Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(4):197-202

Isolation and Identification of Halophilic Bacteria Producing Asparaginase Enzyme from Urmia Lake

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Moghadam P.[1] *MSc,*
Khadivi Derakhshan F.*[2] *PhD*

How to cite this article
Moghadam P, Khadivi Derakhshan F. Isolation and Identification of Halophilic Bacteria Producing Asparaginase Enzyme from Urmia Lake. Pathobiology Research. 2019;22(4):197-202.

[1]Department of Microbiology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2]Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

Correspondence
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Shahid Beheshti Street, Urmia, Iran. Posal Code: 5716963896.
Phone: -
Fax: +98 (44) 32722738
khadivi.d.f@gmail.com

Article History
Received: November 06, 2019
Accepted: May 09, 2020
ePublished: June 03, 2020

ABSTRACT

Aims The present study was aimed to investigate isolation and identification of halophil bacteria producing asparaginase from Urmia Lake and the effect of different salt concentrations and temperature on asparaginase production.

Materials & Methods The water and mud samples from Urmia Lake were cultivated in MH and SWN media for isolation of halotolerant bacteria. Then, the asparaginase production rate was investigated in saline M9. The asparaginase production rate by isolates was investigated in different salt concentrations (10, 20, 30, and 40%) and temperatures (30, 35, 37, 45, and 50°C). Two isolates with a high production rate of asparaginase were stained by gram stain method and were identified by 16S *rRNA* sequencing.

Findings In the present study, 57 isolates were obtained which 10 isolates showed asparaginase production. Among these, 2 isolates (A_2 and A_3) were selected as superior isolates. The isolate A_3 has shown the largest halo (54mm) at 35°C and 10% salt concentration. Moreover, the isolate A_2 has shown the largest halo (56mm) at 35°C and 40% salt concentration. The *16SrRNA* sequencing showed that the A2 isolate was similar 98.9% to the *Halomonas elongata* strain, and the A_3 isolate was similar 100% to the *Bacillus aryabhattai* strain.

Conclusion The bacteria isolated from Urmia Lake are potential source of asparaginase enzyme. *H. elongate* and *B. aryabhattai* strains isolated from Urmia Lake can be used to production of asparaginase without side effects for cancer patients.

Keywords Asparaginase; Halophile; Therapeutic Uses; Urmia Lake

CITATION LINKS

[1] Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products [2] creening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production [3] Extracellular production and characterization of two Streptomyces L-asparaginases [4] Extracellular production and characterization of two Streptomyces L-asparaginases [5] Marine microbial enzymes [6] Application of evolutionary optimization technique in maximizing the recovery of L-asparaginase from E [7] Persian gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating [8] Isolation and purification of high efficiency L-asparaginase by quantitative preparative continuous-elution SDS PAGE electrophoresis [9] Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake [10] Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake [11] Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives [12] Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes [13] A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms [14] The comparison of bovine fecal and buffy coat samples for diagnosis of Johne's Disease based on PCR [15] Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium Halomonas elongata [16] Lactobacillus casei suppresses hfq gene expression in Escherichia coli O157: H7 [17] l-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake [18] Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria [19] Production of extracellular L-asparaginase by halophilic bacterium vibrio sp [20] Production of anti-leukemia L-Asparaginase by a strain of Staphylococcus Isolated from Agricultural Soil

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز از دریاچه ارومیه

پریسا مقدم MSc
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
فاطمه خدیوی درخشان* PhD
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

چکیده
اهداف: مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز از دریاچه ارومیه و تاثیر غلظت‌های مختلف نمک و دما بر میزان آسپاراژیناز ترشحی انجام شد.
مواد و روش‌ها: برای جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک و نمک‌دوست، نمونه‌های آب و لجن دریاچه ارومیه در محیط‌های MH و SWN کشت داده شدند. سپس قدرت ترشح آسپاراژیناز جدایه‌ها در محیط M9 نمکی بررسی شد. میزان ترشح جدایه‌ها در غلظت‌های نمکی ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰% و دماهای ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۵ و ۵۰°C بررسی شد. دو جدایه با توان ترشح آسپاراژیناز بالا پس از رنگ‌آمیزی گرم، از طریق توالی‌یابی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند.
یافته‌ها: در مطالعه حاضر، از ۵۷ جدایه به‌دست‌آمده، ۱۰ جدایه دارای توان ترشح آسپاراژیناز بودند و ۲ جدایه A_2 و A_3 به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند. جدایه A_3 در دمای ۳۵°C و غلظت ۱۰% نمک بزرگترین هاله (۵۴میلی‌متر) و جدایه A_2 در همین دمای ۳۵ و غلظت ۴۰% نمک بزرگترین هاله (۵۲میلی‌متر) را ایجاد کرده‌اند. براساس نتایج بررسی مولکولی ژن *16S rRNA*، جدایه A_2 شباهت ۹۸/۹درصدی به سویه *هالوموناس الونگاتا* و جدایه A_3 شباهت ۱۰۰درصدی به *باسیلوس آریابهاتای* داشتند.
نتیجه‌گیری: باکتری‌های جداشده از دریاچه ارومیه منبع بالقوه‌ای از آنزیم آسپاراژیناز هستند. *هالوموناس الونگاتا* و *باسیلوس آریابهاتای* جداشده از دریاچه ارومیه می‌توانند برای تولید آسپاراژیناز با عوارض جانبی کمتر برای درمان بیمارن مبتلا به سرطان استفاده شوند.
کلیدواژه‌ها: آسپاراژیناز، کاربردهای درمانی، نمک‌دوست، دریاچه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۰
*نویسنده مسئول: khadivi.d.f@gmail.com

