شناسایی و تعیین خصوصیات باکتریهای نمک دوست تولید کننده آنزیمهای هیدرولتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل

حمید باباولیان[1] ، محمد علی آموزگار[2]* و احمد علی پوربابائی[3]

[1] تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست

[2] تهران، دانشگاه تهران ، پردیس علوم ، دانشکده زیست شناسی ، گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه اکسترموفیل

[3] قم، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: 86/12/20 تاریخ پذیرش: 87/9/6

چکیده

دریاچه آران و بیدگل یکی از دریاچه های شور در منطقه کویر مرکزی ایران می باشد. این دریاچه شکلی شبیه به یک مثلث دارد که رأس آن به سمت شمال می باشد. طول قاعده این مثلث 35 کیلومتر و ارتفاع آن 38 کیلومتر می باشد. غربال گری باکتریها از نقاط مختلف دریاچه منجر به جداسازی61 باکتری گرم مثبت و 22 باکتری گرم منفی نمک دوست نسبی توانا به تولید هیدرولازهای مختلف شد این باکتریها به طور اپتیمم در محیط با 15-5 درصد نمک ، دمای 37-34 درجه سانتی گراد و pH 7/2 رشد می کنند تعداد سویه های تولید کننده آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، DNAase، اینولیناز، گزیلاناز، کربوکسی متیل سلولاز، پکتیناز، پولولاناز و کیتیناز به ترتیب 32، 20، 27، 40، 40، 9، 11، 24، 16 و 20 بود که در میان این سویه ها تعدادی نیزقادر به تولید مخلوطی از این آنزیمها بودند. بیشترین آنزیمهای تولید شده در باسیلهای گرم مثبت آنزیمهای DNase و اینولیناز و در باسیلهای گرم منفی آنزیم لیپاز و در کوکوسهای گرم مثبت آنزیمهای پولولانازو کربوکسی متیل سلولاز بودند. کمترین میزان آنزیم تولید شده مربوط به آنزیم گزیلاناز بود. از این سویه ها، چندین سویه با توانایی تولید تنوعی از آنزیمهای ارزشمند انتخاب شدند که شامل AMB1 (8 آنزیم) وAMB7, AMB10, AMB1(7 آنزیم) و AMB5, AMB6, AMB11, AMB13 (6 آنزیم) وAMB2, AMB3, AMB8, AMB9 (5 آنزیم) و AMB4, AMG1 (4 آنزیم) و AMC1, AMC2 (3 آنزیم) و AMC3، **AMC8**، AMC**17**، AMG2 (2 آنزیم) و AMG3 (1 آنزیم) بودند. نهایتاً سویه های منتخب علاوه بر صفات فنوتیپی از نظر ویژگیهای فیلوژنی و مولکولی با تکنیک 16S rDNA شناسایی و تعیین توالی شدند، که باکتریهای گرم مثبت متعلق به جنسهای *Nesterenkonia* ، *Halobacillus, Thalassobacillus, Bacillus, Salinicoccus*، *Marinococcus*، *Staphylococcus* و باکتریهای گرم منفی متعلق به جنسهای *Idiomarina, Salicola* و *Halomonas* بودند. باکتری جنس *Halobacillus* فراوان ترین باکتری جدا شده از دریاچه و بیشترین تنوع آنزیم را نشان داد.

واژه های کلیدی: اکسترموفیل، نمک دوست، آنزیمهای هیدرولیتیک، غربال گری

*نویسنده مسئول، تلفن تماس 02161112723، پست الکترونیک: amozegar@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

دریاچه آران و بیدگل یکی از دریاچه ها در منطقه کویر مرکزی ایران و بزرگترین پلایای شور در ایران است. این دریاچه شکلی شبیه به یک مثلث دارد، که رأس آن به سمت شمال می باشد . طول قاعده این مثلث 35 کیلومتر و ارتفاع آن 38 کیلومتر می باشد . عمق نمک آن بین 54-5 متر متغییر می باشد که توسط لایه های خاک رس از

یکدیگر جدا شده اند. ترکیبات تشکیل دهنده نمک دریاچه، موادی از قبیل سدیم کلراید، سدیم سولفات، منیزیم کلراید، منیزیم سولفات و .... بوده و بیشتر فصول سال خشک و اشباع از نمک است. ویژگیهای شاخص این دریاچه از جنبه شیمیایی، بالا بودن عیار منیزیم آن نسبت به سایر دریاچه ها و شورابه های مطالعه شده در ایران، از جنبه بیولوژیک، میزان شوری اشباع نمک و لایه های رنگی نمک (قرمز، نارنجی، سبز، سیاه) و از جنبه اقتصادی، حصول مقدار زیاد نمک را می توان نام برد. این دریاچه به علت بالا بودن میزان شوری یک زیستگاه مناسب برای دسته ای از اکسترموفیل ها به نام نمک دوستها می باشد. باکتریهای نمک دوست میکروارگانیسم هایی هستند که می توانند بصورت بهینه در محیط محتوی 15-5 درصد نمک رشد کنند (8 و21). البته این محدوده نمک بستگی به ترکیبات محیط کشت و دما دارد. آنها به طور وسیع در زیستگاههای شور مانند دریاچه های شور، خاکها و بیابانهای نمکزار، حوضچه های برداشت نمک، معادن نمک، غذاهای شور و دیگر مناطق پراکنده هستند (9 و22). جنبه هایی که اخیراً توجه محققین را به خود جلب کرده است بیشتر در ارتباط با مکانیسم فیزیولوژی آداپته شدن این میکروارگانیسم ها به شوری بالا، اکولوژی و کاربردهای بیوتکنولوژی آنها می باشد (22). باکتریهای نمک دوست نسبی به علت داشتن خصوصیاتی مانند رشد سریع، نیاز غذایی کم، استفاده از ترکیبات مختلف بعنوان تنها منبع کربن و انرژی و کاهش خطر آلودگی در محیط و امکان دستکاری ژنتیکی برای اهداف تجاری بسیار مهم هستند. یکی از استفاده های تجاری این میکروارگانیسم ها استفاده از آنزیمهای هیدرولازی خارج سلولی می باشد، زیرا این آنزیمها نه تنها تحمل کننده نمک هستند، بلکه تحمل کننده حرارت نیز می باشند (13). اگرچه این باکتریها آنزیمهای خارج سلولی تحمل کننده نمک با پتانسیل بالا را برای استفاده در فرآیند های صنعتی تولید می کنند، تنها یک تعداد کمی از این آنزیمها شناسایی شده اند(23)، در این مطالعه تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست جدا شده از بخشهای مختلف در دریاچه نمک آران و بیدگل توصیف شده است.

مواد و روشها

نمونه گیری از نقاط مختلف دریاچه: به منظور جداسازی سویه های نمک دوست با توانایی تولید آنزیمهای هیدرولیتیک خارج سلولی، از نقاط مختلف دریاچه نمک آران و بیدگل(از 5 نقطه دریاچه طبق علامت گذاری روی نقشه با نامهای مسیر منتهی به دریاچه ، منطقه جزیره سرگردانی، منطقه نمک پارسیان، منطقه نمک کانسار و منطقه 18 کیلومتری) در دو ماه آبان و اردیبهشت نمونه گیری انجام شد. شکل 1 نقاط نمونه برداری را بر روی نقشه و در جدول 1 مشخصات نقاط نمونه برداری نشان داده شده است. فراوانی سویه های جدا شده از محلهای نمونه برداری در جدول 2 نشان داده شده است.

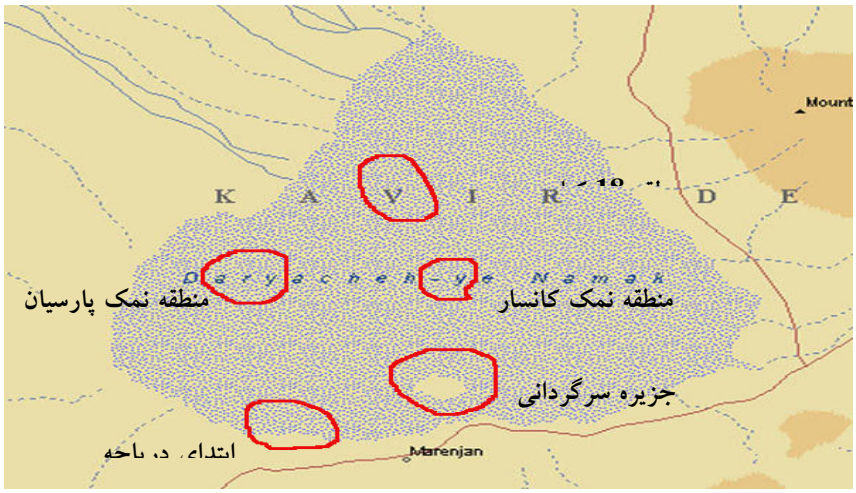
سویه های باکتریایی و شرایط رشد: جداسازی باکتریهای نمک دوست بر روی محیط مغذی آگار داری بود که بدان نمکهای زیر افزوده شده است.

NaCl,81 g/l ; $MgSO_4.7H_2O$, 9.7 g/l ; $MgCl_2.6H2O$, 7.0 g/l ; $CaCl_2$, 3.6 g/l ; KCl, 2.0 g/l ; $NaHCO_3$, 0.06 g/l ; NaBr, 0.026 g/l ; Distilled water, 1000 ml

pH محیط جداسازی با استفاده از پتاس 1 مولار قبل از اتوکلاو کردن در 7/2 تا 7/4 تنظیم گشت (7).

