobacter* sp.LY7-8 توسط Xin Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ مورد بررسی قرارگرفت. این باکتری نمک‌دوست از خاک‌های نمکی یونچنگ در چین جداسازی شده بود (Xin and Hui-Ying, 2012). در ایران نیز به علت تنوع محیط‌های نمکی، مطالعات مختلفی بر روی دریاچه‌ها و تالاب‌های نمکی مانند مطالعه مهرشاد و همکاران بر روی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست دریاچه ارومیه، مطالعه زرپرور و همکاران بر روی باکتری‌های نمک‌دوست تالاب اینچه برون و مطالعه رهبان و آموزگار جهت بررسی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک حوض‌سلطان صورت گرفته است (زرپرور و همکاران، ۱۳۹۰؛ مهرشاد و همکاران، ۱۳۹۱؛ رهبان و آموزگار ۱۳۸۸). در این مطالعه تالاب بین‌المللی میانکاله به عنوان یک محیط نمکی برای بررسی حضور باکتری‌های نمک‌دوست انتخاب شد. این تالاب با مساحت ۲۳۸۰۰ هکتار و مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۸ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۵ دقیقه طول شمالی و ۵۳ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۵۴ درجه و ۲ دقیقه عرض شرقی در جنوب‌شرقی دریای خزر در استان مازندران واقع شده‌است. از شمال به دریای خزر، از غرب به اراضی کشاورزی زاغمرز و نواحی صنعتی امیراباد و تالاب لپوی زاغمرز متصل و از جنوب تا جنوب‌شرقی و مشرق در قلمروی جغرافیایی شهرستان بهشهر، بندرگز و بندرترکمن قرار دارد. این تالاب به عنوان یک اکوسیستم حاصلخیز در سال ۱۹۷۶ توسط یونسکو به ثبت رسیده است. میانگین بارندگی سالانه ۵۶۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالانه ۱۷/۲ درجه سانتی‌گراد است که دوره یخبندان و خشک‌سالی در آن به وقوع نمی‌پیوندد (Taghavi *et al*, 2014).

مواد و روش‌ها

با هدف جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم لیپاز نمونه‌گیری در اواسط شهریور سال ۱۳۹۴ از آب، خاک و رسوب تالاب میانکاله واقع در استان مازندران انجام شد. نمونه‌ها در حداقل زمان، تحت شرایط استریل در ظروف دردار به آزمایشگاه میکروبیولوژی تحقیقاتی دانشگاه مازندران منتقل شد. پس از رقیق‌سازی نمونه‌های خاک و رسوب در سرم فیزولوژی تا رقت 10^{-4} و سانتریفوژ نمونه‌های آب در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، همه نمونه‌ها روی محیط کشت تلقیح شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست از محیط‌کشت ویژه MH استفاده شد.

محیط‌کشت MH(Moderate Halophiles) که شامل (گرم در لیتر):

NaCl :۱۰۱، $MgCl_2.6H_2O$:۷، $MgSO_4.7H_2O$:۹/۶، $CaCl_2.2H_2O$:۰/۳۶، KCl :۲، $NaHCO_3$:۰/۰۶، NaBr :۰/۰۲۶، Yeast Extract :۱۰، Peptone:۵، Glucose :۱، Agar : ۱۵ می‌باشد (Moreno *et al.*, 2007). به منظور خالص‌سازی، کشت متوالی از تک کلونی ها صورت گرفت و کلونی‌هایی که پس از چهار بار کشت متوالی بر روی محیط کشت با مشخصات ثابت، از نظر واکنش گرم و دیگر ویژگی‌ها رفتار یکسانی نشان دادند، به عنوان کلونی خالص تلقی شدند (Garabito *et al.*, 1997).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

برای جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده، از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و مطلق از محیط کشت نوترینت آگار بدون نمک استفاده شد. جدایه‌هایی که بر روی این محیط کشت رشد کردند به احتمال زیاد تحمل‌کننده نمک بودند و کلنی‌هایی که بر روی محیط کشت قدرت رشد ندارند نمک‌دوست می‌باشند. در مورد سویه‌هایی که توانایی رشد بر روی محیط بدون نمک را داشتند، رشد بهینه در حضور نمک‌های ۰، ۲/۵، ۷/۵،۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد با تعیین گردید. چنانچه سویه‌ای بهینه رشد در زیر ۳ درصد داشته باشد، تحمل‌کننده نمک و در غیر این صورت نمک‌دوست می‌باشد.