مقدمه
آنزیم L- آسپاراژیناز (L- آسپاراژین‌آمینوهیدرولاز E.C.3.5.L.L) با واکنش آبکافت، پیوند آمیدی را در L- آسپاراژین می‌شکند و آن را به L- آسپارتات و آمونیاک تبدیل می‌کند[1]. این آنزیم از مهم‌ترین آنزیم‌های درمانی از نظر بیوتکنولوژی و زیست‌پزشکی محسوب می‌شود. سازمان غذا و دارو (FDA) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) استفاده از L- آسپاراژیناز را برای درمان موثر لوسمی لنفوبلاستیک حاد و لنفوسارکوما که از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در کودکان و نوجوانان است، تصویب کرده‌اند[2]. آنزیم L- آسپاراژیناز در صنایع غذایی گیاهی به‌منظور جلوگیری از تشکیل ماده‌ای سرطان‌زا به نام آکریل‌آمید نیز کاربرد دارد[3]. این آنزیم در بسیاری از بافت‌های جانوران، باکتری‌ها، گیاهان و در سرم بعضی از جونده‌ها وجود دارد، ولی با این وجود در انسان یافت نمی‌شود[4].
آنزیم‌های میکروبی با فعالیت L- آسپاراژیناز نسبت به آنزیم‌های مشتق‌شده از منابع گیاهی و جانوری مزیت‌هایی دارند که از آن جمله می‌توان به تنوع فعالیت‌های کاتابولیکی، هزینه ارزان‌تر، منابع فراوان، مستمر و حتی کمیت و پایداری نسبتاً بیشتر آنها اشاره کرد[5]. آنزیم آسپاراژیناز جداسازی‌شده از *اروینیا کاروتوورا* و *اشریشیا کلی* تولید تجاری دارند[6]. نتایج بالینی نشان می‌دهد که آنزیم خالص‌سازی‌شده از این باکتری‌های تجاری موجب بروز سمیت، سرکوب ایمنی و ایجاد مقاومت می‌شود. همچنین پاسخ درمانی بیماران به‌ندرت بدون اثرات سمی اتفاق می‌افتد و اکثر بیماران دچار عوارض جانبی ناخواسته می‌شوند[7]. گزارش‌های منتشرشده حاکی از این است که ویژگی‌های کنیتیکی و بیوشیمیایی آنزیم‌ها به ماهیت ژنتیکی سویه میکروبی مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین نیاز به شناسایی منابع جدید آنزیم L- آسپاراژیناز با تاثیرات درمانی مشابه و ویژگی‌های سرولوژیک مطلوب‌تر وجود دارد[8].
دریاچه ارومیه بزرگترین و شورترین دریاچه دایمی ایران و یکی از دریاچه‌های فوق اشباع از نمک دنیا است که از این نظر به دریاچه نمک بزرگ ایالات متحده شباهت دارد[9]. توانمندی‌های زیست‌فناوری میکروارگانیزم‌های محیط‌های پرشور باعث اهمیت بررسی آنها شده است[10]. از آنجایی که آب دریاچه ارومیه به‌طور طبیعی شور است، بنابراین محصولات میکروب‌های دریایی به‌ویژه آنزیم‌ها، ایمنی بیشتر و سمیت‌زدایی سلولی کمتری دارند و در مجموع برای کارهای درمانی در انسان مناسب‌تر هستند[11].
با توجه به اهمیت و کاربرد روزافزون آنزیم L- آسپاراژیناز، اولین گام برای بومی‌سازی و تولید انبوه آنزیم یعنی یافتن میکروارگانیزم مناسب یا جدید با توان ترشح بالا و اثرات سیتوتوکسیتی کمتر ضرورت دارد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز، به‌عنوان یک داروی ضدسرطان، از دریاچه ارومیه است.

مواد و روش‌ها
جمع‌آوری نمونه‌های آب و لجن
با توجه به وسعت دریاچه ارومیه و شرایط بوم‌شناختی متنوع آن برای تمرکز بر روی تنوع زیستی دریاچه، نوار ساحلی غربی آن به‌عنوان محل نمونه‌برداری انتخاب شد. برای نمونه‌گیری، نوار ساحلی غربی دریاچه از نظر دسترسی به چهار ناحیه مختلف تقسیم و در هر کدام از این نواحی حداقل از پنج منطقه نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری از نقاط مختلف دریاچه ارومیه واقع در آذربایجان غربی در فروردین‌ماه سال ۱۳۹۷ انجام شد. تعداد ۶ نمونه آب دریاچه و ۴ نمونه لجن از قسمت ساحلی و نواحی نزدیک ساحل دریاچه، در بطری‌های استریل جمع‌آوری شدند. نمونه‌های تهیه‌شده بلافاصله در مجاورت یخ در دمای ۴°C به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد، واحد ارومیه، منتقل شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

کشت و جداسازی سویه‌های باکتریایی

شرایط محیط کشت‌های مورد استفاده براساس شرایط اقلیمی دریاچه و همچنین نیازمندی‌های انواع مختلف این باکتری‌ها انتخاب شد. محیط‌های کشت Moderate Halophilic Medium (MH؛ یک‌لیتر محیط کشت MH شامل گلوکز ۱گرم، عصاره مخمر ۱۰گرم، نمک ۱۰۱گرم، سدیم‌بی‌کربنات ۰/۰۶گرم، پپتون ۵گرم، کلریدکلسیم ۰/۳گرم، منیزیم‌سولفات ۹/۶گرم، کلریدمنیزیم ۷گرم، سدیم‌بروماید ۰/۰۲۶گرم، کلریدپتاسیم ۲گرم، آگار ