Archive of SID

جداسازی باکتریهای نمک‌دوست نسبی تولید کننده آنزیمهای هیدرولازخارج سلولی و تحمل‌کننده نمک و بررسی اثر غلظت نمک سدیم کلراید بر تولید آنزیم

مریم زنجیربند*، روحا کسری کرمانشاهی و ناصر گلبانگ

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۸٦/٥/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۷

چکیده

باکتریهای نمک دوست نسبی گروه هتروژنی از میکروارگانیسمها را تشکیل می‌دهند و قادر به رشد در دامنه نسبتاً وسیعی از نمک سدیم کلراید هستند. غلظت نمک داخل سلولی این گروه از نمک‌دوستها، کمتر از محیط خارج سلولی آنهاست، بنابراین پروتئینهای غشایی و خارج سلولی آنها، صفات نمک‌دوست/ تحمل‌کننده نمک از خود نشان می‌دهند. برای جداسازی باکتریهای نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و کارخانه چرم‌سازی انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوستها غنی‌سازی شد و باکتریها به روش استریک پلیت خالص‌سازی شدند. در این پژوهش ٦۲ باکتری از کارخانه و ١٦ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد. در اولین مرحله غربالگری باکتریهایی که قادر به تحمل دامنه بالاتری از نمک (NaCl) بودند، (٤۲ سویه از کارخانه چرم‌سازی و ۹ سویه از آب خلیج فارس) جداسازی شدند و سپس دومین مرحله غربالگری برای بررسی حضور آنزیمهای مختلف انجام شد. از ٤۲ سویه جداسازی شده از کارخانه چرم‌سازی، ۲۲ سویه (٥۲/٤ درصد) و از ۹ سویه جداسازی شده از آب خلیج فارس، ۸ سویه (۸۸/۹ درصد) قادر به تولید آنزیمهای متفاوت بودند. نتایج نشان داد باکتریهای نمک‌دوست جداسازی شده پتانسیل نسبتاً بالایی در تولید آنزیمهای مختلف داشتند و تغییر غلظت نمک (NaCl) در تولید آنزیم عاملی تأثیرگذار بود.

واژه های کلیدی: آنزیم، باکتریهای نمک‌دوست نسبی، غربالگری، نمک

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٦۲٤۲۳٦۲-۰۳۱۱، پست الکترونیک: mzanjirband@yahoo.com

مقدمه

توانایی رشد میکروارگانیسمها در غلظتهای مختلف نمک سدیم کلراید متفاوت است. میکروارگانیسمهایی که بهینه رشد آنها در محیط فاقد نمک یا غلظتهای پایین‌تر از نمک دریا باشد ولی تراکمهای نسبتاً بالای نمک را نیز تحمل می‌کنند، تحمل کنندهٔ نمک نامیده می‌شوند (۱ و ۸).

میکروارگانیسمهای نمک‌دوست قادر به رشد در محیط فاقد نمک نمی‌باشند ،در محدوده‌ی شوری متفاوتی می‌توانند رشد کنند و دارای بهینه رشد آنها در محیطهایی با میزان شوری نسبتاً بالا می باشند. دو نوع اصلی از محیطهای شور وجود دارد، یکی خاک و دیگری آب. باکتریهای نمک‌دوست نسبی در بعضی محیطهای غیر معمول نیز یافت می‌شوند (۸). کارخانه چرم‌سازی به دلیل استفاده از نمک در مراحل مختلف فرآیند تولید، زیستگاه مناسبی برای رشد باکتریهای نمک‌دوست می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و بخشهای مختلف کارخانه چرم‌سازی انجام شد تا تفاوت باکتریهای جداسازی شده از نظر نمک‌دوستی، دامنه تحمل نمک، تولید آنزیم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد.

