تعیین شرایط بهینه رشد هالوآرکولای جدا شده از دریاچه ارومیه (درجه حرارت، نوع محیط کشت، مقدار pH، درصد NaCl) با استفاده از روش تاگوچی

حمیرا امیرخانی[۱]، عزت عسگرانی[۱،*] و مهوش خدابنده[۲]

[۱] تهران، دانشگاه الزهرا- گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

چکیده

Haloarcula sp. IRU1 آرکی بسیار نمک دوست است که با فیلتراسیون آب دریاچه ارومیه جداسازی شده است. این آرکی مقاومت بالایی را به پرتوهای یون ساز، پرتوهای فرا بنفش و پراکسید هیدروژن نشان می دهد. در این پژوهش، با به کارگیری روش تاگوچی و بررسی عواملی مثل درجه حرارت، ترکیب محیط کشت، درصد کلرید سدیم و مقدار pH شرایط بهینه رشد این آرکی مشخص گردید. با توجه به جدول آرایه های متعامد تاگوچی در ۵ عامل و ۴ سطح، ۱۶ آزمایش طراحی شد. برای انجام هر آزمایش بلافاصله پس از تلقیح، روزی دو بار نمونه گیری انجام شد و میزان جذب در هر مرحله با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm خوانده شد و منحنی رشد باکتری در هر تکرار از هر آزمایش رسم گردید. میزان تلقیح در تمام آزمایشها ۵ درصد بود وهوادهی در ۲۲۰ rpm انجام گرفت. میزان رشد سلول بر اساس گرم وزن خشک سلول در هر لیتر در شرایط مذکور با یکدیگر مقایسه شده و با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 تجزیه وتحلیل شد. نتایج نشان داد که در بین عوامل، درجه حرارت بیشترین اثر را بر میزان رشد این آرکی دارد. بین دو عامل ترکیب محیط کشت و درجه حرارت ارتباط متقابل وجود ندارد. pH اولیه ۷، دمای ۴۷ درجه سانتی گراد، محیط کشت B، غلظت ۲۰ درصد NaCl به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. آزمایشی بر اساس شرایط بهینهٔ به دست آمده، انجام شد و سرعت رشد سلول بر اساس وزن خشک باکتری ۰/۰۲۳ گرم بر لیتر در ساعت به دست آمد.

واژه های کلیدی: هالوآرکولا، اکستریم هالوفیل، دریاچه شور ارومیه، سنجش رشد، روش تاگوچی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۲۱۸۸۰۴۴۰۵۱، پست الکترونیکی: asgarani@gmail.com

مقدمه

Haloarcula sp. IRU1 یک آرکی بسیار نمک دوست است که با فیلتراسیون آب دریاچهٔ ارومیه - یکی از محیطهای هایپر سالین جهان که متأسفانه در حال نابودی است - جداسازی شده و با توجه به نتایج بررسیهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی ژن 16S rRNA، نامگذاری شده است (۱).

آرکی های بسیار نمک دوست برای رشد به حداقل ۱/۵ مولار NaCl نیاز دارند. غلظت نمکی داخلی این میکروارگانیسم ها برای غلبه بر فشار اسمزی بالای محیط زندگی، در سطح بسیار بالایی نگهداشته می شود و بدین ترتیب در حالت تعادل اسمزی با محیط به سر می برند. بنابراین، بسیاری از آنزیمهای هالوآرکیایی در شرایط *in vitro* و *in vivo* در ۴ تا ۵ سدیم کلراید فعال هستند (۴، ۶، ۷ و ۱۲). آرکی های نمک دوست دارای ویژگیهای خاصی هستند که سبب کاربرد وسیع آنها در بیوتکنولوژی شده است. تولید باکتریورودوپسین- یک پمپ پروتونی که منبع

Archive of SID

www.SID.ir

انرژی آن نور است- تولید بیوپلیمرها، پیگمانهای کاروتنوئیدی و وزیکولهای گازی – به تازگی به عنوان حامل بالقوهٔ پپتیدهای پاتوژن شناسایی شده اند، تولید ترکیبات مختلفی که عطر و طعم خاصی به فرآورده های غذایی می بخشند، تنها بخشی از این پتانسیلهای جالب توجه است (۲، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱). علاوه بر این، تحمل غلظت بالای نمکی این آرکی ها، کشت آنها را در شرایط غیر استریل امکان پذیر ساخته و احتمال آلودگی کشت را بسیار پایین آورده است و بنابراین، هزینهٔ تولید محصولات صنعتی را کاهش می دهد (۱۱).