هریک از سویه‌های خالص‌شده بر روی محیط کشت ویژه شامل سوبسترای مورد نظر با ۵ درصد نمک و pH حدود ۷/۵ کشت داده شدند تا توانایی تولید آنزیم آن‌ها مشاهده گردد (Rohban *et al*, 2009). محیط کشت ویژه برای بررسی توانایی تولید آنزیم لیپاز شامل Tween80:۱۰، Peptone: ۱۰، $CaCl_2.H_2O$:۰/۱، Agar:۱۵ می‌باشد. شکل‌گیری هاله سفید رنگ در اطراف کلنی‌ها پس از ۴۸ ساعت نشان دهنده توانایی تولید آنزیم لیپاز در محیط اختصاصی توسط باکتری می‌باشد (Winkier *et al*, 1979). هاله تولیدی اطراف کلنی‌ها ناشی از تولید اسیدچرب و ترکیب شدن آن بانمک‌های کلسیم می‌باشد که درنتیجه آن ترکیبات صابونی تولیدشده و هاله سفیدی اطراف کلنی تشکیل می‌شود. سادگی روش و مقرون‌به‌صرفه بودن موجب شده است که پژوهشگران از این روش به صورت متداول در بررسی تولید آنزیم لیپاز توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده کنند. جهت بررسی بهینه pH برای رشد جدایه‌ها، باکترها در محیط کشت نوترین براث با pH های مختلف تلقیح شدند .جدایه‌ها در غلظت نمک بهینه بدست آمده و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخان گذاری شدند. جهت تعیین دمای بهینه برای رشد سویه‌های منتخب، جدایه‌ها در محیط-کشت نوترین‌براث حاوی غلظت نمک بهینه و pH بهینه خود در دامنه دمایی ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. میزان رشد جدایه‌ها پس از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد .این آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گرفت.

جدایه‌های منتخب با آزمایش‌ها ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی نظیر رنگ‌آمیزی گرم به روش Burke، بررسی شکل کلنی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، حرکت باکتری با کشت در محیط نیمه جامد، فعالیت کاتالازی با استفاده از کشت ۲۴ ساعته و تولید حباب در اثر استفاده از پراکسید هیدروژن ۳ درصد به عنوان معرف (Murray *et al*, 1994)، احیای نیترات، متیل رد، ژلزپرسکوئر بر اساس روش سیمبرت و استفاده از منابع کربنی قندی مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (Smibert and Krieg, 1994).

جهت استخراج DNA ژنومی از توده زیستی تهیه شده، از کیت مخصوص استخراج DNA ژنومی شرکت آمریکایی (Thermo Scientific) استفاده شد. ژن *16S rRNA* جداشده با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و 1492R با ترادف ´5- Forward:) AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3´) و (´-3GGTTACCTTGTTACGACTT5´-) Revers:) تکثیر گردید.

واکنش PCR در ۳۵ سیکل به مدت ۵ دقیقه در دمای اولیه دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد، چرخه تکثیر تکرارشونده با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۸/۵ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و پس از اتمام ۳۵ چرخه جهت سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات PCR جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کشور کره‌جنوبی فرستاده شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها به کمک نرم‌افزار Chromas Lite بررسی شد تا از اشتباهات احتمالی خوانش و نوکلئوتیدها جلوگیری شود. جهت مقایسه توالی ژن *16S rDNA* باکتری‌ها، از پایگاه اطلاعاتی EzTaxon و NCBI استفاده شد. توالی‌های *16S rDNA* باکتری‌های مشابه به کمک نرم‌افزارClustalX، به همراه باکتری‌های جداشده از تالاب میانکاله همردیف سازی شد. توالی‌ها به نرم‌افزار Mega6 منتقل شد و درخت فیلوژنی با الگوریتم Neighborhood-joining رسم شد.

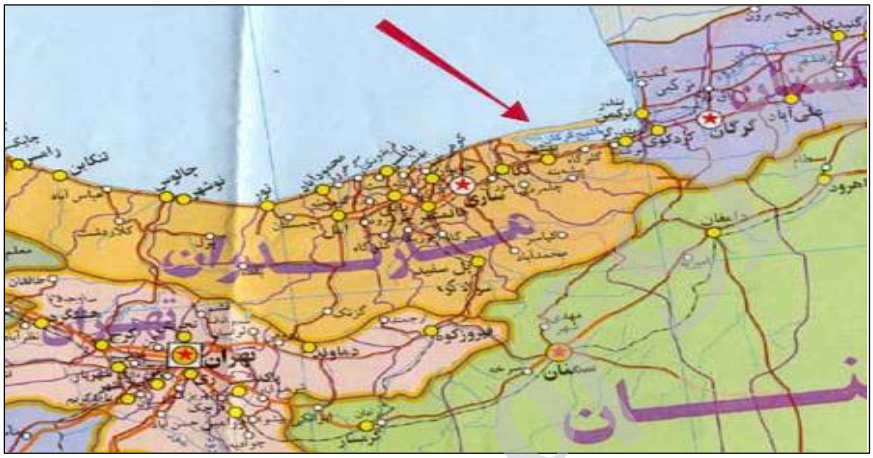
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

نتایج

ابتدا ۱۰ جدایه از خاک، آب و رسوب تالاب میانکاله جداشد (شکل ۱). از میان آن‌ها ۶ جدایه تحمل‌کننده نمک و ۴ جدایه نمک‌دوست نسبی بودند. براساس شباهت‌های فنوتیپی میان سویه‌های خالص‌شده، درنهایت ۶ سویه جداشد که شامل ۳ باسیل گرم مثبت،۲ باسیل گرم منفی و ۱ کوکسی گرم مثبت بودند. از ۶ سویه نمک‌دوست نسبی ۳ سویه براساس توانایی تولید آنزیم لیپاز انتخاب شد که یک سویه کوکس گرم مثبت و دو سویه باسیل گرم مثبت بودند. ویژگی‌های مورفولوزیک و بیوشیمیایی سویه‌های منتخب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده‌شده‌است.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی تالاب میانکاله.