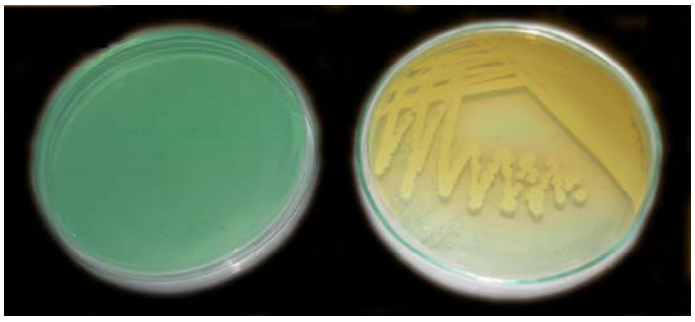
بسیاری از فرآیندهای صنعتی تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی ویژه انجام می‌شود. به این دلیل آنزیمهایی که

www.SID.ir

Archive of SID

بهینه‌ی فعالیت در گرما و غلظتهای مختلف نمک را دارند بسیار مهم و با ارزش هستند. نمک‌دوستها مهمترین منبع چنین آنزیمهایی می باشند. در نتیجه جداسازی نمک‌دوستهای نسبی که قادر به تولید آنزیمهای خارج سلولی هستند امکان فعالیت در تراکمهای مختلف نمک و تولید اکسترموزیم‌ها را فراهم می‌سازد (۱۰ و ١٤). در اروپا، کنسرسیومی از ۳۹ تیم تشکیل شده است که به وسیله‌ی Biotech-program اروپایی تأمین بودجه می‌شود و در حال تحقیق برای جداسازی و انتخاب اکسترموفیل‌ها با پتانسیل کاربردهای صنعتی می‌باشد. از بین اکسترموفیل‌ها، نمک‌دوستهای نسبی خصوصیات قابل توجه بیشتری نسبت به سایرین از خود نشان می‌دهند که بر اهمیت تحقیق در مورد آنها می‌افزاید (٦ و ١١).

پروتئاز و α- آمیلاز از مهمترین آنزیمهای کاربردی در صنایع مختلف هستند.آلودگی محیطهای کشت میکروبی از بزرگترین مشکلات در بیوتکنولوژی به‌ویژه صنعت غذا می‌باشد.استفاده از آنزیمهای تحمل کننده نمک برای رفع مشکل مذکور پیشنهاد شده است (۵، ۱۰ و ۱۲). در ایران نیز تحقیقاتی در مورد تولید α-آمیلاز از باکتریهای نمک‌دوست انجام شده است (۱). با توجه به اهمیت و کاربرد اکسترموزیم‌ها در بیوتکنولوژی و حضور آنها در باکتریهای نمک‌دوست، در این پژوهش باکتریهای مذکور جداسازی شده و از نظر تولید برخی هیدرولازها در غلظتهای مختلف نمک سدیم کلراید مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت.



شکل ۱- تغییر رنگ محیط‌کشت DNase (با معرف سبز متیل) در اثر فعالیت آنزیم نوکلئاز (غلظت نمک NaCl ۱۰ درصد می‌باشد)

مواد و روشها

۱-سویه‌های باکتریایی، جداسازی و شرایط رشد: برای جداسازی باکتریهای نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و بخش‌های مختلف کارخانه چرم‌سازی انجام شد. نمونه‌گیری از پساب کارخانه به وسیله‌ی لوله‌های آزمایش درپیچ‌دار استریل و نمونه‌گیری از پوست و روده‌ی نمک‌زده گوسفند به وسیله‌ی سواپ استریل انجام شد. برای نمونه‌گیری از آب خلیج فارس ، مقداری از آب به ارلن استریل منتقل گردید و در اسرع وقت، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال یافت(۱۳). نمونه‌ها به لوله‌های آزمایش حاوی محیط غنی کننده و اختصاصی برای باکتریهای نمک‌دوست واجد محیط نوترینت برات دارای غلظت نمکی کل(g/l)۷۱ غنی‌سازی شد. ترکیب محلول نمکی عبارت است از : (گرم در لیتر) ۵۱، NaCl ، ۷، $MgCl_2$ ، ۹/٦ ; $MgSO_4$ ، ۰/۳٦ ; ۲ ،$CaCl_2$ ، ۰/۰٦ ، KCl ، ۰/۰۲٦ ، $NaHCO_3$ ، NaBr . نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۳۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت قرار داده شد(۱ و ۱۱). در مرحله بعد به منظور خالص‌سازی باکتریها، یک لوپ از هر نمونه به محیط خالص‌سازی کننده و اختصاصی نمک‌دوستها واجد محیط نوترینت آگار به همراه غلظت نمکی مذکور انتقال یافت و به روش استریک (Streak) پلیت کشت داده شد. pH محیط با استفاده از KOH یک مولار روی ۷/۵ تنظیم شد (۱ و ۱۱). نمونه‌های خالص سازی شده برای بررسی قدرت سازگاری در غلظتهای مختلف نمک به