محدودیت عمده در تولید صنعتی آنزیمها و متابولیتهای آرکیایی، تولید کم فرآورده ها به علت کندی رشد و تولید اندک بیومس است. بنابراین، تعیین شرایط بهینهٔ رشد آرکی ها یکی از مهم ترین نیازها در بیوتکنولوژی به شمار می آید. اگر چه در اوایل دوران تحقیق بر روی آرکی های نمک دوست، موفقیتهایی در زمینهٔ تهیهٔ محیط کشت برای رشد بهینهٔ آنها حاصل شد (۵، ۹ و ۱۵) اما در سالهای اخیر پیشرفتهای کمی گزارش شده است (۸ و ۱۶).

روش تاگوچی، روشی سودمند برای غربال گری مواد غذایی و شرایطی است که بیشترین تأثیر را بر روی میزان رشد میکروارگانیسمها دارند و به شناخت روابط متقابل عوامل مورد بررسی در سطوح مختلف کمک می کند (۱۷). در مطالعهٔ حاضر، این روش برای بهینه سازی شرایط برای رسیدن به بیشترین دانسیتهٔ سلولی *Haloarcula* sp. IRU1 مورد استفاده قرار گرفت. برای رسیدن به این هدف درجه حرارت، ترکیب محیط کشت، در صد کلرید سدیم و pH به عنوان عوامل مؤثر در نظرگرفته شد. با توجه به جدول آرایه های متعامد تاگوچی در ۵ عامل و ۴ سطح، ۱۶ آزمایش طراحی گردید. میزان رشد که بر اساس وزن خشک سلول در لیتر در هر ساعت در آزمایشات مختلف اندازه گیری می شد، با یکدیگر مقایسه گردیده و با استفاده از برنامهٔ کامپیوتری Qualitek-4 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. علاوه بر این، در تحقیق حاضر با انجام آزمایشی تأثیر شرایط بهینه را که از این راه به دست آمده بر تولید بیومس هالوآرکولا بررسی گردید. میزان رشد به مقدار پیش بینی شده بسیار نزدیک بود. از این شرایط برای رسیدن به دانسیتهٔ سلولی بیشتر و در زمان کوتاه تر می توان استفاده کرد.

مواد و روشها

سویه باکتری: *Haloarcula* sp. IRU1 آرکی بسیار نمک دوست جدا شده از دریاچه ارومیه است که در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهرا(س) موجود است.

محیط کشت: ۴ نوع محیط کشت مختلف مورد استفاده قرار گرفت (۱۴ و ۱۵).

محیط A حاوی: ۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۹۲ گرم کلرید پتاسیم. ۲ مولکول آب، ۴۹/۴ گرم سولفات منیزیم. ۷ مولکول آب، ۳۴/۶ گرم کلرید منیزیوم. ۶ مولکول آب، ۰/۱۷گرم کربنات دی هیدروژن سدیم، ۰/۰۵۸ گرم برومید سدیم، ۰/۹۲ گرم کلرید کلسیم. ۲ مولکول آب و ۱۹۵ گرم کلرید سدیم در حجم کل یک لیتر می باشد.

محیط B حاوی: ۷/۵ گرم کازامینواسید ، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم تری سدیم سیترات، ۲ گرم کلرید پتاسیم، ۴۰ گرم سولفات منیزیم. ۷ مولکول آب، ۲۵۰ گرم کلرید سدیم، ۱۰میلی لیتر محلول تریس المانت در حجم کل ۱ لیتر می باشد. محلول تریس المانت محتوی ۰/۰۲۳ گرم کلرید آهن ۲. ۴ مولکول آب، ۰/۰۴۱ گرم کلرید کلسیم. ۲ مولکول آب، ۰/۰۰۳ گرم سولفات منگنز. ۱ مولکول آب، ۰/۰۰۴۴ گرم سولفات روی و ۰/۰۰۵ گرم سولفات مس. ۵ مولکول آب در حجم کل ۱ لیتر می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

محیط C حاوی: ۵ گرم عصاره مخمر، ۳۴/۶ گرم کلرید منیزیم. ۶ مولکول آب، ۴۹/۴ گرم سولفات منیزیم. ۷ مولکول آب، ۰/۹۲ گرم کلرید کلسیم. ۲ مولکول آب، ۰/۰۵۸ گرم برومید سدیم، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۱۷ گرم کربنات هیدروژن سدیم و ۱۹۵ گرم کلرید سدیم در حجم کل ۱ لیتر می باشد.

محیط D حاوی: ۱۰ گرم گلوکز، ۲۰ گرم سولفات منیزیم. ۷ مولکول آب، ۱۳ گرم کلرید منیزیم. ۶ مولکول آب، ۴۰ گرم کلرید پتاسیم، ۲ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۵۸ گرم برومید سدیم، ۰/۵ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۲ گرم کربنات هیدروژن سدیم، ۰/۰۰۴ گرم کلرید آهن. ۴ مولکول آب، ۱ گرم کلرید کلسیم. ۲ مولکول آب و ۱۵۰ گرم کلرید سدیم در حجم کل ۱ لیتر می باشد.

روش طراحی آزمایش: در این پژوهش برای تعیین شرایط بهینه رشد سویه مورد مطالعه، از روش تاگوچی استفاده شده است. اولین گام، تعیین عوامل مؤثر و سطوح آنها می باشد. در میان عوامل مؤثر در رشد این سویه، ۵ عامل مورد بررسی قرار گرفت. برای هر عامل نیز ۴ سطح در نظر گرفته شد. برای بررسی اثر متقابل بین دو عامل، این اثر متقابل به عنوان یک عامل در نظر گرفته شد. جدول ۱ عوامل و سطوح مورد بررسی در طراحی آزمایشات را نشان می دهد.

برای طراحی و اجرای آزمایشها جدول آرایه های متعامدی برای ۵ عامل در ۴ سطح تهیه شد. این جدول برای وضعیت های مختلف آزمایشی قابل استفاده است و شامل ۵ ستون و ۱۶ ردیف است. هر ستون به یک عامل و هر ردیف به یک آزمایش تعلق دارد. ترتیب انجام آزمایشها بر اساس اصول آماری باید تصادفی باشد. بنابراین الگوی انجام آزمایشها به ۵ عامل در ۴ سطح ثابت خواهد بود.

با توجه به جدول آرایه های متعامد در ۵ عامل و ۴ سطح و همچنین عوامل و سطوحی که در نظر گرفته شد، آزمایشها مطابق جدول ۲ انجام شد.

برای انجام هر آزمایش بلافاصله بعد از تلقیح، روزی دو بار (ساعت ۸ صبح و ۲ بعد از ظهر) نمونه گیری انجام گرفت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، میزان جذب در هر مرحله خوانده شد و میزان رشد باکتری در هر تکرار از هر آزمایش ثبت گردید. سپس برای تجزیه و تحلیل داده ها مورد استفاده قرار گرفت.

برای هر آزمایش ۲ تکرار در نظر گرفته شد و در تمام آزمایشها ارلنهای ۱ لیتری حاوی ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت، استفاده گردید و میزان تلقیح در مورد تمام آزمایشها ۵ درصد بود و در تمام موارد، هوادهی در شیکر با دور ۲۲۰rpm صورت گرفت. بعد از انجام هر آزمایش که دو بار تکرار می شد، بالاترین میزان OD و همچنین مدت زمان رسیدن به این OD ثبت گردید.

برای تحلیل داده ها، برای هر تکرار از هر آزمایش، بازده رشد بر حسب وزن خشک در حالت دانسیته ماکزیمم به گرم در لیتر ($g.L^{-1}$) و همچنین کارآیی هر آزمایش بر اساس وزن خشک در حالت دانسیته ماکزیمم به گرم / لیتر در ساعت ($g.L^{-1}.h^{-1}$) محاسبه گردید. داده ها با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

برای تعیین درستی نتایج نهایی، آزمایشی با توجه به شرایط اپتیم به دست آمده، انجام شد. از آزمایش شماره ۱۰ به عنوان کنترل استفاده شد و با نمونه گیری از محیط کشت باکتریایی، روزی ۲ بار (۸ صبح و ۲ بعد از ظهر)، منحنی رشد باکتری رسم گردید و پارامتر وزن خشک در حالت دانسیته ماکزیمم ($g.L^{-1}.h^{-1}$) که بیانگر کارآیی آزمایش است، تعیین و با مقدار پیش بینی شده مورد مقایسه قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین ارتباط وزن خشک سلول و مقدار جذب در۶۰۰ نانومتر: برای تعیین ارتباط بین OD سلولها در ۶۰۰ نانومتر و میزان وزن خشک سلول (g) ، ابتدا محلول پیش کشت تهیه شد. ۵ درصد آن به کشت ۱۰۰۰ میلی لیتری تلقیح شد. کشت آرکایی در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۲۰ rpm گرماگذاری شد. سپس روزی ۲ بار (۸ صبح و ۲ بعد از ظهر) OD آن در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و در هر مرحله دو نمونه ۵ میلی لیتری از آن گرفته و در ویالهایی با وزن مشخص در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه میکروفیوژ شد. برای حذف نمک از بیومس که تخمین وزن واقعی را مشکل می ساخت، بیومس ۳ بار با محلول ۱۰NaCl درصد شست و شو داده شد (در غلظتهای کمتر سلولها لیز می شوند) و در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. وزن خشک هر نمونه با یک OD_{600} معین، به دست آمد و یک منحنی که ارتباط میان میزان دانسیته سلولی بر حسب مقادیر OD_{600} و مقدار وزن خشک سلول بر حسب گرم را نشان می داد، ترسیم شد و مشخص گردید که یک واحد OD معادل چند گرم وزن خشک سلول است.

نتایج و بحث

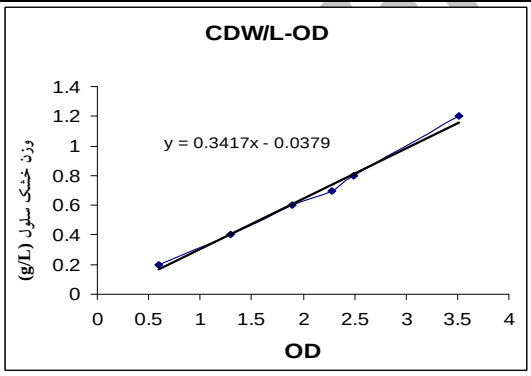
پس از انجام هر آزمایش، با توجه به شرایط مشخص شده در جدول ۱، منحنی رشد آرکی با اندازه گیری میزان دانسیته سلولی دوبار در روز بر حسب مقادیر OD_{600}، ترسیم شد (نتیجه نشان داده نشده است). از روی منحنی رشد، میزان ماکزیمم دانسیته سلولی و همچنین مدت زمان لازم برای به حداکثر رسیدن دانسیته سلولی، تعیین گردید.

در شکل ۱ رابطه میان میزان دانسیته سلولی بر حسب مقادیر OD_{600} و مقدار وزن خشک سلول بر حسب گرم در لیتر نشان داده شده است. یک واحد OD معادل ۰/۳۰۳۸ گرم وزن خشک سلول / لیتر می باشد.

سپس پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی بر حسب گرم / لیتر، تعیین شد و همچنین پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی به گرم / لیتر در ساعت (این پارامتر بیان کننده میزان رشد است) محاسبه گردید. نتایج تعیین این دو پارامتر در هر آزمایش مشخص شد و با برنامه کامپیوتری Qualitek-4 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اثرات اصلی مربوط به هر سطح از هر عامل محاسبه شد. نتایج حاصل از این تحلیل آماری در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- عوامل و سطوح مورد بررسی در طراحی آزمایشات

سطح / عامل	۱	۲	۳	۴
محیط کشت	A	B	C	D
غلظت کلریدسدیم(٪)	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
برهم کنش بین ۱ و۲	۱	۲	۳	۴
درجه حرارت (°C)	۳۷	۴۲	۴۷	۵۵
pH	۷	۷/۲	۷/۴	۷/۵

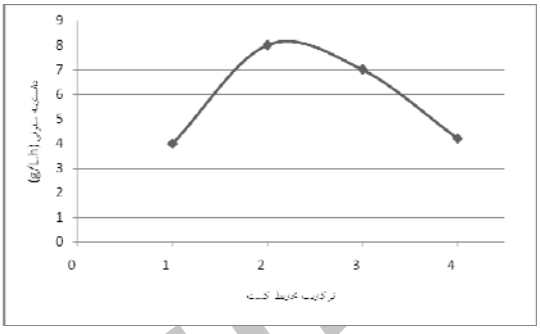


شکل ۱- رابطه میان میزان دانسیته سلولی بر حسب وزن خشک سلولی بر حسب گرم در لیتر و مقادیر OD_{600}