سویه‌های منتخب از نظر محدوده اسیدیته برای رشد مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها محدوده رشد خود را در اسیدیته ۱۰-۵ نشان دادند. اسیدیته بهینه برای ایزوله‌های AR11 برابر ۸ و AR18 برابر ۵ و برای سویه AR28:۱۰ می‌باشد؛ بنابراین سه سویه ی منتخب جز نمک‌دوست‌های قلیاپسند قرار می‌گیرند. در شکل ۲ محدوده اسیدیته هر سه سویه به نمایش گذاشته شده است. هر سه سویه‌ی مورد نظر محدوده‌ی دمای رشد بین ۴۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد را نشان دادند. دمای بهینه رشد برای هر سه سویه‌ی منتخب ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. شکل ۳ نشان‌دهنده دمای بهینه برای هر یک از جدایه‌های منتخب می‌باشد.

سویه‌های AR18 و AR28 پس از بررسی در محدوده غلظت نمک بین ۰ تا ۳۰ مولار بهینه رشد خود را در غلظت ۲/۵ و ۵ مولار نشان دادند که نمودار شکل ۴ به مقایسه بهینه غلظت برای رشد این سه سویه می‌پردازد.

جدول ۱: بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های منتخب.

	AR11	AR18	AR28
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	_	_	_
سیمون سیترات	_	+	_
تولید H2S	_	_	_
VP	_	_	_
MR	_	_	_
حرکت	_	_	+

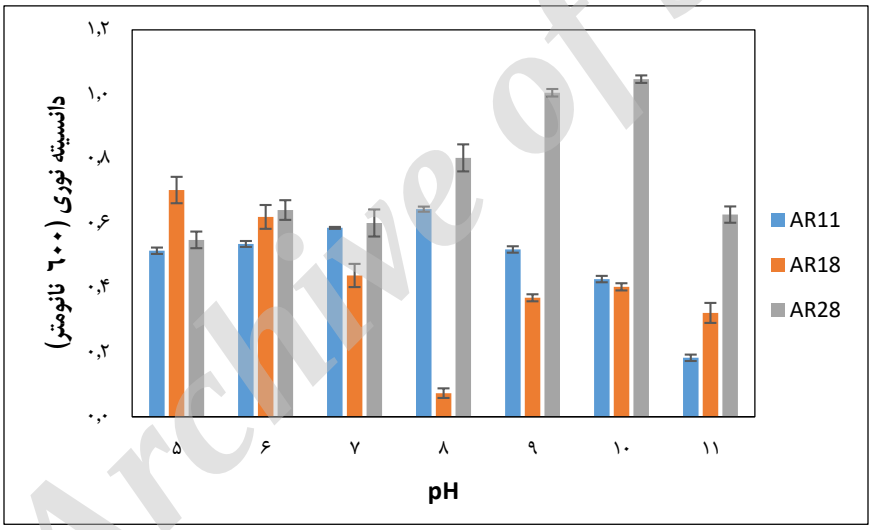
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

	AR11	AR18	AR28
ایندول	_	_	_
بدون نمک NA	_	_	+
مصرف منابع کربن			
گلوکز	+	+	+
مالتوز	+	+	+
فروکتوز	+	+	+
ساکارز	+	+	+

جدول ۲: بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های منتخب.

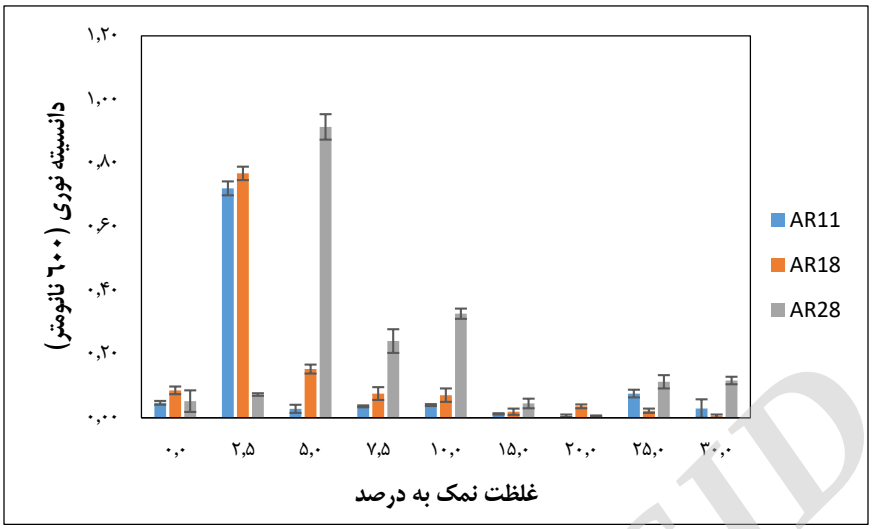
جدایه‌ها	مشخصات کلنی‌ها	واکنش گرم	شکل کلنی‌ها
AR11	مات، نقطه‌ای، حاشیه صاف، گلبهی	+	دیپلوکوکوس
AR18	کروی، کرمی، نیمه شفاف، حاشیه نامنظم	+	باسیل
AR28	کروی، کرمی، مات، موجدار، تپه ای	+	باسیل