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت خالص‌سازی کننده و اختصاصی نمک دوست‌ها حاوی غلظتهای مختلف نمک NaCl (۱۰ ، ۱۵ ، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۲ درصد) انتقال داده شد **(۱۸)** وسپس باکتریهایی که دامنه نسبتاً وسیعی از نمک NaCl را تحمل می‌کردند، برای بررسی حضور آنزیمهای α-آمیلاز، β-لاکتاماز، پروتئاز، نوکلئاز و لیپاز انتخاب شدند.

۲- شناسایی باکتریهای جداسازی شده : برای شناسایی باکتریها از خصوصیات ماکروسکوپی (رنگ کلنی)، میکروسکوپی (مورفولوژی و واکنش گرم و تأیید آن با تست KOH)، بررسی واکنش کاتالاز، اکسیداز و تستهای بیوشیمیایی (بررسی تخمیر هیدراتهای کربن، احیای نیترات، ژلاتین هیدرولاز و حرکت) استفاده شد (۲ و ۱۶). باکتریهای میله‌ای گرم‌منفی که قادر به رشد در دامنه وسیعی از غلظت نمک NaCl بودند، علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتریهای متعلق به جنس هالوموناس (*Halomonas*) مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۰). طول قطعه تکثیر شونده توسط این پرایمرها ۲۷۷ جفت باز بود.

توالی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

Forward ectoine primer: 5'-
GGTAAYTGGGAYAGYACRC-3'
Reverse ectoine primer: 5'-
GBGGHGTRAAKACRCADCC-3'
y=C or T (pyrimidine) H=A, C or T K=G or T(keto)
R=A or G (purine) B= C, G or T D=A, G or T

۳- بررسی حضور آنزیم DNase : برای بررسی حضور آنزیم نوکلئاز، از محیط DNase همراه با ۱۰ درصد (w/v) نمک سدیم کلراید و معرف سبز متیل استفاده شد. برای بررسی دامنه تحمل نمک این آنزیم، غلظت نمک NaCl از ۰ تا ۲۰ درصد (۰-۰/۵-۵-۱۰-۱۵-۲۰درصد) تغییر داده شد(٤ و ٥).

٤- بررسی حضور آنزیم α-آمیلاز: در این تحقیق، باکتریهای خالص سازی شده به محیط کشت هیدرولیز نشاسته دارای نوترینت آگار و ۰/٤ درصد (w/v)نشاسته به اضافه‌ی۱۰ درصد نمک سدیم کلراید استفاده شد. برای بررسی دامنه تحمل نمک آنزیم، غلظت نمک NaCl از ۰ تا ۲۰ درصد (۰-۵-۱۰-۱۵-۲۰ درصد) تغییر داده شد (۵ و ۱۲).

۵- بررسی حضور آنزیم β-لاکتاماز: در اثر حمله آنزیم β-لاکتاماز به آنتی‌بیوتیکهای گروه بتالاکتام و شکستن حلقه بتالاکتام، ماده پنی‌سیلوئیک اسید تولید می‌شود که دارای دو گروه اسیدی است و به راحتی قابل شناسایی می‌باشد. در این تحقیق از روش اسیدومتری برای بررسی آنزیم مذکور استفاده شد و فعالیت این آنزیم در محیط واجد صفر تا ۱۵ درصد (w/v) نمک سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت (۵ و ۱۵). لازم به ذکر است آنزیم β-لاکتاماز در باکتری های گرم منفی در فضای پری پلاسمی قرار دارد (۱۵).

شکل ۲- تشکیل رسوب کدر شیری‌رنگ در اثر فعالیت آنزیم لیپاز و تولید اولئات کلسیم (غلظت نمک NaCl ۱۰ درصد می‌باشد)

٦- بررسی حضور آنزیم پروتئاز: برای بررسی حضور آنزیم پروتئاز از محیط کشت اختصاصی نمک‌دوستها (ترکیب محیط مذکور در بخش سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد آمده است) که شامل ۵۰ درصد شیر بدون چربی است، استفاده شد. ایجاد هاله‌ی شفاف در اطراف منطقه‌ی رشد دلیل بر تولید آنزیم پروتئاز و هیدرولیز

www.SID.ir

Archive of SID

کازئین می‌باشد (۱٤).

جدول۱- توزیع فراوانی انواع آنزیمهای تولید شده توسط باکتریهای نمک‌دوست برحسب محل جداسازی و دامنه تحمل نمک آنزیم*

دامنه تحمل نمک* NaCl	۱۵ درصد – ۰/۵				۱۵ درصد – ۰				۱۰ درصد –			
نوع آنزیم / محل جداسازی	آلفا آمیلاز	بتا لاکتاماز	نوکلئاز	لیپاز	آلفا آمیلاز	بتا لاکتاماز	نوکلئاز	لیپاز	آلفا آمیلاز	بتا لاکتاماز	نوکلئاز	لیپاز
کارخانه‌ی چرم‌سازی	۱**	۱	۵	۳	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱٤
آب خلیج فارس	۰	۰	٤	۲	۳	۱	۳	۲	۰	۱	۱	۰
جمع	۱	۱	۹	۵	۳	۱	٤	۲	۰	۱	۱	۱٤

* نتایج تولید آنزیمها پس از ۲٤ ساعت الی یک هفته مورد بررسی قرار گرفته است. ** دامنه تحمل نمک این آنزیم بین ۵ درصد تا ۱۵ درصد نمک می‌باشد.

۷- بررسی حضور آنزیم لیپاز: برای انجام این تست از محیط کشت حاوی ۱ درصدپپتون، ۱ درصد توئین ۸۰ ، ۱۰ درصدسدیم کلراید ، ۰/۱ درصد کلسیم کلراید و ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. برای بررسی دامنه تحمل نمک این آنزیم، غلظت نمک NaCl از ۰ تا ۲۰ درصد (۰-۰/۵-۵-۱۰-۱۵-۲۰ درصد) تغییر داده شد (۱٤).

جدول ۲- خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های باکتریائی جداسازی شده در این تحقیق

مورفولوژی و واکنش گرم	نام باکتری / تست	حرکت	پیگمان	اکسیداز	نیترات	آرژینوز	گلوکز	لاکتوز	ترهالوز	مانیتول	هیدرولیزنشاسته	هیدرولیزژلاتین
میله‌ای گرم منفی	*H30*	–	کرم	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	H34	–	کرم	+	+	–	+	–	+	–	–	–
	H51	+	کرم	+	+	–	+	–	+	+	–	–
	H54	+	کرم	+	+	–	+	–	+	+	–	–
	H59	+	کرم	+	+	–	+	+	–	+	–	–
	H60	+	کرم	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	H61	–	کرم	+	–	–	–	–	–	–	–	+
	H62	+	کرم	+	+	–	+	–	–	–	+	–
	H2d	–	کرم	+	+	–	+	–	–	–	–	–
میله‌ای گرم مثبت	*HB1*	–	کرم	+	+	–	–	–	–	–	+	–
	B1	+	زرد	+	+	–	–	–	+	–	–	–
کوکسی گرم مثبت	*MA1*	+	–	+	+	–	–	–	–	–	+	+
	NH1	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+

نتایج

در این پژوهش ٦۲ باکتری از کارخانه چرم‌سازی و ۱٦ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد. از بین سویه‌های جداسازی شده از کارخانه ٤۲ و از بین سویه‌های جداسازی شده از آب خلیج فارس ۹ سویه قادر به تحمل دامنه نسبتاً وسیعی از نمک بودند که برای بررسی حضور

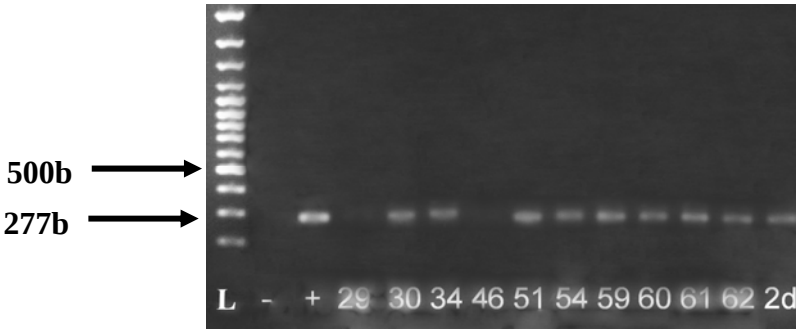
www.SID.ir

Archive of SID

برخی آنزیمها مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول۱)، شکل‌های (۱) و (۲). نتایج نشان داد دامنه تحمل نمک توسط باکتری از دامنه تحمل نمک توسط آنزیم تولید شده بوسیله‌ی همان باکتری بیشتر است.

مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی گسترده‌ای روی باکتریهای تولید کننده آنزیمهای تحمل کننده نمک انجام گشت و نتایج آن در جدول (۲) آمده است. باکتریهای میله‌ای گرم‌منفی علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتریهای متعلق به جنس هالوموناس (*Halomonas*) مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۳).

نتایج اثر غلظت نمک بر تولید آنزیمهای مورد مطالعه در جدول‌های (۳ و ٤) آمده است.

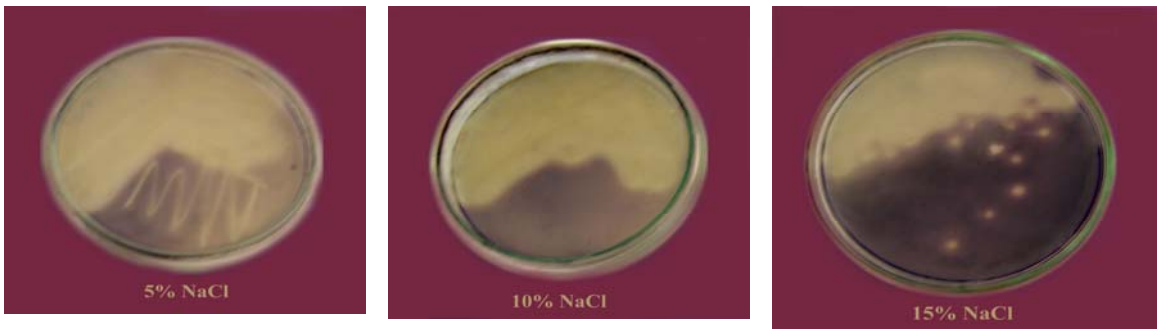


شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR از سویه‌های *H29, H30, H34, H46, H51, H54, H59, H60, H61, H62,* و *H2d* با پرایمرهای اکتوئین - توضیح علائم: L : Ladder، - : کنترل منفی (آب مقطر)، + : کنترل مثبت *Halomonas salina* ATCC 49509)

جدول ۳- تولید آنزیمهای نوکلئاز، α-آمیلاز، β-لاکتاماز، پروتئاز و لیپاز از باکتریهای جداسازی شده از کارخانه چرم‌سازی در غلظتهای مختلف نمک (NaCl)

نام باکتری های جداسازی شده	DNase	لیپاز	β-لاکتاماز	α- آمیلاز	تولید آنزیم در غلظتهای مختلف نمک (درصد)
H30	+	-	_	_	۵ - ۱۵
H34	+	-	-	_	۵- ۱۵
H51	+	-	+	_	۰ - ۱۵
H54	+	+	-	_	۰ - ۱۵
HB1	+	-	-	+	۵- ۱۵
NH1	+	-	-	_	۰- ۱۵

نتایج تغییر غلظت نمک سدیم کلراید در محیط کشت نشان داد افزایش غلظت نمک محیط کشت، بر تولید آنزیم و مدت زمان لازم برای آن اثر می‌گذارد به طوری که افزایش غلظت نمک سدیم کلراید در محیط کشت هیدرولیز توئین ۸۰ باعث کاهش قطر هاله‌ی رسوب شیری رنگ یا عدم تشکیل رسوب می‌شود. همچنین افزایش غلظت نمک NaCl محیط کشت DNase سبب تأخیر در تغییر رنگ محیط کشت یا عدم تغییر رنگ شد و با افزایش غلظت نمک مذکور، قطر هاله هیدرولیز نشاسته در محیط کشت نیز کاهش یافت (شکل ٤).



شکل ٤- کاهش وسعت ناحیه هیدرولیز نشاسته با افزایش غلظت نمک از۵ درصد به ۱۵ درصد در محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

اگر چه باکتریهای نمک‌دوست نسبی پتانسیل بالایی در بیوتکنولوژی دارند ولی مطالعات کمی روی تولید آنزیمهای خارج سلولی آنها انجام شده است. این آنزیمها در شرایط سخت نظیر دمای بالا و غلظت بالای نمک به دلیل محتوای بالای آمینواسیدهای اسیدی فعال باقی می مانند (۳، ۵، ۷، ۸). باکتریهای جداسازی شده در این تحقیق بیشتر میله‌ای گرم منفی و اکثر آنها متعلق به جنس هالوموناس بودند و تنها دو سویه میله‌ای گرم مثبت و چهار نمونه کوکسی گرم مثبت جداسازی شد ولی سویه‌های گرم مثبت پتانسیل بالاتری برای تولید آنزیم داشتند به طوری که از ٤٥ سویه گرم منفی، ۲۵ سویه (۵۵/۵ درصد) و از ٦ سویه گرم مثبت ۵ نمونه (۸۳ درصد) قادر به تولید آنزیم بودند. علی‌رغم تفاوتهای مشاهده شده ، بر اساس آزمون فیشر توزیع فراوانی آنزیمها در باکتریهای جداسازی شده بر حسب واکنش گرم اختلاف معنی‌داری ندارد ($p=0.38$).

همان‌گونه که در بخش نتایج ذکر شد دامنه تحمل نمک توسط باکتری از دامنه تحمل نمک توسط آنزیم تولید شده به وسیله همان باکتری بیشتر است و افزایش غلظت نمک محیط کشت، بر تولید آنزیم و مدت زمان لازم برای آن اثر می‌گذارد. طبق تحقیقات انجام شده توسط Zahran در سال ۱۹۹۷ باکتریهای موجود در محیطهای شور معمولاً قادر به تولید آنزیم در تراکم بالای نمک، (۱۰ درصد) هستند ولی دامنه تحمل و غلظت مطلوب نمک برای فعالیت آنزیم از دامنه تحمل و بهینه غلظت نمک برای رشد باکتری کمتر می‌باشد (۱۹) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. از سوی دیگر در پژوهش انجام شده توسط Deutch در سال ۲۰۰۲ α–آمیلاز تولیدی از*Bacillus dispsosauri* قادر به تحمل دامنه وسیعی از نمک بوده است ولی با افزایش غلظت نمک از قطر هاله هیدرولیز نشاسته کاسته شده است (٤).

از بین باکتریهای متعلق به جنس هالوموناس تنها دو مورد توانایی تولید α–آمیلاز داشت و با توجه به منابع دیگر نظیر کتاب مرجع برگی ۲۰۰۵ (از ۲۱ گونه‌ی شناسایی شده در جنس هالوموناس فقط ۲ گونه واجد α–**آمیلاز** هستند) این امر طبیعی است (۲).

جدول ٤– تولید آنزیمهای نوکلئاز، α–آمیلاز، β–لاکتاماز، پروتئاز و لیپاز از باکتریهای جداسازی شده از آب خلیج فارس در غلظتهای مختلف نمک(NaCl)

نام باکتریهای جداسازی شده	DNase	لیپاز	β–لاکتاماز	α– آمیلاز	تولید آنزیم در غلظتهای مختلف نمک (درصد)
H62	+	+	_	+	۰– ۱۵
H59	+	+	_	_	۰– ۱۵
H60	+	+	+	+	۰– ۱۵
H61	+	+	_	_	۰– ۱۵
H2d	+	–	_	_	۰– ۱۵
H63	+	–	_	_	۰– ۱۵
B1	+	–	+	_	۰– ۱۵
MA1	+	–	_	+	۰– ۱۵