برای افتراق باکتریهای تحمل کننده نمک از باکتریهای نمک دوست نسبی و مطلق نیز از محیط کشت نوترینت آگار سنتتیک که بدون نمک استفاده شد. سویه های رشد کننده بر روی این محیط، احتمالاً هالوتولرانت بودند اما کلنی هایی که روی این محیط بدون نمک نتوانند رشد کنند نمک دوست هستند. در مورد سویه هایی که رشد بر روی محیط فاقد نمک مشاهده شد، رشد بهینه باکتریها در حضور نمکهای 0 ، 2/5 ، 5 درصد تعیین گشت. چنانچه

سویه ایی زیر 3 درصد نمک رشد بهینه داشته باشد هالوتولرانت، در غیر این صورت نمک دوست می باشد.



شکل 1- نقاط نمونه برداری بر روی نقشه

جدول 1- مشخصات نقاط نمونه برداری شده

نقاط نمونه برداری	مشخصات جغرافیایی	دما	pH	نوع نمونه
ابتدای دریاچه	h: 808 m N: 34.31265 E: 51.7667	32 °C	7	خاک شور و لجن نمکی
جزیره سرگردانی	h: 809 m N: 34.58166 E: 51.76385	34 °C	6.8	خاک شور، لجن نمکی ، نمک با درصد منیزیم بالا
منطقه نمک پارسیان	h: 805 m N: 34.50729 E: 51.72439	29 °C	7	نمک سیاه، نمک سفید، نمک سبزو قرمز
منطقه نمک کانسار	h: 804 m N: 34.50106 E: 51.76385	30 °C	7	نمک سیاه، نمک سفید، نمک سبزو قرمز
منطقه 18 کیلومتری	h:799 m N: 34.64378 E: 51.83838	30 °C	7	نمک نارنجی ، قرمز و سبز

غربال گری میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک: در این مرحله سنجش به روش پلیت انجام گردید .هر یک از سویه های جدا شده را بر روی محیط ویژه محتوی سوبسترای مورد نظر و10 درصد نمک کشت داده تا بتوان تولید آنزیم را در آنها مشاهده کرد .

تولید خارج سلولی آمیلاز: برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز از محیط با ترکیب زیر استفاده شد:

Starch agar, 30 g/l ; NaCl (solar salt), 10درصد ;
Distilled water, 1000ml ;pH, 7.2

بعد از انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 7 روز پلیت ها با محلول (0.3) درصد I_2، 0.6 درصد KI پوشیده شد، ظهور یک ناحیه شفاف اطراف کلنی ها نشانه هیدرولیز نشاسته می باشد (5).

جدول ۲- فراوانی سویه های جدا شده از نقاط مختلف دریاچه نمک آران و بیدگل

محل نمونه برداری	نوع نمونه	تحمل کننده نمک	نمک دوست اجباری	باسیل گرم مثبت	نمک دوست نسبی کوکوس گرم مثبت	گرم منفی
جاده منتهی به دریاچه	خاک شور	٤	٠	٩	١	٠
	شورابه	٠	٠	٤	٠	٠
	لجن شور	٢	٠	٢	٢	١
	نمک دریاچه	٠	٠	٤	١	٠
جزیره سرگردانی	خاک شور	٢	٠	٠	٠	٣
	شورابه	٠	٢	٠	١	٠
	لجن شور	٢	٠	٤	١	٠
	نمک دریاچه	٠	٠	٠	٠	٠
نمک پارسیان	خاک شور	٠	٢	٠	١	٠
	شورابه	٠	٠	٢	٠	٣
	لجن شور	٠	١	٦	٢	٨
	نمک دریاچه	٠	٢	٠	١	٢
نمک کالنسار	خاک شور	٠	٣	٠	٢	٠
	شورابه	٠	٠	٣	١	٢
	لجن شور	٠	٢	٣	٤	٠
	نمک دریاچه	٠	٠	٠	٠	٠
منطقه ۱۸ کیلومتری	خاک شور	٠	٧	٢	٠	٠
	شورابه	١	٠	٠	٠	٠
	لجن شور	٠	٢	٥	٠	٣
	نمک دریاچه	٠	٢	٤٤	١٧	٢٢
تعداد کل		١١	١٩			

جدول ٤- شناسایی تاکزونومی ۸۳ ایزوله محیطی قادر به تولید آنزیمهای هیدرولیتیک مختلف

جنس	آمیلاز	پروتئاز	لیپاز	DNase	اینولیناز	گریلاتاز	سلولاز	پولولاناز	پکتیناز	کیتیناز	توتال
Halobacillus	٢٠	١٣	٢٢	٢٨	٢٢	١	٣	٧	١٥	١٤	١٤٥
Thalassobacillus	٥	٤	٤	٦	٥	٥	١	٢	١	١	٣٤
Salinicoccus	٢	٠	٠	١	١	٠	٤	٠	١	١	١٠
Marinococcus	٠	١	٠	٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٢
Nesterenkonia	٠	٠	٠	٠	١	٠	١	٠	٠	٠	٢
Staphylococcus	٠	٠	٠	١	٠	١	٠	٢	٣	٢	٢٣
Halomonas	٢	١	٢	١	٦	٢	٢	٢	٣	٢	٢٣
Salicola	١	٠	٨	٢	٠	٠	٠	١	١	٠	١٣
Idiomarina	٠	٠	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٢
non-identified	٢	١	٠	٠	٤	١	٠	٤	٢	٢	١٦
Total	٣٢	٢٠	٣٧	٤٠	٤٠	١٠	١١	١٦	٢٣	٢٠	٢٤٩

تولید خارج سلولی پروتئاز: Skim milk, 10 درصد ; N.A , 28 g/l ; NaCl (solar salt), 10 درصد ,Agar 15 ; g/l ; Distilled water, 1000ml ; pH 7.2

ترکیبات محیط به جز Skim milk در 121 درجه سانتی گراد 15 دقیقه اتوکلاو گشت و skim milk از طریق صاف کردن استریل گشت.

ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی ها نشانه تولید آنزیم می باشد. (20)

تولید خارج سلولی لیپاز: Peptone , 10 g/l ; $CaCl_2$. H_2O, 0.1 g/l ; Tween 80, 10 g/l ; NaCl (solar salt), 10 درصد ; Distilled water, 1000ml; pH, 7.2

بعد از تهیه محیط فوق در دمای 115 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه اتوکلاو شد.

ایجاد رسوب سفید رنگ اطراف کلنی ها بعد از 48 ساعت نشانه تولید آنزیم می باشد.(26)

تولید خارج سلولی نوکلئاز: محیط کشت تولید آنزیم DNase:

DNA agar, 42 g/l ; toluidin blue, 0.008 g/l ; NaCl (solar salt), 10درصد ; Distilled water, 1000ml; pH, 7.2

بعد از انکوباسیون برای 7 روز با اضافه کردن HCL 1 نرمال ، ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی ها نشانه تولید آنزیم می باشد(14).

تولید خارج سلولی اینولیناز: Inulin, 2 g/l ; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/l ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 g/l ; KH_2PO_4 , 3 g/l ; Agar, 20 درصد ; NaCl (solar salt), 10 درصد ; ; Distilled water, 1000ml; pH 7.2

اینولین از طریق صاف کردن استریل و بقیه ترکیبات محیط در 121 درجه اتوکلاو شد.

رشد در سطح پلیت نشانه تولید آنزیم و استفاده از اینولین به عنوان تنها منبع کربن می باشد. (1)

تولید خارج سلولی پکتیناز: محیط کشت تولید آنزیم پکتیناز

Pectin, 1 درصد ; $(NH_4)_2SO_4$, 0.14 درصد ;K_2HPO_4, Nutrient ; درصد0.02 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 درصد ; solution, 0.1 درصد ($FeSO_4.7H_2O$, 5 mg/l ; $MnSO_4.H_2O$, 1.6 mg/L ; $ZnSO_4.7H_2O$, 1.4 mg/l ; $CaCL_2$, 2 mg/l) ;NaCl(solar salt), 10 درصد ; Agar, 2 درصد ; Distilled water, 1000ml; pH 7. 2

پکتین از طریق صاف کردن استریل و بقیه محیط در دمای 121 درجه به مدت 15 دقیقه استریل شد.

با اضافه کردن لوگل، ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی ها نشانه تولید آنزیم می باشد. (10)

تولید خارج سلولی کربوکسی متیل سلولاز: محیط کشت تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز

CMC, 5 g/l ; $NaNO_3$, 1 g/l ; K_2HPO_4, 2 g/l ; KCl, 1 g/l ; $MgSO_4$, 0.5 g/l ; yeast extract, 0.5 g/l ; glucose, 1 g/l ; NaCl(solar salt), 10 درصد ; Agar, 17 g/l ; Distilled water, 1000ml; pH 7.2

کربوکسی متیل سلولز از طریق صاف کردن استریل و بقیه محیط در دمای 121 درجه به مدت 15 دقیقه استریل شد.

اضافه کردن معرف کنگورد 0/1 درصد بعد از نیم ساعت شستن با محلول 1 مولار نمک و ایجاد هاله شفاف نشانه تولید آنزیم می باشد (2 و 18)

تولید خارج سلولی پولولاناز: محیط کشت تولید آنزیم پولولاناز:

Yeast extract, 1g/l ; pullulan, 5 g/l ; NaCl(solar salt), 10 درصد ; Distilled water, 1000ml; pH 7.2

پولولان از طریق صاف کردن استریل و بقیه محیط در دمای 121 درجه به مدت 15 دقیقه استریل شد.

اضافه کردن اتانول 97 درصد، شفاف بودن مایع، نشانه جواب مثبت است، زیرا حضور پولولان در محیط با اتانول 97 درصد رسوب سفید می دهد (15).

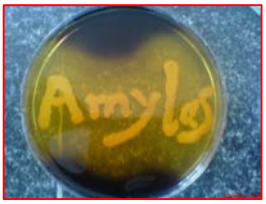
تولید خارج سلولی کیتیناز: محیط کشت تولید آنزیم کیتیناز :

TSB, 30 g/l ; chitin cloidal, 0.1 درصد ; NaCl 10 درصد ; agar 12 g/l ; Distilled water, 1000ml; pH 7.2

کیتین در دمای 105 درجه به مدت 5 دقیقه جداگانه اتوکلاو و بقیه محیط در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه استریل شد.