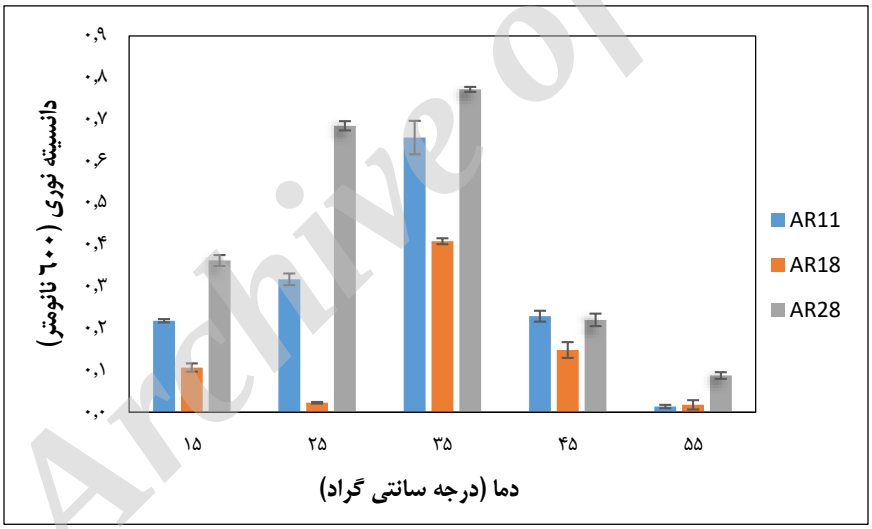
شکل ۲: تعیین pH بهینه برای رشد جدایه‌های منتخب. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج سه بار تکرارند. (میانگین ± انحراف معیار)

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018



شکل ۳: تعیین غلظت نمک بهینه برای رشد جدایه‌های منتخب. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج سه بار تکرارند. (میانگین ± انحراف معیار)



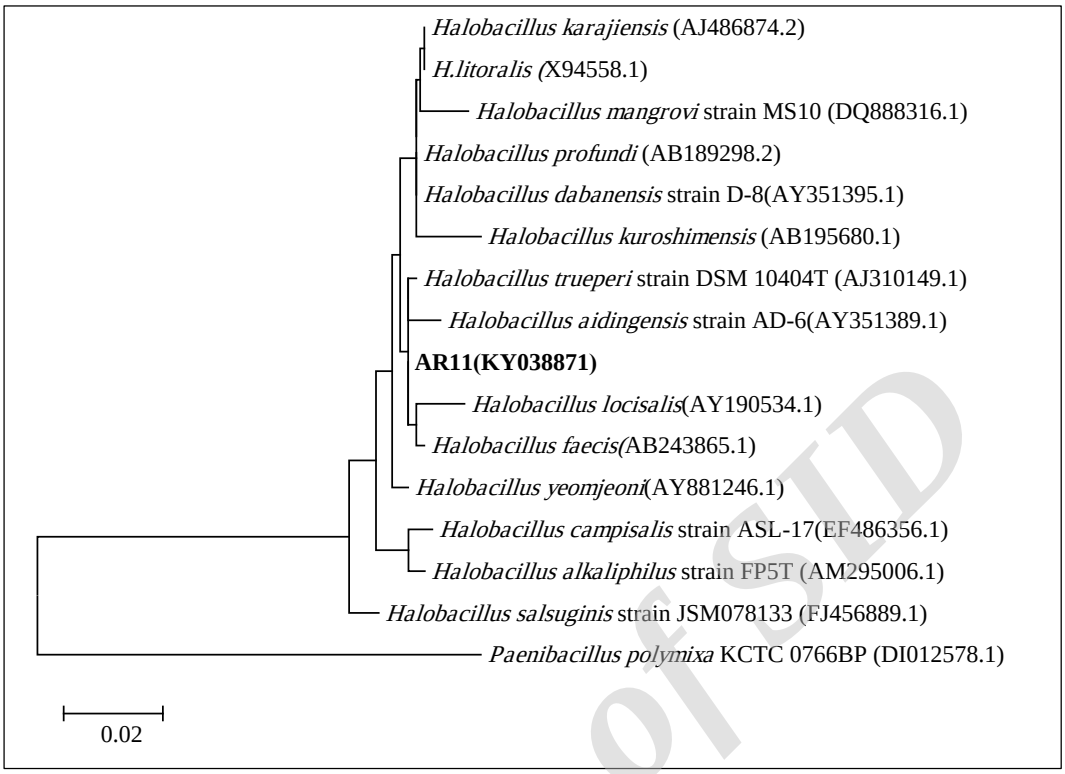
شکل ٤: تعیین دمای بهینه برای رشد جدایه‌های منتخب. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج سه بار تکرارند. (میانگین ± انحراف معیار)