نتایج به‌دست آمده در مورد آنزیمهای α–آمیلاز و نوکلئاز با نتایج به دست آمده توسط Sanchez-Porro و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تطابق دارد. در تحقیق انجام شده به وسیله‌ی Sanchez-Porro و همکارانش، از بین ۱۱٤ سویه نمک‌دوست نسبی، ۸۲ سویه گرم منفی و۳۲ سویه گرم مثبت بودند که از بین سویه‌های گرم منفی ۱۲ سویه DNase مثبت (۱٤/٦ درصد)، ۱۵ سویه α–آمیلاز مثبت (۱۸/۲ درصد)، ۱۵ سویه لیپاز مثبت (۱۸/۲ درصد) و از بین سویه‌های گرم مثبت ۸، ۷ و ۷ سویه به ترتیب DNase (۲۵ درصد)، α–آمیلاز (۲۱/۸ درصد) و لیپاز (۲۱/۸ درصد) مثبت بودند (۱۵). نتایج به دست آمده در این پژوهش در مورد آنزیم لیپاز از نظر فراوانی بین باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی با نتایج حاصل توسط Sanchez-Porro و همکارانش تشابه ندارد که احتمالاً به نوع سویه‌ها و شرایط محیطی محل جداسازی مربوط می‌شود. مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

عوامل ضدمیکروبی منجر به ظهور و انتشار ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌شود. انتقال افقی ژنهای کدکننده پلاسمیدی دلیل اصلی برای انتشار ژنهای مقاومت در محیط است. انتقال پلاسمید بین باکتریها در واریته‌ای از زیستگاههای طبیعی مثل پساب، فاضلاب، آب رودخانه و دریاچه، رسوبات و خاک و حتی بین ارگانیسم‌های مجزا از نظر تکاملی و اکولوژیک اتفاق می‌افتد. باکتریهای واجد ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای تجزیه آنتی‌بیوتیکهای موجود در پسابهای صنعتی و زباله‌های بیمارستانی نیز مفید می‌باشند (۱۵). روش تطابقی آنزیمهای نمک‌دوست/ تحمل‌کننده نمک برای تطابق با غلظت بالای نمک، محتوای بسیار بالای آمینواسیدهای اسیدی است که در سطح پروتئین قرار می‌گیرند و در باندشدن به ملکولهای آب و کاتیونها شرکت می‌کنند. طبیعت بسیار بالای اسیدی در پروتئینهای نمک‌دوست، حلالیت بالا بدون تجمع را ایجاد می‌کند و سبب رناچوره‌شدن (renaturation) کارآمد پس از تقلیب می‌شود (۷، ۱۰ و ۱۷). دامنه تحمل نمک آنزیمهای تولید شده با توجه به سویه باکتریهای جداسازی شده متفاوت و بین ۱۰ درصد–۰ ، ۱۵ درصد–۵ و یا ۱۵ درصد–۰/۵ بود. دامنه تحمل نمک آنزیمهای DNase، α–آمیلاز و β–لاکتاماز تولید شده به وسیله‌ی سویه‌های جداسازی شده در این تحقیق حداکثر به ترتیب **۱۵ درصد، ۱۵ درصد و ۱۰ درصد** می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده توسط Deutch در سال ۲۰۰۲ و Khire در سال ۱۹۹٤ مشابه می‌باشد (٤ و ١٤)، ولی دامنه تحمل نمک در آنها از نوعی پروتئاز تولید شده توسط *Bacillus subtilis 168* که تا ۱۸ درصد نمک سدیم کلراید را تحمل می‌کند، کمتر است (۹).از بین ٤٢ نمونه به‌کار رفته برای بررسی حضور آنزیمهای مختلف و جداسازی شده از کارخانه ۲۲ سویه (٥٢/٤ درصد) قادر به تولید آنزیمهای متفاوت بودندکه فقط ۱۳/٦ درصدآنها توانایی تولید دو آنزیم مختلف را داشتند ولی از ۹ سویه به‌کار رفته از آب دریای جنوب ۸ سویه(۸۸/۹ درصد) آنزیمهای مختلف تولید کردند که ۵۰ درصد آنها دارای دو آنزیم، ۱۲/۵ درصد واجد ۳ آنزیم، ۵ /۱۲ درصد دارای ٤آنزیم و فقط ۲۵ درصد تک آنزیمی بودند. نتایج نشان می‌دهد که باکتریهای جداسازی شده از آب خلیج فارس فعالیت وتنوع آنزیمی بیشتری را نسبت به سویه‌های جداسازی شده از کارخانه چرم سازی دارند. علی‌رغم تفاوت‌های مشاهده شده، بر اساس آزمون فیشر توزیع فراوانی آنزیمها در باکتریهای جداسازی شده بر حسب منبع جداسازی اختلاف معنی‌داری ندارد (p=0.06).