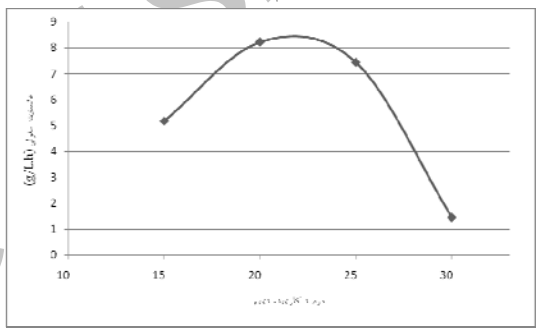
اثر ترکیب محیط کشت: اختلاف مشاهده شده بین سطح اول و دوم خیلی زیاد است، در صورتی که سطح دوم و سوم اختلاف زیادی ندارند. سطح چهارم نیز اختلاف زیادی با سطح دوم و سوم دارد (جدول ۳). این نتایج نشان

www.SID.ir

می دهد که محیط B و C اثر تقریباً مشابهی در میزان رشد میکروارگانیسم دارا می باشند (شکل ۲). این امر می تواند مربوط به تشابه بیشتر نوع و مقدار ترکیبات سازنده این دو محیط به یکدیگر باشد.



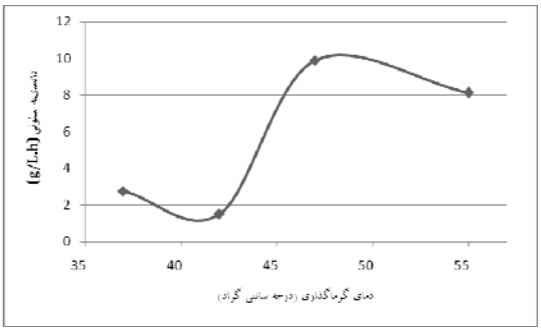
شکل ۲- اثر عامل ترکیب محیط کشت بر میزان پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی (g/L.h)



شکل ۳- اثر عامل غلظت کلرید سدیم محیط کشت بر میزان پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی (g/L.h)

جدول ۲- آزمایشات انجام شده مطابق با جدول آرایه های متعامد تاگوچی و عوامل و سطوح انتخابی

آزمایش	محیط کشت	غلظت کلرید سدیم (درصد)	برهم کنش بین ۱ و ۲	درجه حرارت (°C)	pH
۱	A	۱۵	۱	۳۷	۷
۲	A	۲۰	۲	۴۲	۷/۲
۳	A	۲۵	۳	۴۷	۷/۴
۴	A	۳۰	۴	۵۵	۷/۵
۵	B	۱۵	۲	۴۷	۷/۵
۶	B	۲۰	۱	۵۵	۷/۴
۷	B	۲۵	۴	۳۷	۷/۲
۸	B	۳۰	۳	۴۲	۷
۹	C	۱۵	۳	۵۵	۷/۲
۱۰	C	۲۰	۴	۴۷	۷
۱۱	C	۲۵	۱	۴۲	۷/۵
۱۲	C	۳۰	۲	۳۷	۷/۴
۱۳	D	۱۵	۴	۴۲	۷/۴
۱۴	D	۲۰	۳	۳۷	۷/۵
۱۵	D	۲۵	۲	۵۵	۷
۱۶	D	۳۰	۱	۴۷	۷/۲



شکل ۴- اثر عامل درجه حرارت گرماگذاری بر میزان پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی (g/L.h)

در این مطالعه مقدار بیومس در محیط کشت حاوی عصاره مخمر به بالاترین اندازه می رسد و این موافق نتایج مطالعات قبلی است که عصاره مخمر را ترکیبی مناسب برای رشد هالو آرکی ها معرفی کرده اند (۱، ۳ و ۸). اما در تحقیق دیگری نوترینت آگار حاوی پپتون جایگزین محیط کشت محتوی عصاره مخمر گردیده است (۱۰). از آنجایی که پپتون که غالباً دچار آلودگی با نمکهای ناچیز است به عنوان بازدارندهٔ رشد هالو آرکی ها شناخته می شود ، احتمالاً آثار آلودگی نمکی پپتون با نشاستهٔ به کار رفته در آن محیط کشت خنثی گردیده است (۱۳).

غلظت نمکهای مختلف در محیط کشت بر روی زمان رسیدن به فاز سکون و مشاهده بیشترین دانسیتهٔ سلولی تأثیرگذار است. معمولاً غلظتهای بالای یون پتاسیم برای پایداری بخشیدن به پروتئینها و فعالیت برخی از آنزیمهای هالوفیلیک مورد نیاز است (۶). غلظت کلرید پتاسیم در مطالعهٔ حاضر $g.L^{-1}$ ۲ بوده است که از غلظت مورد استفادهٔ شیرزاد بیشتر و از مقدار به کار رفته در مطالعهٔ گروه مانیکاندان کمتر است (۱و۱۰).

Archive of SID
www.SID.ir

منیزیم به فرم سولفات از تولید دانسیته سلولی در بالاترین میزان حمایت می کند. این امر می تواند با طبیعت زیستگاه هالوفیلها ارتباط داشته باشد، زیرا در چنین محیطهایی غلظت سولفات منیزیم بسیار بالاست، برای مثال در حوضچه تبخیری Kelambakkam واقع در هند غلظت سولفات منیزیم $g.L^{-1}$ ۲۲/۲ اندازه گیری شده است. غلظت سولفات منیزیوم در این مطالعه $g.L^{-1}$ ۴۰ است که بسیار مشابه میزان به کار رفته در بررسی قبلی است (۱)، ولی تقریباً چهار برابر غلظت مورد استفاده در تحقیق گروه مانیکاندان است (۱۰).

جدول ۳- اثرات اصلی عوامل بر میزان پارامتر میزان رشد (وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی به گرم / لیتر . ساعت)

	عوامل	سطح۱	سطح۲	سطح۳	سطح۴
۱	محیط کشت	۳/۹۳۷	۷/۷۷۹	۶/۷۱۲	۳/۸۵
۲	غلظت کلرید سدیم (درصد)	۵/۱۷۵	۸/۲۲۴	۷/۴۳۷	۱/۴۴۲
۳	بر هم کنش بین ۱ و ۲	۵/۸۷۵	۶/۳۶۲	۴/۴۹۲	۵/۵۴۹
۴	درجه حرارت	۲/۷۵	۱/۴۹۲	۹/۹	۸/۱۳۷
۵	pH	۷/۵۴۲	۲/۹۱۲	۷/۳۱۲	۴/۵۱۲

جدول ۴- نتیجه آنالیز واریانس و تحلیل نتایج برای بهینه کردن شرایط رشد میکروارگانیسم برای به حداکثر رساندن میزان پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی به گرم / لیتر . ساعت

	عوامل	درجه آزادی	درصد تاثیر هر عامل
۱	محیط کشت	۳	۱۱/۰۹۶
۲	غلظت کلرید سدیم	۳	۲۶/۰۴۸
۳	برهم کنش بین۱و۲	۳	۱/۷۶۸
۴	درجه حرارت	۳	۴۶/۸۹۴
۵	pH	۳	۱۴/۱۹۲
	سایر عوامل	۱۶	۰/۰۰۲

جدول ۵- شرایط بهینه برای رشد میکروارگانیسم

	عوامل	سطح بهینه	مشخصه سطح بهینه
۱	محیط کشت	۲	B
۲	غلظت کلرید سدیم (٪)	۲	۲۰
۳	بر هم کنش بین ۱ و۲	۲	۲
۴	درجه حرارت	۳	۴۷
۵	pH	۱	۷

(مقدار تئوری پارامتر وزن خشک سلول در حالت دانسیته سلولی ماکزیمم به گرم / لیتر . ساعت در شرایط مذکور، ۰/۰۱۷۵ می باشد)

اثر غلظت کلرید سدیم محیط کشت: اختلاف مشاهده شده بین سطح اول و دوم زیاد است، در صورتی که سطح دوم و سوم اختلاف چندانی ندارد. سطح چهارم نیز اختلاف بسیار زیادی با سطح دوم و سوم دارد (جدول ۳). بنابراین، وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیته سلولی ($g.L^{-1}.h^{-1}$) با افزایش غلظت کلرید سدیم محیط کشت، از غلظت ۱۵ تا غلظت ۲۰ درصد افزایش می یابد، ولی در غلظتهای بالاتر کاهش پیدا می کند (شکل ۳).

در بررسی حاضرغلظت کلرید سدیم ۲۰ درصد منجر به رشد بهینه این آرکی می گردد که مشابه نتایجی است که به

Archive of SID
www.SID.ir

تازگی با روش آماری سطح پاسخگویی به دست آمده و نتایج مطالعهٔ قبلی که از روش تک عاملی برای رشد بهینه این آرکی استفاده شده است (۱و۱۰) .

اثر درجه حرارت: اختلاف مشاهده شده بین سطح سوم و چهارم از سطح اول و دوم زیاد است. با توجه به (جدول ۳) و شکل ۴ می توان نتیجه گرفت که پارامتر وزن خشک سلول در حالت دانسیته سلولی ماکزیمم ($g.L^{-1}.h^{-1}$) با افزایش دما افزایش می یابد، ولی در دمای بالاتر از ۴۷ درجه سانتی گراد به تدریج کاهش می یابد. این نتایج ماهیت نسبتاً گرمادوست این آرکی هالوفیل را نشان می دهد و با دمای رشد بهینه ۲±۵۰ درجه سانتی گراد که در مطالعات دیگر برای هالوآرکی ها مطابقت دارد (۱۴).

اثر pH: اختلاف مشاهده شده بین سطوح از نظم خاصی تبعیت نمی کند (جدول ۳).

با تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از روش تاگوچی، درصد تأثیر هر عامل بر میزان بهینه رشد تعیین شد. جدول ۴ این نتایج را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود در صد تأثیر دما از سایر عوامل بیشتر است و به ترتیب غلظت کلرید سدیم، pH، ترکیب محیط کشت در درجات بعدی اهمیت هستند. از طرفی مشاهده می شود که درصد تأثیر ارتباط متقابل میان دو عامل ترکیب محیط کشت و غلظت کلرید سدیم در رشد بهینه بسیار پایین است و این نشان می دهد این دو عامل مستقل از یکدیگر هستند و اثر متقابلی بر هم ندارند.

در جدول ۵ سطوح بهینه برای به حداکثر رساندن پارامتر وزن خشک سلول در حالت دانسیته سلولی ماکزیمم به گرم / لیتر در ساعت مشخص شده است. مقدار نظری این پارامتر در این شرایط ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ۰/۰۱۷۵ برآورد شده است.

نتیجه نهایی که بر اساس انجام آزمایشی مطابق سطوح بهینه پیش بینی شده توسط روش تاگوچی به دست آمد،

نشان می دهد که در صورت استفاده از شرایط بهینه تعیین شده، مقدار تجربی این پارامتر، ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ۰/۰۲۳ و حتی کمی بیشتر از مقدار پیش بینی شده ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ۰/ ۰۱۷۵ به دست می آید. در مورد آزمایش شماره ۱۰ که به عنوان کنترل استفاده شد (زیرا در میان آزمایشات بیشترین مقدار پارامتر وزن خشک سلول در حالت ماکزیمم دانسیتهٔ سلولی به گرم/لیتر در ساعت را نشان داده است)، مقدار این پارامتر ($g.L^{-1}.h^{-1}$) ۰/۰۱۷۲ به دست آمد که به طور تقریبی نزدیک به مقدار پیش بینی شده است.

در این مطالعه با استفاده از روش تاگوچی برای طراحی آزمایش و تعیین شرایط بهینه رشد، بیشترین دانسیتهٔ سلولی $g.L^{-1}$ ۱/۱۵ به دست آمد که در مقایسه با نتایج مطالعات دیگر، $g.L^{-1}$ ۰/۶۰۵ و $g.L^{-1}$ ۰/۷۴۶ تفاوت قابل توجهی دارد (۱و۱۰). امید می رود پس از به کار گیری شرایط بهینهٔ به دست آمده از این مطالعه برای رشد آرکی های نمک دوست دیگر و رسیدن به نتیجهٔ مطلوب، بتوان این نتایج را در مقیاسهای آزمایشگاهی وصنعتی جهت تولید آنزیم ها و متابولیتهای هالوآرکیایی مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی: این تحقیق با حمایت دانشگاه الزهرا(س) و در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گردیده است.

منابع

۱- شیرزاد، مهدیه، (۱۳۸۴)، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه الزهرا، بررسی مقاومت آرکی اکستریم هالوفیل ایرانی در برابر عوامل آسیب رسان به DNA

2- Asker, D., Awad T., and Ohta Y. (2002). Lipids of *Haloferax alexandrines* strain TMT: an extremely halophilic cantaxantin producing archaeon. J. Biosci. Bioengin. 93: 37-43.

Archive of SID
www.SID.ir

3- Charlebois, R. L., Lam, W. L., Cline, S. W. and Doolittle, W. F. (1987). Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaebacterium. Proc. Natl. Acad. Sci.84: 8530-8534.

4- Gomes, J. and stainer, W. (2004). The biocatalytic of extremophiles and extremozymes. Food Technology Biotechnology 42: 223-235

5- Gouchnour, M.B. and Kushner, D.J. (1969). Growth and nutrition of halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 15: 1157-1165.

6- Hough, D., Danson, M. j. (1999). Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology 3: 39-46.

7- Imhoff, J. J. (1993). Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms. In: The Biology of Halophilic Bacteria.CRC Press Boca Raton. 211-253.

8- Kamekura, M., and Kates, M. (1988). In: Halophilic Bacteria. Vol. 2 CRC Press Boca Raton.

9- Kauri, M.R., Wallace, M.R. and Kushner, D.J. (1990). Nutrition of halophilic archaebacterium, *Haloferax volcanii*. Syst. Appl. Microbiol. 13: 4-18

10- Manikandan, M., Pasic, L. and Kannan V. (2009). Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family Halobacteriaceae) by response surface methodology. Biosource technology. 100: 3107-3112.

11- Margesin, R. and Schinner, F. (2000). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology.

12- Martin D. et al. (1999). Osmoadaptation in Archaea. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1825-1835.

13- Oren, A. (1990). Starch contacts the inhibitory action of bacto peptone and bile salts in media for the growth of halobacteria, Can. J. Microbiol. 36: 299-301.

14- Robinson, J. L. *et al*. (2005). Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius plots. J. Bacteriol. 923-929.

15- Rodrigues-Valera, F. *et. al*. 1988. Halophilic Bacteria Vol.2, Pub. CRC press.

16- Rodrigues-Valera, F. (1995). Cultivation of halophilic archaea, In: Archaea, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 13-16.

17- Roy, P. K. (2001). Design of experimental using the Taguchi approach ۹, A willy interscience publication. 14: 447-468.

18- Schiraidi, C. *et. al*. (2002). Perspective on biotechnological application of archaea. Archaea. 1: 75 – 86.

19- Sremac, M., Stuart, E. S. (2008). Recombinant gas vesicles from Halobacterium sp. Displaying SIV peptides demonstrate biotechnology potentials a pathogen peptide delivery vehicle. BMC Biotechnol. 8: 9.

20- Stoeckenius, W. and Bogomolni, R. A. (1982). Bacteriorodopsin and related pigments of halobacteria, Ann. Rev. Biochem. 52: 587-616.

21- Stuart, E. S., Morshed, F., Sremac, M. and DasSarma, S. (2004) Cassette-based presentation of SIV epitopes with recombinant gas vesicles from halophilic archaea, J. Biotechnol. 114: 225-237.

22- Thongtai, C. and Sutinalert, p. (1991). Halophiles in Thai fish sauce (nam pla). In: general and applied aspects of halophilic microorganisms. Plenum Press. 381-388.

Archive of SID

www.SID.ir

Determination of optimum growth conditions for *Haloarcula* IRU1 isolated from Uromia Lake by Taguchi method

Amirkhani H[1]., Asgarani E[1]. and Khodabandeh M.[2]

Biology Dept., Alzahra univ., Tehran, I.R. of Iran

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Haloarcula sp. IRU1 is an extremely halophilic archaeon which isolated from Uromia salt lake water. It exhibits high resistance to ionizing and ultra violet radiation and hydrogen peroxide. In this study, optimization of media components, pH, temperature and sodium chloride concentration for the growth and biomass production of *Haloarcula* sp. IRU1 was carried out using Taguchi method. By considering the Taguchi orthogonal array tables at 5 factors and 4 levels, 16 trials were designed. For each trial, sampling was performed twice immediately after inoculation and optical density (OD) was measured by the spectrophotometer at 600 nm. In the way, bacterial growth curve for each repeat of every trial was designed. In all of the trials, the concentration of inoculum was 5% and aeration was carried out at 220 rpm. Cell dry weights (grams per litre) of the above mentioned conditions were compared together by the Qualitek-4 program. The results showed that temperature had the most effect on the growth among several factors and there was no direct relation between sodium chloride concentration and culture medium composition. The optimum conditions obtained were pH 7; temperature 47 ˚C; culture medium B; NaCl 20% (w/v). In these optimal conditions, the obtained cell concentration of 0.023 $g.L^{-1}$ dry $weight.h^{-1}$ was in agreement with predicted cell concentration.

Keywords: *Haloarcula,* extreme halophile, Uromia salt lake- growth assessment, Taguchi method

Archive of SID

www.SID.ir