کیتین کلوییدی سوبسترایی است که از پوست شاه میگو تهیه می شود، این ترکیب از آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهراء تهیه شد.

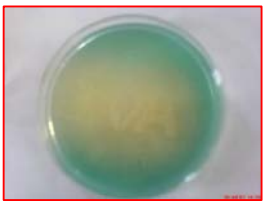
ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی ها نشانه تولید آنزیم می باشد (17).

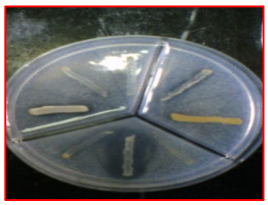


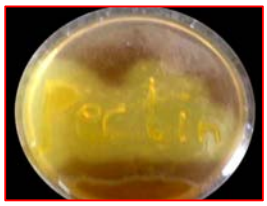
(1)

(2)

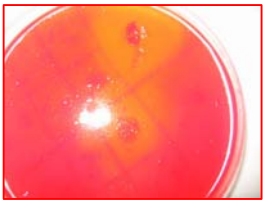
(3)

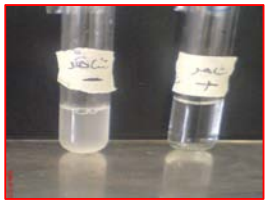

(4)

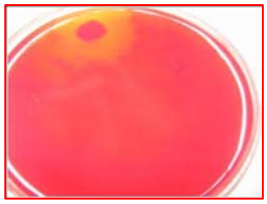

(5)



(6)


(7)


(8)


(9)

(10)

شـــکل2-فعالیـــت آمیلـــولیتیکی(1) ، پروتئـــولیتیکی(2) ، لیپـــولیتیکی(3)، نوکلئـــازی(4)، اینولازی(5)، پکتینازی (6)، سلولازی (7) ، پولولانازی(8)، گزیلانـازی(9) و کیتینـازی (10) سویه ها در سطح پلیت

جدول 3- نتایج مربوط به بررسی شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سویه های منتخب

	AMB1	AMB2	AMB3	AMB 4	AMB5	AMB 6	AMB 7	AMB8	AMB9
تولید رنگدانه	زرد	کرم	زرد پرنگ	زرد	کرم/سفید	زرد	کرم/سفید	کرم/سفید	کرم/سفید
واکنش گرم	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آرایش میکروسکوپی	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای
موقعیت اسپور	مرکزی/ بیضوی	مرکزی/ بیضوی	مرکزی ،نزدیک انتها/بیضوی	مرکزی/ بیضوی	مرکزی/ بیضوی	مرکزی/ بیضوی	مرکزی/ بیضوی	–	مرکزی/ بیضوی
حرکت	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بی هوازی اختیاری	–	+	–	–	–	+	+	–	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	–	+	+	+	+	–	+	+	+
محدوده رشد نمک درصد	1-25 درصد	5-25 درصد	5-25 درصد	5-25 درصد	5-25 درصد	0-20 درصد	5-25 درصد	1-25 درصد	0-25 درصد
بهینه رشد نمک درصد	5 درصد	5 درصد	10 درصد	5 درصد	10 درصد	5 درصد	5 درصد	5 درصد	5 درصد
محدوده دمایی ^{0}C	10-50	10-40	10-45	10-45	10-40	10-40	10-45	10-50	10-50
محدوده PH	6-11	5-11	6.5-11	-11 6.5	6.5-11	6-11	6-11	5-11	5-11
هیدرولیز ژلاتین	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اوره	–	–	–	–	–	–	–	–	–
سیمون سیترات	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MRVP	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تولید H_2S	–	–	–	–	–	–	–	–	–
احیای نیترات	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تولید اسید از :									
گلوکز	+	+	–	+	+	+	+	–	+
گالاکتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
فروکتوز	+	–	+	+	+	+	–	+	+
ساکارز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
مالتوز	–	+	+	+	–	+	+	+	+
گزیلوز	–	–	+	+	–	+	–	+	–
مانیتول	+	–	+	+	+	–	–	+	+
رامنوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
مصرف منابع کربن :									
دکسترین	+	+	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+	+
سلوبیوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تره هالوز	+	+	$+_w$	+	+	+	+	+	+
آسکولین	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+

گلیسیرین	+	+	$+_w$	+	+	+	+	+	+
نشاسته	+	+	+	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+
گلوکز	+	+	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+	+
آدونیتول	+	+	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+	+
سالیسین	+	+	$+_w$	$+_w$	+	+	$+_w$	+	+
مالتوز	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+
د-سوربیتول	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	+	+	+

W: weak

جدول 3- نتایج مربوط به بررسی شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سویه های منتخب (ادامه جدول)

	AMB1	AMB2	AMB3	AMB4	AMB5	AMB6	AMB7	AMB8	AMB9
مصرف اسید آمینه									
L-آسپاراژین	+	+	−	+	+	+	+	+	+
L-آلانین	+	+	−	−	−	+	+	+	+
L-هیستیدین	$+_w$	−	$+_w$	$+_w$	−	$+_w$	−	$+_w$	−
L-لوسین	+	−	+	$+_w$	$+_w$	+	+	−	$+_w$
L-آرژنین	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-متیونین	+	$+_w$	$+_w$	−	−	+	$+_w$	+	+
L-سیستئین	$+_w$	−	−	−	$+_w$	−	−	+	+
L-لیزین	−	−	$+_w$	−	−	−	$+_w$	$+_w$	+
L- تیروزین	$+_w$	−	−	−	−	$+_w$	$+_w$	$+_w$	−
حساسیت به آنتی بیوتیک									
سفالوتین 30mcg	نیمه حساس	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم
کلرامفنیکل 30mcg	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس
اریترومایسین 15mcg	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم
تتراسایکلین 30mcg	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم
نوبیوسین 5mcg	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس
پنی سیلین 10 u pe discs	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
ریفامپیسین 5mcg	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
باسیتراسین .04u per discs	مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم
تولید آنزیم :									

آمیلاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
پروتئاز	+	−	−	+	+	−	+	+	+
لیپاز	+	−	−	+	+	−	+	−	+
نوکلئاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اینولینیاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گزیلاناز	−	−	−	−	−	_	−	−	−
پولولاناز	−	−	−	−	−	−	+	−	−
کربوکسی متیل سلولاز	+	−	−	−	−	−	−	+	−
پکتیبناز	+	+	+	−	+	_	−	+	−
کیتیناز	+	+	+	−	−	_	−	=	−

جدول 3- نتایج مربوط به بررسی شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سویه های منتخب (ادامه جدول)

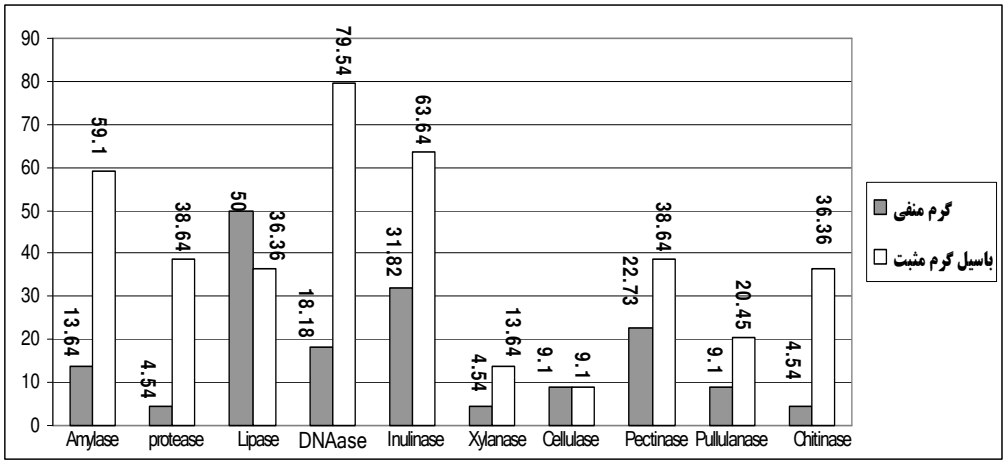
	AMB10	AMB11	AMB12	AMB13	AMC1	AMC2	AMG1	AMG2	AMG3
تولید رنگدانه	کرم/سفید	کرم/سفید	کرم/سفید	زرد	نارنجی	صورتی	کرم/سفید	کرم/سفید	کرم
واکنش گرم	+	+	+	+	کوکوس +	کوکوس +	−	−	−
آرایش میکروسکوپی	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای	کوکسی	کوکسی	کوکوباسیل	میله کوتاه	خمیده
موقعیت اسپور	E/C	E/C	E/C	E/C	−	−	−	−	−
حرکت	+	+	+	−	+	+	−	+	+
بی هوازی اختیاری	+	$+_w$	+	−	−	$+_w$	+	−	−
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
محدوده رشد نمک درصد	1-25 درصد	5-25 درصد	1-25 درصد	5-25 درصد	0-25 درصد	0-20 درصد	0-25 درصد	5-25 درصد	10-25 درصد
بهینه رشد نمک درصد	5 درصد	5 درصد	5 درصد	15 درصد	5 درصد	5 درصد	5 درصد	5 درصد	15 درصد
محدوده دمایی ^0C	10-50	10-45	10-50	10-40	10-40	10-50	10-50	10-50	10-40
محدوده PH	5-11	5-11	5-11	6-11	6-11	5-11	6-11	6-11	5-10
هیدرولیز ژلاتین	−	−	−	−	−	−	−	−	−
اوره	−	−	−	−	−	−	−	−	−
سیمون سیترات	−	−	−	−	−	−	−	−	−
MRVP	−	−	−	−	−	−	−	−	−
تولید H_2S	−	−	−	−	−	−	−	−	−
احیای نیترات	−	+	+	−	−	−	−	−	−
تولید اسید از :									
گلوکز	−	+	+	+	−	−	−	−	−
گالاکتوز	−	−	+	−	−	−	−	−	−
فروکتوز	−	+	+	+	−	+	−	−	−
ساکارز	−	−	−	−	−	−	−	−	−
مالتوز	−	+	+	−	−	−	−	−	−
گزیلوز	−	−	−	−	−	−	−	−	−
مانیتول	−	−	+	+	+	−	−	−	−
رامنوز	−	−	−	−	−	−	−	−	−
مصرف منابع کربن :									
دکسترین	+	+	$+_w$	−	−	$+_w$	+	$+_w$	−
سلوبیوز	+	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	−