با توجه به ترادف رفت *16S rDNA* سویه‌های موردنظر متعلق به جنس‌های نمک‌دوست نسبی Halomonas و *Halobacillus* بوده‌است که شباهت ۹۹ درصدی بین جدایه‌ها و سویه‌های متعلق به این جنس‌ها را نشان دادند. براساس یافته‌های حاصل از بررسی ترادف رفت *16S rDNA* که مبنی بر تعیین توالی ژنتیکی ۹۰۰–۷۰۰ نوکلئوتید از ژن *16S rDNA* بود. درخت فیلوژنی سه سویه با استفاده از روش Neighborhood-joining رسم و قرابت ژنتیکی این سویه‌ها با سویه‌های باکتریایی شناسایی شده مشخص گردید. از میان این سه سویه ۲ سویه متعلق به جنس *Halobacillus* و یک سویه متعلق به جنس *Halomonas* بودند. شکل‌های ۵، ۶ و ۷ متعلق به درخت فیلوژنی سه سویه AR11,AR18,AR28 می‌باشد.

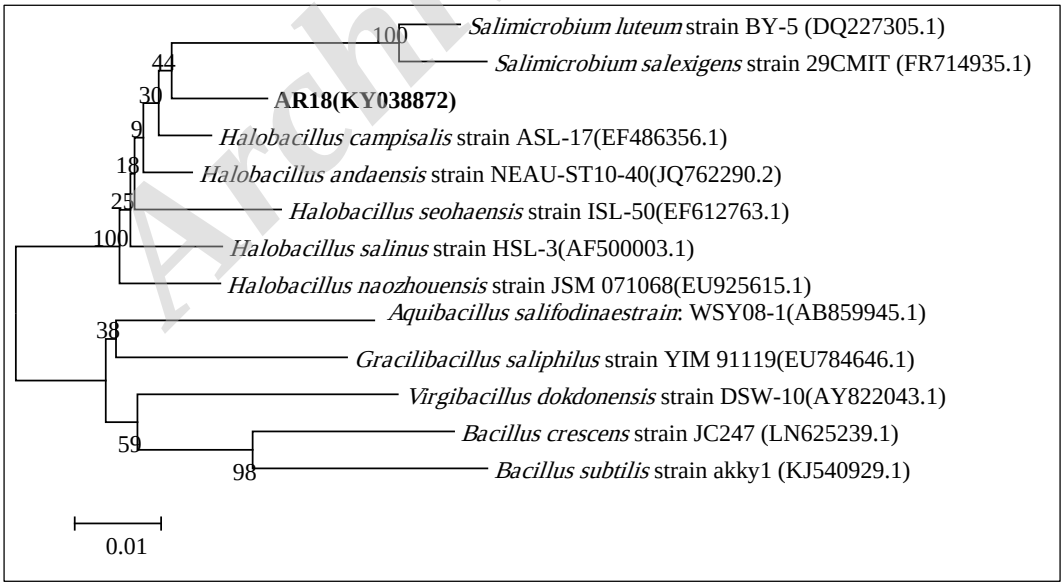
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018