منابع

1. Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A., schuman, p. and sproer, C. 2003. *Halobacillus karajensis* sp. Nov. a novel moderate halophile. International Journal. System of Evolution Microbiology. 53: 1059-1063.

2. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sec edition. Vol 2. Part B. Springer.

3. Detkova, E. N. And Boltyanskaya, V. Yu. 2006. Relationships between the osmoadaptation strategy, amine acid composition of bulk protein, and properties of certain enzymes of haloalkaliphilic bacteria. Microbiology. 75: 259-265.

4. Deutch, C. E. 2002. characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *bacillus dispsosauri*. Letters Applied. Microbiology. 35: 78-84.

5.2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edn. Mosby, Inc. Missouri.

6. Kargi, F. 2002. Enhanced biological treatment of saline wastewater by using halophilic bacteria. Biotechnology letters. 24: 1569-1572.

7. Madern, D., Ebel, C. and zaccai, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extermophiles. 4: 91-98.

8 Margesin, R., and schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extermophiles. 5: 73-83.

9. Minami, H., Suzuki, H and Kumagai, H. 2003. Salt-tolerant γ-glutamyltranspeptidase from

www.SID.ir

Archive of SID

Bacillus subtilis 168 with glutaminase activity. Enzyme Microbial Technology. 32: 431-438.

10. Nichaus, B., C., Kahler, M. and Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 711-729.

11. Nieto, J. J., Fernandez-castille, R., Marquez, M. C., ventosa, A., Quesada, E., and Ruiz-Berraquero, F. 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied and Environmental Microbiology. 55: 2385-2390.

12 Pandey, A., Nigam, P., and Ventosa, A. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology Applied Biochemistery. 31: 135-152.

13. Payton, B. 2002. Biotransformation of toxic organic contaminations by halophilic bacteria from soap loke, WA. Research and extensiou regional water quality conference. Washington state university.

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

15. Tokunaga, H., Ishibushi, M., Arakawa, T., and Tokunaga, M. 2004. Highly efficient renaturation of β- lactamas isolated from moderately halophilic bacteria. FEBS. Letters. 558: 7-12.

16. Ventosa, A., Nieto, J. J., and ore, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbial and Molecular Biology. June. 504 -544.

17. Ventosa, A. and Nieto, J.J. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 85-94.

18. 1993. The biology of holophilic bacteria. Boca Raton, FL: CRC Press.

19. Zahran, H.H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biology of Fertility Soils. 25: 211-223.

20. Zanjirband, M., Golbang, N. and Kermanshahi, R. K. 2008. Detection of the ectC gene in *Halomonas* strains by polymerase chain reaction. Iranian Journal of Biotecnology. July. 6 (3) : 181-185.

Isolation of moderately halophilic indigenous bacterial strains producing salt-tolerant exteracellular hydrolytic enzymes; the effect of NaCl salt on enzyme production

Zanjirband M., Kasra Kermanshahi R., Golbang N.

Microbiology sec., Biology Dept., Science Faculty, Isfahan University, Isfahan, I.R. of IRAN

Abstract

The moderately halophilic bacteria tolerate extensive rang of sodium choloride salt. Intracellular concentration of salt is lower than medium, thus membrane bound proteins and extracellular proteins have halophilic/halotolerant qualities. To isolate the moderately halophilic bacteria, sampling was carried out from Persian Gulf water and different parts of tannery factory. Samples were enriched in selective media for halophils, and bacteria were cultured with streak plate method. In this investigation, 62 bacterial isolates from different parts of tannery factory and 15 strains from Persian Gulf were isolated. The ability of salt-tolerant bacterial isolates were examined for the production of different hydrolytic enzymes. From 42 bacterial strains, isolated from tannery factory, 22 isolates were able to produce some of hydrolytic enzymes. In the case of bacterial strains isolated from Persian Gulf, 8 of 9 total bacterial isolates had capability for producing of hydrolitic enzymes. Results indicated that halophilic bacteria have the high potential to produce different enzymes and their production districted in presence of various concentration of NaCl salt.

Keywords: enzymes, moderately holophilic bacteria, screening, salt

www.SID.ir