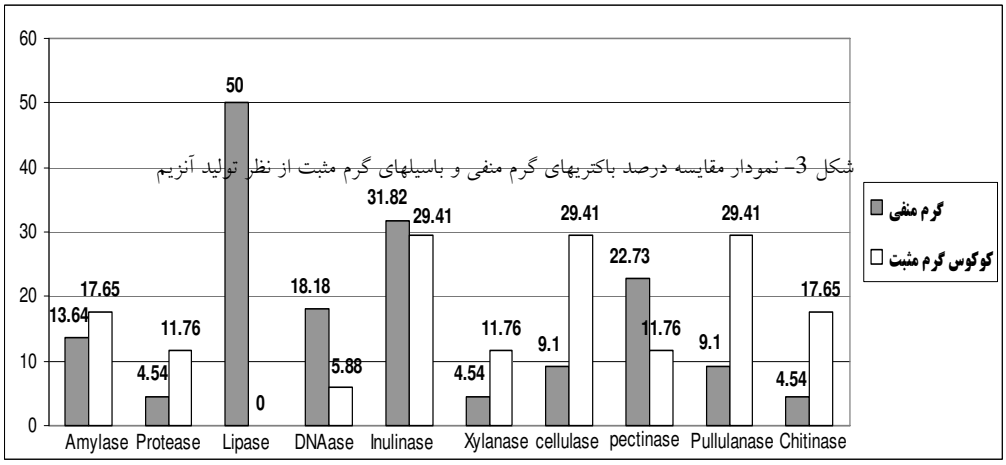
تره هالوز	+	+	$+_w$	$+_w$	−	$+_w$	+	$+_w$	−
آسکولین	$+_w$	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	−	−
گلیسیرین	+	+	$+_w$	−	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	+
نشاسته	+	+	$+_w$	+	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	−
گلوکز	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	+
آدونیتول	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	−
سالیسین	+	+	$+_w$	$+_w$	−	+	$_+$	$+_w$	−
مالتوز	+	+	$+_w$	−	-	−	+	−	
د-سوربیتول	+	+	$+_w$	$+_w$	$+_w$	$+_w$	+	$+_w$	−

جدول 3- نتایج مربوط به بررسی شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سویه های منتخب (ادامه جدول)

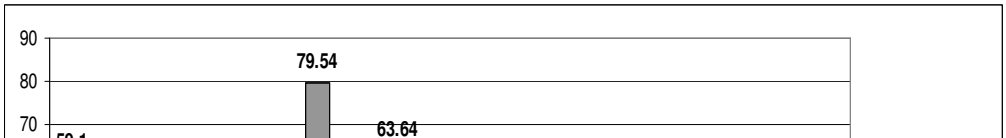
	AMB10	AMB11	AMB12	AMB13	AMC1	AMC2	AMG1	AMG2	AMG3
مصرف اسید آمینه									
L-آسپاراژین	+	+	+	−	−	+	+	+	−
L-آلانین	+	−	+	−	−	−	−	−	−
L-هیستیدین	$+_w$	$+_w$	−	−	−	−	−	$+_w$	$+_w$
L-لوسین	$+_w$	+	+	$+_w$	-	−	$+_w$	$+_w$	-
L-آرژنین	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-متیونین	+	+	+	$+_w$	−	+	$_+$	$+_w$	−
L-سیستئین	+	−	−	−	−	−	−	−	−
L-لیزین	+	$+_w$	$+_w$	−	−	+	$_-$	+	−
L- تیروزین	$+_w$	−	−	−	−	−	$+_w$	−	−
حساسیت به آنتی بیوتیک									
سفالوتین 30mcg	مقاوم	حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
کلرامفنیکل 30mcg	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	حساس
اریترومایسین 15mcg	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس
تتراسایکلین 30mcg	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس
نوبیوسین 5mcg	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
پنی سیلین 10 u	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
ریفامپیسین 5mcg	مقاوم	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	حساس
باسیتراسین 0/4 u	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم		مقاوم	مقاوم

تولید آنزیم :									
آمیلاز	+	+	+	−	+	+	−	−	−
پروتئاز	+	−	+	−	−	+	−	−	−
لیپاز	−	+	+	−	−	−	−	+	+
نوکلئاز	+	+	+	−	−	+	−	+	−
اینولیناز	+	+	+	−	+	+	−	−	−
گزیلاناز	−	+	−	−	−	_	−	−	−
پولولاناز	+	−	+	−	−	$+_w$	−	−	−
کربوکسی متیل سلولاز	−	−	−	+	+	−	+	−	−
پکتیبناز	+	+	+	+	−	_	+	−	−
کیتیناز	+	−	+	+	−	+	−	−	−



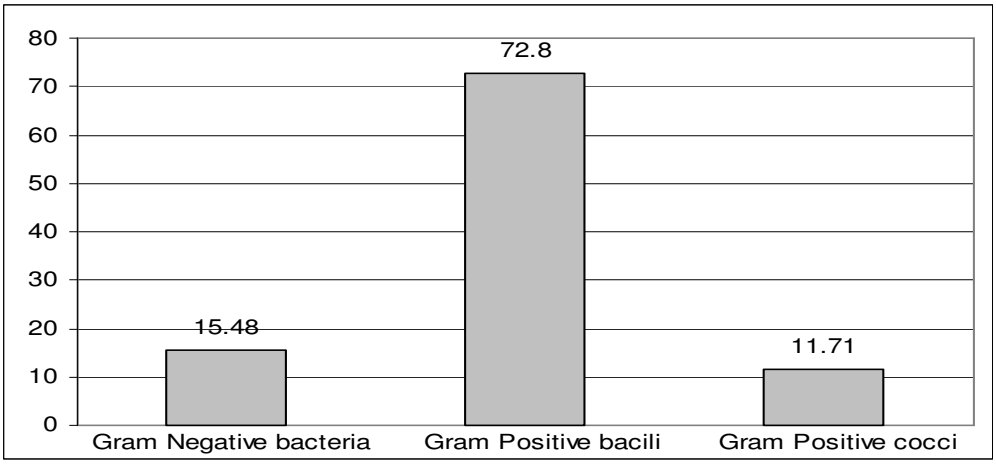


شکل 3- نمودار مقایسه درصد باکتریهای گرم منفی و باسیلهای گرم مثبت از نظر تولید آنزیم



شکل4- نمودار مقایسه درصد باکتریهای گرم منفی و کوکوسهای گرم مثبت از نظر تولید آنزیم

شکل 5- نمودار مقایسه درصد باسیلهای گرم مثبت و کوکوسهای گرم مثبت از نظر تولید آنزیم



شکل 6-نمودار مقایسه نمک دوست های نسبی از نظر تولید آنزیم

تولید خارج سلولی گزیلاناز: محیط کشت تولید آنزیم گزیلاناز) :

Xylan, 1درصد ; yeast extract, 0.2 درصد ; peptone, درصد 0.015 $CaCl_2$ + درصد 0.05 $MgSO_4$; درصد 0.5 ; NaCl, 10 درصد ; Agar, 2 درصد ; Distilled water, 1000ml; pH 7.2

گزیلان از طریق صاف کردن استریل و بقیه محیط در دمای 121 درجه به مدت 15 دقیقه استریل شد.

اضافه کردن معرف کنگورد 0/1 درصد و شستن با محلول نمک مولار و ایجاد نواحی شفاف نشانه تولید آنزیم می باشد (24 و 25).

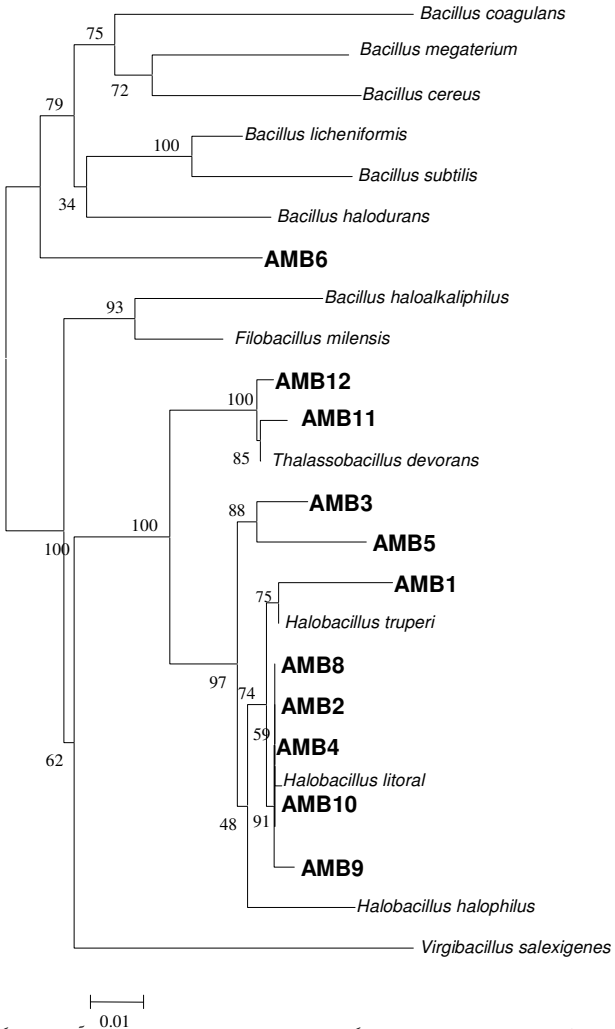
در شکل 2 فعالیت آمیلولیتیکی، پروتئولیتیکی، لیپولیتیکی، نوکلئازی، اینولازی، پکتینولیتیکی، سلولازی، پولولانازی، کیتینازی و گزیلانازی سویه ها در سطح پلیت نشان داده شده است.

خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: خصوصیات مرفولوژیکی کلنی ها بر روی محیط نوترنیت آگار به اضافه 10 درصد سدیم کلراید بعد از دو روز مشاهده شد. رنگ آمیزی گرم بر اساس روش Burke (12) انجام شده، برای حصول اطمینان با استفاده از KOH 3 درصد نیز بررسی واکنش گرم در سویه ها تکرار شد (4). شکل میکروسکوپی با استفاده ازعدسی 100 میکروسکوپ نوری بررسی شده، حرکت در باکتری از طریق روشهای لام مرطوب (12) و کشت در محیط نیمه جامد (4) و فعالیت کاتالاز به وسیله تولید حباب در محلول 3 درصد هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسکهای آماده اکسیداز (شرکت ایران دارو) تعیین شد. با ذوب ژلاتین در دمای 18 درجه سانتی گراد هیدرولیز ژلاتین در محیط نوترینت ژلاتین آگار انجام شد. بررسی مصرف منابع کربن در محیط Carbohydrate Utilization Medium و تولید اسید از قند ها براساس روش و محیط توصیه شده به وسیله Ventosa و همکاران 1982 (20) انجام شد. احیای نیترات ، میتل رد، وژزپرسکوئر براساس روشهای توصیه شده Krieg و Smibert 1994 (19) صورت گرفت. تمام آزمایشهای بالا در محیطهای با 10 درصد سدیم کلراید انجام شد. رشد باکتری از طریق تراکم نوری (OD) و با استفاده از اسپکتروفتومتر شیمادزو مدل UV-220-02 در طول موج 620 نانومتر اندازه گیری و تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم 0 تا 25 درصد نمک در دمای 35 درجه سانتی گراد در محیط نوترین براث مورد سنجش قرار گرفت. محدوده pH برای رشد با تنظیم نهایی بین 5 تا 11 تعیین و برای تنظیم 5 pH بافر سیترات ، 6و7 pH بافر

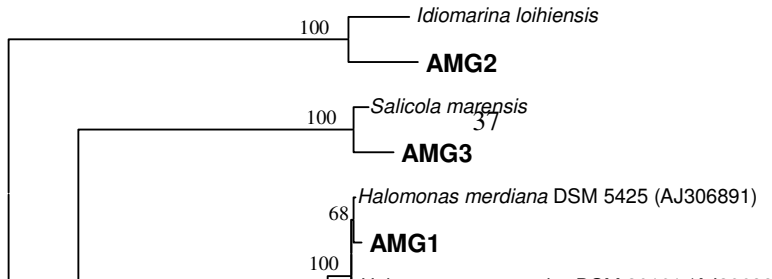
فسفات و pH 8 بافر تریس و 9 و10و11 pH بافر گلیسین استفاده شد. رشد در دماهای مختلف در محیط نوترینت براث در دماهای 50-10 درجه سانتی گراد بررسی و مقاومت آنتی بیوتیکی با تلقیح سوسپانسیون باکتریها (1×10^6cfu/ml) در پلیت های مولر هینتون آگار دارای 10 درصد سدیم کلراید و با بکارگیری دیسکهای آنتی بیوتیکی انجام و هاله های عدم رشد بعد از 2 روز گرما گذاری در دمای 37 درجه سانتی گراد اندازه گیری گردید و با توجه به جدول کارخانه سازنده دیسکها مورد تفسیر قرار گرفت. دیسکهای آنتی بیوتیکی که برای آنتی بیوگرام استفاده شد از شرکت پادتن طب تهیه گشت.

برای مشاهده اسپور باکتری از محیط اسپورلاسیون آگار حاوی 50 گرم سدیم کلراید، (3) با ترکیب زیر استفاده شد (گرم در لیتر).

Nutrient broth, 6.0; $MnSO_4$, $4H_2O$, 0.03; KH_2PO_4, 0.25; Agar, 12; Distilled water, 1000ml



شکل 7- درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط سویه‌های منتخب میله‌ای گرم مثبت جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل (AMB1، AMB2، AMB3، AMB4، AMB5، AMB6، AMB8، AMB9، AMB10، AMB11، AMB12) با دیگر انواع باسیلوس‌ها و جنسهای وابسته براساس سکوانس 16S rRNA



شکل 8- درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط سویه‌های منتخب گرم منفی جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل (AMG1، AMG2 و AMG3) با دیگر انواع باکتریهای میله‌ای گرم منفی براساس سکوانس 16S rRNA

برای بررسی استفاده منابع کربنی قندی مختلف به وسیله باکتری از محیط پیشنهاد شده به وسیله Ventosa و همکاران (1982) (20) با ترکیب زیر استفاده شد (W/V درصد) :

NaCl, 5; KCl, 0.2; $MgSO_4.7H_2O$, 0.02; KNO_3, 0.1; $(NH_4)_2HPO_4$, 0.1; KH_2PO_4, 0.05; Filter-sterilised subsrrate, 0.1; Carbohydrate, 0.2; pH, 7.2

برای بررسی استفاده منبع نیتروژن (اسید آمینه) از محیط با ترکیب زیر استفاده شد(W/V درصد).

NaCl,10 ; KCl, 0.2 ; $MgSO_4.7H_2O$,0.02 ; KH_2PO_4, 0.05 ; Amino acid, 0.1 ; pH 7.2

محیط تولید اسید از قند ها براساس محیط پیشنهادی Ventosa و همکاران (1982) (20) تنظیم شد (W/V درصد):

NaCl, 5; Pepton, 1 ; Yeast extract, 0.5; Phenol red, 0.001; Carbohydrate, 1

استخراج DNA و آنالیز توالی 16S rRNA : برای استخراج DNA ژنومی از بیومس آماده، از کیت مخصوص استخراج DNA ژنومی (Bioneer) استفاده شد.

ژن 16S rRNA جدا شده با استفاده از پرایمرهای یونیورسال (universal primers) 8fd با توالی

5′-GGACAGTTTGATCA/CTGGC-3′ و

1492R 5′CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT- 3 تکثیر شد.

واکنش PCR در 35 سیکل به مدت 5 دقیقه با دمای ذوب اولیه 95 درجه سانتی گراد، به مدت 45 ثانیه ، دمای ذوب 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، دمای 55 درجه سانتی گراد annealing به مدت 1.30 دقیقه، دمای سنتز رشته ها 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه و دمای

اضافی نهایی 72 درجه سانتی گراد انجام و سپس محصولات PCR برای تعیین توالی به کشور کره فرستاده شد.

نتایج

جداسازی سویه های باکتریایی از نقاط مختلف: در ابتدا حدود 140 ایزوله از خاک، آب ، لجن، نمک و رسوبات دریاچه نمک آران و بیدگل جدا شد. از میان آنها 135 ایزوله نمک دوست نسبی و نمک دوست اجباری، 7 ایزوله تحمل کننده نمک بودند. براساس شباهتهای فنوتیپی در میان ایزوله های جداسازی شده ، در نهایت 83 سویه نمک دوست جدا که شامل 24 باسیل گرم منفی ، 44 باسیل گرم مثبت و 17 کوکوس گرم مثبت بودند.

بررسی فعالیتهای آنزیمهای هیدرولیتیک در سویه های جدا سازی شده: سویه هایی جدا شده در مرحله بعد از نظر فعالیت آنزیمهای هیدرولیتیکی بررسی شده که فعالیتهای هیدرولیتیکی تنوع زیادی در میان باکتریها داشتند. از 83 کلنی جدا شده روی محیط غربال گری، 32 کلنی تولید کننده آمیلاز، 20 کلنی تولید کننده پروتئاز ، 27 کلنی تولید کننده لیپاز ، 40 کلنی تولید کننده نوکلئاز، 40 کلنی تولید کننده اینولیناز، 9 کلنی تولید کننده گزیلاناز، 11 کلنی تولید کننده کربوکسی متیل سلولاز، 24 کلنی تولید کننده پکتیناز، 16 کلنی تولید کننده پولولاناز و 20 کلنی تولید کننده کیتیناز بودند بنابراین بالاترین آنزیم تولید شده در این باکتری ها اینولیناز و DNase و پایین ترین آنزیم تولید شده گزیلاناز بود عده ای از باکتریهای جدا شده قادر به تولید مخلوطی از این آنزیمها بودند.

مقایسه بین باکتریهای جدا شده بر اساس توانایی تولید آنزیم: بر اساس شکل 3 در مقایسه توانایی تولید آنزیم در باسیلهای گرم منفی و باسیلهای گرم مثبت توانایی تولید اکثر آنزیمها در باسیلهای گرم مثبت بیشتر از باسیلهای گرم منفی بود ولی در مورد آنزیم لیپازتوانایی تولید در باسیلهای گرم منفی بیشتراز باسیلهای گرم مثبت می باشد و تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در هر دو مشابه است. براساس شکل 4 نیز تولید بیشتر این آنزیمها در کوکوسهای گرم مثبت بیشتر از باسیلهای گرم منفی بوده وتنها تولید آنزیم لیپاز در باسیلهای گرم منفی در مقایسه با کوکوسهای گرم مثبت اختلاف فاحشی را نشان می دهد، همچنین تولید آنزیمهای DNase، اینولیناز و پکتیناز در باسیلهای گرم منفی بیشتر است. براساس شکل 5 در مقایسه باسیلهای گرم مثبت و کوکوسهای گرم مثبت، تولید آنزیمهای آمیلاز، DNase و اینولیناز با تولید بسیار بالا در باسیلهای گرم مثبت و تولید آنزیمهای کربوکسی متیل سلولاز و پولولاناز در کوکوسهای گرم مثبت نشان داده شده است. شکل 6 بیانگر این حقیقت است که در کل تولید آنزیمهای هیدرولازی در باسیلهای گرم مثبت بیشتر از باسیلهای گرم منفی و کوکوسهای گرم مثبت می باشد

انتخاب سویه های برتر باکتریایی: از 83 سویه باکتری نمک دوست نسبی 20 سویه براساس توانایی در تولید آنزیمهای هیدرولیتیک بیشتر و فراوانی میکروارگانیسم های جدا شده ، انتخاب شده و از این 20 سویه 11 باسیل گرم مثبت اسپوردار ، 1 باسیل گرم مثبت بدون اسپور ، 3 باسیل گرم منفی و 5 کوکوس گرم مثبت بودند. در جدول3 ویژگیهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی این سویه های منتخب نشان داده شده است .

بررسیهای فیلوژنی سویه های منتخب: بر اساس ترادف رفت 16S rRNA سویه های مطالعه شده متعلق به جنسهای نمک دوست نسبی *Halobacillus*، *Salinococcus*، *Thalassobacillus*، *Bacillus*، *Staphylococcus*، *Marinococcus*، *Nesterenkonia* ، *Idiomarina* ، *Salicola*، *Halomonas* بوده که شباهتهای بین 94 -99 درصد بین گونه ها و سویه های متعلق به این جنسها را نشان دادند که نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه در سطح گونه با گونه های شناخته شده در

این جنسها هستند و احتمالاً در گونه های جدیدی می توانند قرار گیرند. با توجه به یافته های حاصل از بررسی ترادف رفت 16 S rDNA که مبتنی بر تعیین توالی ژنتیکی 900-750 نوکلئوتید از ژن 16 S rDNA بود، درختچه فیلوژنی سویه های یافت شده با استفاده از روش neighbor joining رسم و قرابت ژنتیکی سویه های بومی با سویه های باکتریایی شناسایی شده، مشخص شد.(تصاویر 7، 8 و 9)

از 83 ایزوله محیطی جدا شده 36 سویه متعلق به جنس *Halobacillus*، 7 سویه متعلق به جنس *Thalassobacillus*، 6 سویه متعلق به جنس *Salinicoccus*، 1 سویه متعلق به جنس *Marinococcus* ، ا سویه متعلق به جنس *Nesterenkonia*، ا سویه متعلق به جنس *Staphylococcus* 10 سویه متعلق به جنس *Halomonas* ، 11 سویه متعلق به جنس *Salicola* ، ا سویه متعلق به جنس *Idiomarina* و 9 سویه نا مشخص بودند. شناسایی تاگزونومی 83 ایزوله محیطی قادر به تولید آنزیمهای هیدرولیتیک مختلف در جدول 4 نشان داده شده است.

بحث

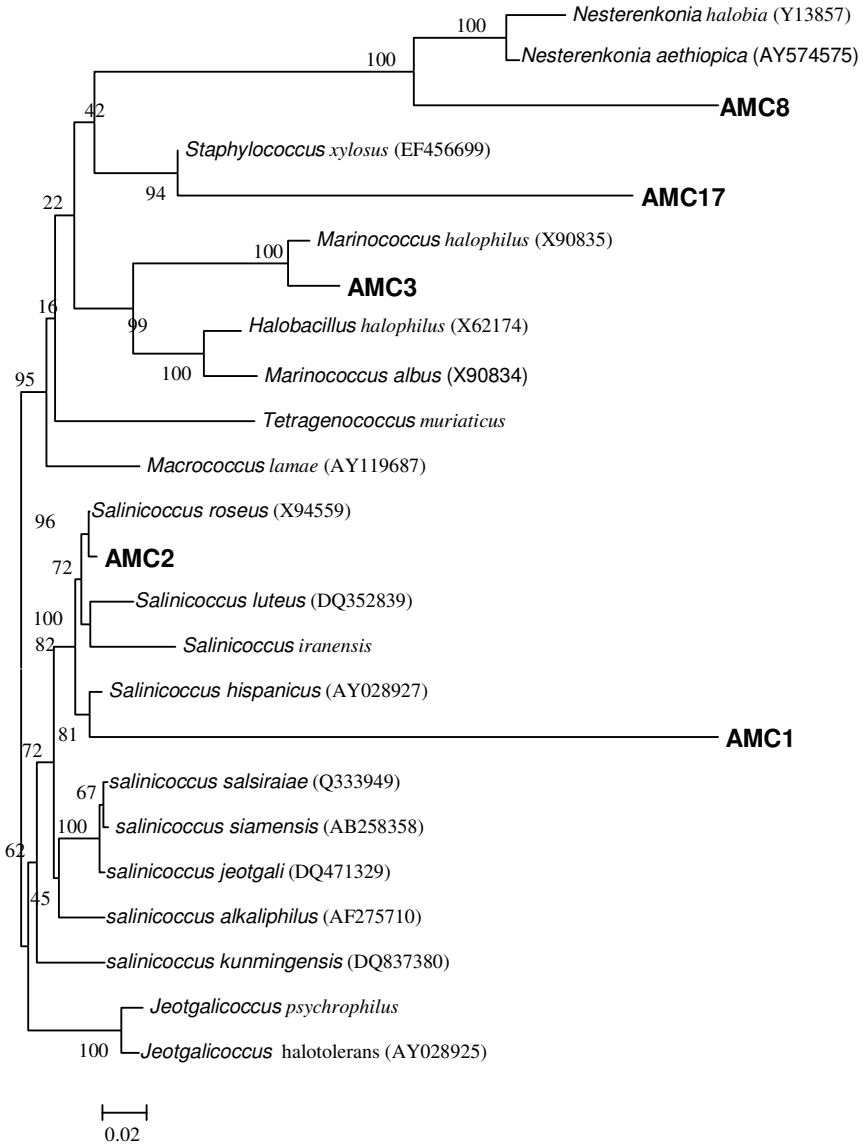
آنزیمهای هیدرولیتیک خارج سلولی مانند آمیلازها، پروتئازها، لیپازها، DNase ها، پولولانازها، گزیلانازها، کیتینازها ،اینولینازها و سلولازها در فرآیندها و صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، افزودنیهای خوراکی، صنایع شیمیایی و علوم پزشکی دارای کاربردهای زیادی هستند. آنزیمهایی که بتوانند دارای فعالیت بهینه در شرایط سخت صنعتی از نظر دما و نمک باشند اهمیت بسیار بالایی دارند و نمک دوستها منبع احتمالی مناسب برای چنین آنزیمهایی هستند.

میکرو ارگانیسم‌های نمک دوست خطر آلودگی در محیط را کاهش داده، در غلظتهای نمک بالا می توانند رشد کنند، سریع الرشد بوده، نیاز های غذایی شان ساده است، محدوده وسیعی از ترکیبات را به عنوان منبع کربن ومنبع انرژی استفاده می کنند و در نهایت دستکاری ژنتیکی شان نسبت به سایر میکرو ارگانیسم‌ها ساده تر است. به علاوه، آنزیمها دارای پوششهای محلول غنی از نمک بوده که احتمالاً برای حفظ فعالیت کاتالیتیکی شان در محیطهای با آب فعال پایین ضروری است چنین خصوصیاتی می تواند در کاربرد این آنزیمها در زمینه‌های مختلف در نظر گرفته شود.

بیشتر ایزوله‌های محیطی قادر به تولید آنزیمهای هیدرولیتیک، متعلق به جنسهای گرم مثبت بخصوص باسیلهای گرم مثبت اسپور دار بودند که چنین یافته ای نیز با شرایط اکستریمی که در این دریاچه پر شور به علت بالا بودن نمک به عنوان یک فاکتور اکستریم حاکم است کاملاً قابل انتظار بنظر می رسد.

در مقایسه درصدی بین باسیلهای گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی، باسیلهای گرم مثبت در تولید تمام آنزیمهای هیدرولیتیک مذکور بر باسیلهای گرم منفی غالب بوده بجز در تولید آنزیم لیپاز که در مورد این آنزیم، باسیلهای گرم منفی نسبت به کمتر بودن تعدادشان تولید کنندگان بهتری بودند. در مقایسه درصدی بین باسیلهای گرم مثبت و کوکوسهای گرم مثبت در تولید هفت آنزیم آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، DNase، اینولیناز، پکتیناز و کیتیناز باسیلهای گرم مثبت غالب بودند، در حالی که در تولید آنزیمهای گزیلاناز، سلولاز و پولولاناز کوکوسهای گرم مثبت نسبت به کمتر بودن تعدادشان تولید کنندگان بهتری بودند، و در رابطه با آنزیم لیپاز در باسیلهای گرم مثبت و کوکوس های گرم مثبت، تنها باسیلهای گرم مثبت تولید کننده این آنزیم بودند. در نهایت در مقایسه درصدی بین باسیلهای گرم منفی و کوکوسهای گرم مثبت در تولید آنزیم لیپاز، DNase، اینولیناز و پکتیناز باسیلهای گرم منفی غالب بوده در حالی که در تولید آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، گزیلاناز،

سلولاز، پولولاناز و کیتیناز کوکوسهای گرم مثبت نسبت به تعداد کمترشان تولید کنندگان بهتری بودند. در مورد آنزیمهای اینولیناز وDNase به طور کلی تعداد زیادی از سویه‌های نمک دوست نسبی جدا شده تولیدکنندگان قوی این دو آنزیم بودند.



شکل 9- درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط سویه‌های منتخب کوکسی گرم مثبت جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل (AMC1، AMC2، AMC3، AMC8 و AMC17) با دیگر کوکوس‌های گرم مثبت براساس سکوانس 16S rRNA

مطالعات مشابه با تحقیق انجام شده در خارج از کشور، sanchez-porro و همکاران در سال 2003 (16) که فراوانی 5 آنزیم هیدرولیتیک آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، DNase و پولولاناز را در باکتریهای نمک دوست نسبی در

حوضچه‌های شور در اسپانیا نشان داده است، Flores-Fernandez و همکاران در سال 2007 (6) تنوع ژنتیکی 18 باکتری نمک دوست نسبی تولید کننده 3 آنزیم هیدرولیتیک آمیلاز، پروتئاز و لیپاز را از شورابه نمکی Pilluana در پرو نشان داده است و Moreno و همکاران در سال 2007 (11) تنوع زیستی نمک دوستهای اجباری تولید کننده 4 آنزیم هیدرولیتیک آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و DNase را در زیستگاههای شور در اسپانیا نشان داده است. ویژگی این تحقیق در مقایسه با کارهای انجام شده بدین صورت است که اولاً در این تحقیق فراوانی 10 آنزیم هیدرولیتیک خارج سلولی (آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، DNase ، اینولیناز، گزیلاناز، پولولاناز، پکتیناز، کربوکسی متیل سلولاز و کیتیناز) در باکتریهای نمک دوست نسبی در دریاچه نمک آران و بیدگل نشان داده شده ثانیاً موفق به جداسازی سویه‌هایی شده که تولید کننده‌های قابل توجه آنزیمهای اینولیناز، پکتیناز و کیتینار بودند، این آنزیمها از جمله آنزیمهایی هستند که برای اولین بار گزارش شده‌اند، ثالثاً مطالعات اکولوژیکی در محیط شور دریاچه نمک آران و بیدگل منجر به جداسازی و شناسایی تعداد گسترده‌ای از باکتریهای نمک دوست نسبی با توانایی تولید مخلوطی از این آنزیمها شد و این سویه‌ها، سویه‌های ارزشمندی برای اهداف بیوتکنولوژیکی محسوب می‌شوند.

برخلاف Sanchez-Porro و همکاران 2003 (16) که هیچ باکتری نمک دوست تجزیه کننده گزیلان را جدا نکردند و احتمالاً بخاطر عدم تعیین فعالیت گزنولیتیکی روی محیط جامد غربالگری با توجه به پایین بودن فعالیت گزنولیتیکی برای ایجاد ناحیه شفاف در سطح پلیت است، این تحقیق توانسته سویه‌های تولید کننده گزیلانازی را جدا کند که بیشتر سویه‌های تولید کننده این آنزیم متعلق به باسیلهای میله‌ای گرم مثبت تشکیل دهنده اسپور *Halobacillus* و *Thalassobacillus* بوده ولیکن کم بودن تعداد سویه‌های گزیلانازی جدا شده احتمالاً بعلت کم بودن این پلیمر در زیستگاههای شور می باشد و بنابراین سویه‌های تولید کننده این آنزیم نرمال این زیستگاهها نیستند. تاکنون اطلاعات کمی در مورد باکتریها و آرکیهای نمک دوست تجزیه کننده این پلیمر در محیطهای پر شور وجود دارد و تنها یک تعداد کمی از نمک دوستهای گزنولیتیک جداسازی و توصیف شده‌اند (24). از جمله سویه‌های نمک دوست سلولیتیک جدا شده شامل *Halocella cellulolytica* sp. nov. (19) باکتری گرم منفی نمک دوست نسبی، میله‌ای غیر تشکیل دهنده اسپور و بی‌هوازی جدا شده از مرداب شور دریاچه Sivash و باکتری هالوآلکالیفیلیک بی‌هوازی سویه Z-7026 متعلق به کلاستر 3 *Clostredia* با درصد G+C پایین (27) جدا شده از جامعه میکربی رسوبات دریاچه سودا است. برخلاف این سویه‌های جدا شده بیشتر سویه‌های سلولیتیک جدا شده در این تحقیق گرم مثبت هوازی، بی‌هوازی اختیاری بودند.

جداسازی سویه‌های تولید کننده DNase و اینولیناز نسبت به سایر آنزیمهای هیدرولیتیک بررسی شده از بیشترین فراوانی برخوردار بودند. تمامی گروههای باکتریایی جدا شده‌ی این تحقیق توانایی تولید آنزیم DNase را داشته ولیکن بیشترین سویه‌های تولید کننده‌ی DNase متعلق به جنس *Halobacillus* بوده در حالی که در تحقیق Sanchez-Porro 2003 (16) تولید آنزیم DNase در کوکوس‌های گرم مثبت مشاهده نشد و بیشتر سویه‌های تولید کننده DNase متعلق به جنس *Bacillus*-*Salibacillus* بودند. تولید آنزیم اینولیناز از جمله آنزیمهایی بود که برای اولین بار در نمک دوستها گزارش شد و بیشتر سویه‌های جدا شده توانایی تولید این آنزیم را داشتند. بیشتر سویه‌های تولید کننده این آنزیم متعلق به *Halobacillus* و *Thalassobacillus* بوده و می‌توانسته روی اینولین بعنوان تنها منبع کربن رشد کرده که با توجه به توانایی بالای این باکتریها در استفاده از ترکیبات مختلف در شرایط سخت قابل توجیه می باشد.

آنزیم لیپاز از جمله آنزیمهایی بود که تولید آن در میان سویه‌های گرم منفی در مقایسه با باکتریهای گرم مثبت از فراوانی بیشتری برخوردار بوده است چنین یافته‌ای با نتایج Sanchez-Porro و همکاران2003 (16) مطابقت داشت و لیکن بیشتر سویه‌های گرم منفی این تحقیق با توانایی تولید آنزیم لیپاز متعلق به جنس *Salicola* ، نمک دوست اجباری متعلق به گروه گاماپروتوباکتریا بود. اولین بار توسط Moreno و همکاران 2007 *Salicola* sp. strain IC10 (11) بعنوان یک تولید کننده لیپاز شناخته شد. ویژگیهای این باکتری با سویه جدا شده در این تحقیق مطابقت داشت.

در مقایسه کلی در بین باکتریهای نمک دوست نسبی بترتیب از نظر تنوع آنزیمی و فراوانی تولید آنزیم، باسیلهای گرم مثبت، باسیلهای گرم منفی و کوکوسهای گرم مثبت قرار دارند .

بیشتر ایزوله‌های محیطی گرم مثبت تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک مطابق نتایج(16) متعلق به جنس *Halobacillus* بوده که در این تحقیق نتایج مشابهی به دست آمد. و بیشتر ایزوله‌های گرم منفی جدا شده متعلق به جنسهای *Halomonas* و *Salicola* بودند. علاوه بر این، در این غربالگری ما موفق به جداسازی باکتریهایی از جنس *Thalassobacilus* و *Idiomarina*، Marinococcus، Nesterenkoniaو Staphylococcus شده که در بررسیهای انجام شده توسط Sanchez-Porro در سال 2003 (16) که بر روی محیطهای شور مختلف در جنوب اسپانیا انجام گرفت ازاین جنسهای ذکر شده هیچ سویه‌ای جداسازی نشد. همچنین آنها در مطالعات خود سویه‌هایی ازجنس *Salinivibrio* جداسازی کردند در حالی که در این تحقیق از این جنس هیچ سویه‌ای جداسازی نشد که دلیل اصلی آن را می تواند به بالاتر بودن غلظت نمکها در دریاچه نمک آران و بیدگل نسبت داد چرا که این باکتری در–10 2/5 درصد NaCl دارای رشد بهینه بوده و حداکثر غلظتی که در آن قادر به رشد باشد تا 17 درصد NaCl است، در حالی که غلظت نمکها در دریاچه نمک آران و بیدگل بسیار بالاتر و تا 30 درصد نمک هم می رسد.-Sanchez Porroدر غربالگریشان سویه‌هایی از جنس *chromohalobacter* جدا نمودند که در این تحقیق از این جنس ایزوله‌ای وجود نداشت ولی تعداد کمی از سویه‌های گرم مثبت تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک به جنس *Thalassobacilus* وتعدادکمی از سویه‌های گرم منفی تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک به جنس *Idiomarina* تعلق داشتند. مابقی سویه‌ها بر اساس تطابقهای انجام شده سویه‌های مورد نظر با سویه‌هایی که علاوه بر شناسایی صفات فنوتیپی از نظر فیلوژنی وترادف 16S rRNA مورد شناسایی دقیق تر قرار گرفته بودند متعلق به هیچ یک از جنسهای مذکور نبودند. بطور کلی در بین گرم مثبتها باکتریهای جنس *Halobacillus* غالب بوده و در میان گرم منفیها باکتریهای جنس *Halomonas* و *Salicola* غالب بودند. جنسهای باسیلوس بعنوان تولید کننده‌های آنزیمهای هیدرولیتیک خارج سلولی شناخته شده و بیشتر فرآیند های صنعتی از گونه‌های متعلق به این جنس برای تولید صنعتی آنزیمها استفاده می کنند.

تولید آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، DNase، اینولیناز، گزیلاناز، کربوکسی متیل سلولاز، پکتیناز، پولولاناز و کیتیناز در هر سه گروه باسیلهای گرم مثبت، کوکوسهای گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی مشاهده شد . تنها تولید آنزیم لیپاز در کوکوس‌های گرم مثبت دیده نشد.

در شناسایی تاگزونومی 83 ایزوله محیطی قادر به تولید آنزیمهای هیدرولیتیک مختلف جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل مشخص شد که بیشتر تولید کنندگان آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، DNase، اینولیناز متعلق به جنسهای *Halobacillus* و *Thalassobacillus* و بیشتر تولید کنندگان آنزیمهای پکتیناز، کیتیناز متعلق به جنس *Halobacillus* و بیشتر تولید کنندگان آنزیمهای گزیلاناز،

پولولاناز متعلق به جنس *Thalassobacillus* و بیشتر تولید کنندگان لیپاز متعلق به جنس *Salicola* و بیشتر تولید کنندگان کربوکسی متیل سلولاز متعلق به جنس *Salinicoccus* می باشد و بنابراین این نشانه اهمیت *Halobacillus* و *Thalassobacillus* از نظر توانمندی تولید آنزیمهای هیدرولیتیک با ارزش صنعتی می باشد.

برخی از سویه‌ها قادر به تولید ترکیبی از آنزیمهای هیدرولیتیک شامل 1سویه توانایی تولید 8 آنزیم، 3 سویه توانایی تولید 7 آنزیم، 7 سویه 6 آنزیم، 5 سویه 5 آنزیم، 9سویه 4 آنزیم، 12 سویه 3 آنزیم،14 سویه2 آنزیم شدند. این در حالی است که Sanchez-Porro در سال (2003) تنها 4 سویه با 5 فعالیت هیدرولیتیک شناسایی کرده است. همچنین برخلاف کار آنها سویه‌ای بدون فعالیت آنزیمی وجود نداشت.

سویه‌هایی با چندین فعالیت هیدرولیتیک سویه های ارزشمندی برای اهداف بیوتکنولوژیکی محسوب می‌شوند. به طور کلی در مقایسه بین جنسهای *Halomonas* وجنسهای *Halobacillus*، توانایی تولید ترکیبی از آنزیمها در جنسهای متعلق به *Halobacillus* بیشتر دیده می شد. مطالعات اکولوژیکی در این تحقیق در دریاچه نمک آران و بیدگل منجر به جداسازی وشناسایی تعداد گسترده‌ای از تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی شد که این میکروارگانیسمها برای هیدرولیز پلیمرهایی چون گزیلان ،پولولان، پکتین و کربوکسی متیل سلولز دارای توانایی بالقوه می باشند.

کشف وشناسایی چنین سویه‌هایی که توانایی تجزیه پلیمرهای زیستی را دارند یک افق تازه را در بیوتکنولوژی مدرن باز می کند.

منابع

1- Allais, J. J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C.(1986) Isolation and characterisation of bacterial strains with inulinase activity. Applied and Environmental microbiology. 52(5):1086-1090

2- Apun, K., Malaysia, S.(1995) Cellulase production. Practical biotechnology. National center for biotechnology Education

3- Atlas, R. M.(1997) Hand book of microbiology media, snd, Boca Raton, FL: CRC press

4- Baron, E. J., & Finegold, S. M.(1990) Bailey and Scott s Diagnostic Microbiology. 8 th edn, St. Louis: Mosby

5- Cowan, D. A.(1991) Industrial enzymes in biotechnology, The science and the Busines eds Moses, V. and Cape, R. E. pp 311-340. Reading ; Harwood Academic Publishers

6- Florez-Fernandez, M. L., Zavaleta, A. I., Cardenas-Fernandez, A. M., Cervantes, L. L., Coser, R. M.(2007) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes isolated from Pilluana salt brine in Peru, Halophiles-2007 congress booklet. 1: 50-51

7- Garabito, M. J., Arahal, D. R., Mellado, E., Marquez, .M. C., & Ventosa, A.(1997) Bacillus salexigenes sp.nov., a new moderate halophilic Bacillus species . Int . J. Syst. Bacteriol . 47:735-741

8- Lichfield, C. D.(2002) Halophiles. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. .28: 21-22

9- Lichfield, C. D. and Gillevent, P. M.(2002) Microbial diversity and complexity in hypersaline environments. A preliminary assessments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 48-55

10- Marcia M. C. N., da Silva, R., Gomes, E. (1999) Screening of bacterial strains for pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by bacillus sp, Revista de Microbiology. 30: 299-303

11- Moreno, M. L., Mellado, E., Garcia, M. T., Ventosa, A.(2007) Diversity of extreme halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats, Halophiles-2007 congress booklet.1: 59-60

12- Murray, R. G. E., Doetsch, R. N., & Robinow, C. F.(1994) Determination and cytological light microscopy. In method for General and molecular bacteriology: pp. 21-41. Edited by p.Gerhardt, R.G.E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg washington. DC: America society for microbiology

13- Nichaus, F., Bortoldo, C., Kahlor, M., and Antranikia, G.(1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 711-729

14- Onishi, H., Mori, T., Takechi, S., Tani, K., Kobayashi, T., & Kamekura, M.(1983) Halophilic nuclease of a moderately halophilic bacillus sp: production, purification and characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 45:24-30

15- Ruben, D., Gonzalez, Elvila C., Arenas, Elisa, B., Vilches, and Miguel A. de Billerbeck.(1993) selective procedure for isolated of microorganism producing pullulanase and isoamylase. Biotechnology techniques. volume 7 No.6. pp. 429-434.

16- Sanchez-porro. C., Martin. S., Mellado. E., and Ventosa, A.(2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, Journal of Applied Microbiology 2003. 94: 295-300

17- Shaikh S. A., and Deshpande M. V.(1993) Chitinolytic enzymes, their contribution to basic and applied research, World Journal of microbiology and biotechnology . 9: 468-475

18- Simankova, M. V., Chernych, N. A., Osipov, G. A., and Zavarzin, G. A. (1994) Halocella cellulolytica gen. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. Syst. Appl. Microbiol.16:385-389

19- Smibert, R. M., Krieg, N. R.(1994) Phenotypic characterization. In Methods for general and Molecular Bacteriology, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

20- Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraguero, F., and Ramos- Cormenzana, A.(1982) Numerical taxonomy of moderatly halophilic Gram-negative rods. Journal of General Microbiology. 128: 1959-1968

21- Ventosa, A., Marquez, M., Garabitom, M., and Arahal, D.(1998 a) Moderately halophilic Gram-positive bacteria diversity in hypersaline environments. Extremophiles. 2: 297-304.

22- Ventosa, A., Nieto., and Oren, A.(1998 b) Biology of moderatly halophilic aerobic bacteria. Microbial . Mol. Biol. 62: 504-544

23- Ventosa, A., and Nieto, J. J.(1995) Biotechnological and potential of halophilic microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 85-94

24- Waino, M., and Ingvorsen, K.(2003) Production of B-xylanase and B-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. Extremophile. 7:87-93

25- Wejse, P. L., Ingvorsen, K.(2003) Purification and characterization of two extremly halotolerant Xylanase from a novel halophilic bacterium, Extremophiles, 7: 423-431

26- Winkler, U. K., and Stuckmann, M.(1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by serratia marcescens. Journal of Biotechnology. 138: 663-670

27- Zvereva, E. A., Fedorova, T. V., Kevbrin, V. V., Zhilina, T. N., Rabinovich, M. (2006) Cellulase activity of a haloalkaliphilus an aerobic bacterium, strain Z-7026. Extremophiles. 10:651-1431

Isolation, identification and characterization of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from Aran-Bidgol salt lake

Babavalian fard H.[1], Amoozegar M.A.[2], and Pourbabaee A.A.[3]

[1]Applied Biotechnology and Environment Research Center , Baqiyatallah University of Medical sciences, Tehran, I. R. of IRAN

[2] Extremophile lab , Microbiology Dept., School of Biology, College of Science , University of Tehran, Tehran , I. R. of IRAN

[3] Biology Dept., Faculty of Science , Islamic Azad University, Qom, I. R. of IRAN

Abstract

Aran-Bidgol salt lake is one of the lakes in central desert zone of Iran and is largest playa in Iran. This lake has shape as like a triangle that top it is towards north. Base length this triangle is 35 Km and high it is 38 Km. Screening bacteria from different points Aran-Bidgol salt lake, led to the isolation of 61 Gram-positive halophilic bacteria and 22 Gram-negative bacteria able to produce different hydrolytic enzymes. These strains are able to grow optimally in media with 5-15 % salts, 35-37ºC temperature and pH 7.2. Strains No. 32, 20, 27, 40, 40, 9, 11, 24, 16 and 20 were produced amylase, protease, lipase, DNase, inulinase, xylanase, carboxy methyl cellulase, pectinase, pullulanase and chitinase. It is interesting that combined hydrolytic activities have been detected in some strains. DNase, inulinase were the most enzymes produced in Gram-positive bacilli and Gram- negative bacteria, lipase and Gram-positive cocci, pullulanase, carboxy methyl cellulase. Among these isolates, several strains with the ability to produce different valuable enzymes were selected, including AMB1(8 enzymes); AMB7, AMB10, AMB12(7 enzymes); AMB5, AMB6, AMB11, AMB13(6 enzymes); AMB2, AMB3, AMB8, AMB9(5 enzymes); AMB4, AMG1(4 enzymes); AMC1, AMC2(3 enzymes); AMC3, AMC8, AMC17, AMG2 (2 enzymes); AMG3(1 enzymes). Selected strains, after more accurate physiological and biochemical studies were identified regarding phylogeny and molecular characteristics using 16S rRNA technique. Sequencing 16S rRNA was performed to complete the identification process, which Gram-positive bacteria were belong to *Halobacillus, Thalassobacillus, Bacillus, Salinicoccus* and Gram-negative bacteria were belong to *Idiomarina, Salicola* and *Halomonas*.

Keywords: Extremophiles, halophile, hydrolytic enzymes, screening