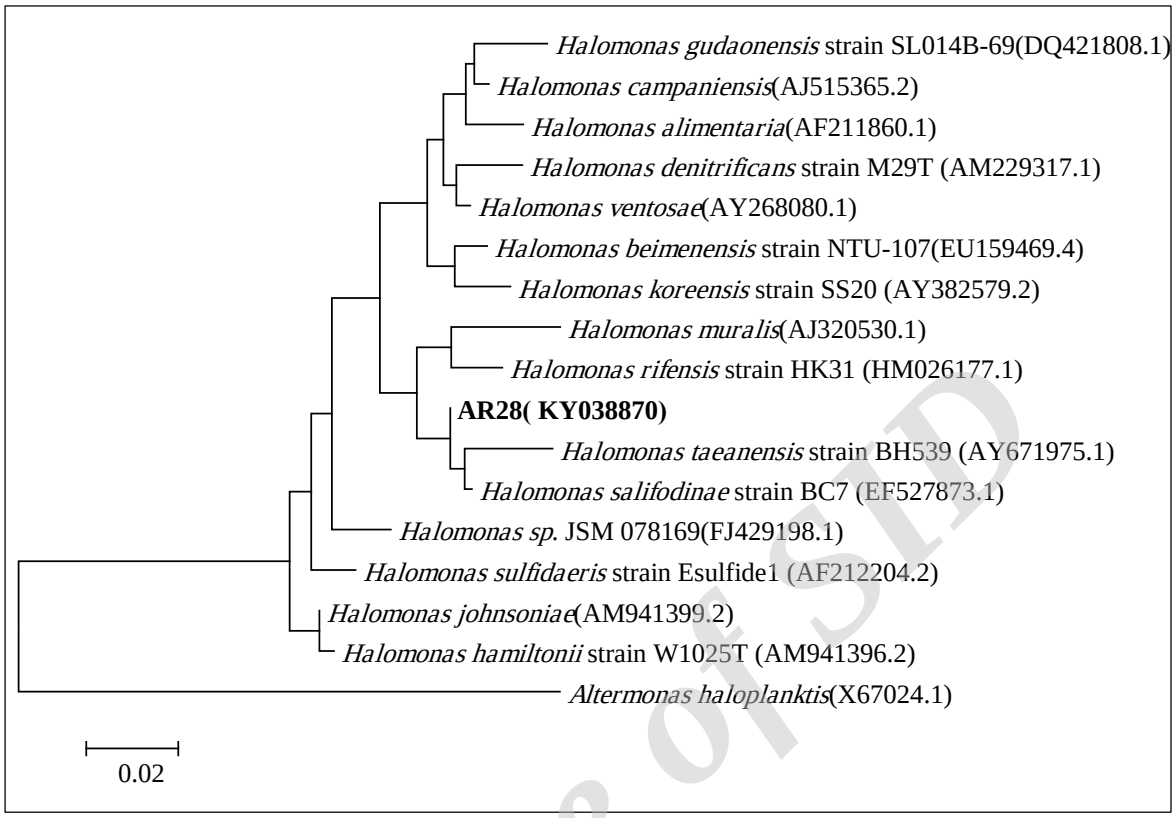
شکل ۵: دندورگرام توالی ژن *16S rDNA* جدایه‌های AR18. باکتری *Paenibacillus polymixa* به عنوان out group قرار داده شدند.



شکل ٦: دندورگرام توالی ژن *16S rDNA* جدایه AR18. باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان out group قرار داده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018



شکل ۷: دندورگرام توالی ژن *16S rDNA* جدایه‌های AR28. باکتری *Altermonas haloplanktis* به عنوان out group قرار داده شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادر به ترشح آنزیم لیپاز می‌باشند اما در میان آن‌ها باکتری‌ها اهمیت بیشتری دارند، چرا که لیپازهای باکتریایی دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند پایداری در حلال‌های آلی، عدم نیاز به کوفاکتور برای انجام فعالیت آنزیم، پوشش‌دهی محدوده‌ی وسیعی از سوبستراها، عدم ایجاد واکنش‌های جانبی هنگام کاتالیز و انتخاب‌گری فضایی مناسب می‌باشند. این دسته از آنزیم‌ها قادرند واکنش‌های متنوعی مانند هیدرولیز، سنتز و یا ایجاد تغییر در باندهای استری را کاتالیز نمایند. صنایع مختلفی قابلیت استفاده از لیپازهای باکتریایی را دارند که می‌توان به صنایع تولید لوازم‌آرایشی و بهداشتی و تولید دارو اشاره کرد (Fariha *et al*, 2006). اکسترموزیم (Extremozymes) به آنزیم‌های خارج سلولی تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌های افراطی پسند اطلاق می‌شود. نمک‌دوست‌ها منبع مناسبی از آنزیم‌های خارج سلولی با پایداری بالا می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها توانایی فعالیت تحت شرایطی را دارند که به عنوان ناسازگاری با مواد بیولوژیکی تلقی می‌شود. باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک با دارا بودن ویژگی‌های شاخصی مانند رشد سریع و آسان، نیاز حداقل به شرایط استریل، کاهش خطر آلودگی در محیط‌زیست و از همه مهم‌تر سهولت در دست‌کاری ژنتیکی توجه میکروب شناسان را از اواخر قرن ۱۹ تاکنون به خود جلب کرده‌اند (Ventosa and Nito, 1995).

در پژوهش حاضر به مطالعه باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک جداشده از تالاب میانکاله با توانایی تولید آنزیم لیپاز پرداخته شده است. از جمله مطالعات مشابه با این پژوهش انجام شده در خارج از ایران می‌توان به جداسازی باکتری نمک‌دوست *Marinobacter lipolyticus* sp. nov. با فعالیت لیپازی از نواحی جنوب اسپانیا که دارای شرایط بهینه ۷/۵ درصد نمک، دمای ۳۷ و pH برابر با ۷/۵ بود توسط مارتین و

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره کرد (Martı´n *et al*, 2003). در سال ۲۰۰۷ مورنو و همکاران به مطالعه بر روی تنوع زیستی نمک‌دوست‌های تولیدکننده چهار آنزیم لیپاز، پروتئاز، آمیلاز و نوکلئاز در زیستگاه‌های شور اسپانیا پرداختند. پژوهش دیگر انجام شده در سال ۲۰۰۸ که توسط Mariana nia به همراه همکاران صورت گرفت که منجر به جداسازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک از گونه *Bacillus* با توانایی تولید آنزیم لیپاز از دماغه مرداب نمکی در کشور بولیوی گردید.

Moreno در سال ۲۰۰۹ باکتری نمک‌دوست *Salicola* sp. IC10, با توانایی تولید آنزیم لیپاز و پروتئاز از نواحی نمکی اسپانیا جدا کرد که بهینه فعالیت در غلظت نمک ۲۰-۱۵٪، pH : ۸ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد (Moreno *et al*., 2009). مطالعه مشابه انجام شده در ایران شامل جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست و قلیادوست تالاب گمیشان می‌باشد که توسط شاهین پی و آموزگار در سال ۲۰۱۳ صورت گرفته است. در این پژوهش از ۵۷ سویه منتخب که توانایی تولید آنزیم هیدرولازی را داشتند ۳۲ سویه لیپاز، ۱۵ سویه آمیلاز و ۷ جدایه تولیدکننده پروتئاز بوده است. فعالیت لیپازی در بیش از نیمی ازسویه‌ها مثبت بوده است. جالب توجه است که ۷ سویه از جدایه‌ها نمک‌دوست قلیادوست می‌باشند که قادر به تولید لیپاز خارج سلولی هستند (شاهین‌پی و همکاران، ۱۳۹۲).

مطالعه خصوصیات باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل در سال ۱۳۸۸ توسط باباولیان و همکاران از دیگر پژوهش‌های انجام شده در ایران می‌باشد (باباولیان وهمکاران، ۱۳۸۸). در سال ۲۰۱۱ قاسمی و همکاران موفق به جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم لیپاز از دریاچه نمکی مهارلو در استان فارس شدند که از میان ۱۳ ایزوله ۱۱ سویه باسیل گرم مثبت و ۲ سویه کوکسی گرم مثبت بوده و بیشتر سویه‌ها در جنس *Bacillus* قرار می‌گرفت. در پژوهش حاضر از میان سویه‌های محیطی جداشده با توانایی تولید آنزیم لیپاز، هر سه سویه متعلق به جنس‌های گرم مثبت شامل ۲ سویه باسیل گرم مثبت و ۱ سویه کوکسی گرم مثبت بودند. برخلاف مطالعات انجام شده بر روی تالاب گمیشان و دریاچه آران و بیدگل که اکثر سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولاز ی متعلق به جنس‌های نمک‌دوست نسبی یا اجباری بوده است، هر سه سویه جداشده از تالاب میانکاله اگرچه توانایی رشد در غلظت نمک ۱۰ و ۵ درصد را دارا می‌باشند اما به علت بهینه رشد در غلظت ۲/۵ و ۵ مولار نمک و pH بهینه ۵، ۸ و ۱۰ جز باکتری‌های تحمل‌کننده نمک و قلیادوست قرار می‌گیرند. در مطالعه انجام شده در آران بیدگل اکثر ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز متعلق به سویه‌های گرم منفی بوده است. بیشتر ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم در آران بیدگل متعلق به جنس *Halobacillus* می‌باشند، در حالی که در مطالعه حاضر باکتری‌های تولیدکننده لیپاز متعلق به سویه‌های گرم مثبت *Halobacillus* و *Halomonas* می‌باشند.

پژوهش پیش‌رو در راستای گسترش بانک میکروارگانیسمی ایران و کمک به پیشرفت صنعت تولید آنزیم کشور اقدام به گردآوری ایزوله‌ها نموده است. براساس این مطالعه تالاب بین‌المللی میانکاله به عنوان یک اکوسیستم غنی می‌تواند زیستگاه بسیاری از میکروارگانیسم‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک باشد و نیازمند مطالعات گسترده‌تر و بیشتری در رابطه با حضور تنوع عظیم میکروبی می‌باشد. شناسایی این میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه و دست‌یابی به توانایی‌های گسترده آن‌ها برای اولین بار می‌تواند علاوه بر شناسایی ذخایر ژنتیکی، کاربردهای صنعتی و زیست‌فناوری متنوعی نیز داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله علمی پژوهشی بر خود لازم می‌دانند تا از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و انستیتو پاستور شمال ایران جهت همکاری در انجام این پژوهش و همین‌طور آقای آیدین مرزبان به دلیل مساعدت‌های بی‌پایان صمیمانه تشکر قدردانی نمایند.

منابع

رهبان، ر. و آموزگار، م. ع.، ۱۳۸۸. بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان، علوم و تکنولوژی محیط‌زیست، دوره یازدهم، شماره چهار، صفحات ۲۵۱-۲۶۷.

مهرشاد، م.، آموزگار، م. ع.، یخچالی، ب. و شاهزاده فاضلی، ا. ب.، ۱۳۹۱. تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه، زیست‌شناسی میکرو ارگانیسم‌ها، سال اول، صفحات ۷۰-۴۹.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

زرپرور، پ.، آموزگار، م. ع.، فلاحیان، م. ر.، ۱۳۹۳. بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل‌کشت در تالاب پرشور این چه برون، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۲۷، شماره ۱، صفحات ۵۶-۴۴.

شاهین‌پی، آ.، آموزگار، م. ع. و اخوان سپهی، ع.، ۱۳۹۲. جداسازی و شناسایی باکتری‌های پلی اکستریموفیل قلیادوست، نمک دوست و تحمل‌کننده نمک تالاب قلیایی شور – دریایی گمیشان، تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۱۴: صفحات ۱۰۰-۷۹.

باباولیان،ح.، آموزگار، م. ع. و پوربابایی، ا. ع.، ۱۳۸۸. شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک جداشده از دریاچه نمک آران وبیدگل، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۱.

Aryee, A., Simpson, B. and Villalonnga, R., 2007. Lipase fraction from the viscera of Grey mullet (*Mugil cephalus*) Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. Enzyme and Microbial Technology, 40: 394-402.

Das Sarma, S. and Arora, P. A., 2001. General review on Halophiles. In encyclopedia of life Sciences, nature publishing group/www.else.net.

Fariha, H., Aamer, A. S. H. and Abdul, H., 2006. Industerial Application OF Microbial Lipase. Enzyme and Microbial Technology, 39: 235-251.

Garabito, M. J., Arahal, D. R., Mellado, E., Marquez, M. C. and Ventosa, A., 1997. Bacills salexigenes sp.nov, a new moderate halophilic Bacillus species, International Journal Systematic Bacteriology, 47: 735-741.

Ghasemi, Y., Rasoul_Amini, S., Kazemi, A., Zarrini, G., Morowvat, M. H. and Kargar, M., 2011. Isolation and Characterization of Some Moderately Halophilic Bacteria with Lipase Activity. Microbiology, 80(4): 483–487.

Gomez, J. and Steiner, W., 2004. The biocatalytic potential of extremophile and extermozyme extremophiles. Food Biotechnology, 2: 223-235.

Golinski, E. A., 1995. Osmoadaptation in bacteria. Advances in Microbiol Physiology, 37: 273-284.

Kempka, A. P. N. L., Lipke, T. D. l. f., Pinheiro, S., Menoncin, H., Treichel, D. M. and Freire, M., 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipasefrom Penicillium verrucosum in solid-state fermentation. Bioprocessand Biosystems Engineering, 31(2): 119-12.

Kazumi, H., Yasushi, N., Sirilak, N., Somboon, T., Katsumi, T. and Kohei, O., 2005. Purification and Characterization of Serine Proteinase from a Halophilic Bacterium, *Filobacillus* sp.RF2-5. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 69 (1): 38-44.

Li, N. and Zong, M. H., 2001. Lipases from the genus Penicillium: Production, purification, Characterization and applications .Journal of Molecular Catalysis, 66: 43-54.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F., 1994. Determination and cytological light microscopy. In method for General and molecular bacteriology, pp.21-41.

Martı´n, M. C., Ma´ rquez, C., Sa´ nchez-Porro, E., Mellado, D. R., Arahal, A. and Ventosa, A., 2003. Marinobacter lipolyticus sp. nov., a novel moderate Halophile with lipolytic activity. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1383–1387.

Moreno, M. L., Mellado, E., Garcia, M. T. and Ventosa, A., 2007. Diversity of extreme halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats, Halophiles-2007 booklet, 59-60

Moreno, M. L., 2009. Characterization of Salicola sp. IC10, a lipase- and protease producing Extremohalophil. FEMS Microbiology Ecology, 68:59–71.

Mariana Niño, G., Virginia, A.V., Henry. A. and Michal, S., 2008. Lipolitic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganism isolation from laguna verde BOLIVIA. Revista boliviana de QUÍMICA, 25, No.1

Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A., 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria ptoducing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal oh industrial microbiology and biotechnology official journal of society for industrial microbiology, 36: 333-340.

Smibert, R. M. and Krieg, N. R., 1994. Phenotypic characterization. In methods for general and molecular bacteriology, pp.: 607-654.

Archive of SID

www.SID.ir

Taghavi, S., Reiazi, B. and Taghavi, L., 2014. Determination of environmental water requirement of Miankaleh Wetland. Journal of environmental science and technology, 16(2): 101-109.

Ventosa, A., Nito, J. J. and Ore, A., 1998. Biology of moderately halophilic bacteria. Microbial Molecular Review, 62: 504-554.

Ventosa, A. and Nito, J. J., 1995. Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. Microbiology and Biotechnology, 11: 85-94.

Winkier, U. k. and Stukmann, M., 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by serratia marcescens. Journal of Biotechnology, 138: 663-670.

Xin, L. and Hui-Ying, Y., 2012. Characterization of a novel extracellular lipase from halophilic isolate, *Chromohalobacter* sp.LY7-8. African Journal of Microbiology Research, 6 (14): 3516-3522.

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 17:26 +0430 on Wednesday May 9th 2018

Archive of SID

www.SID.ir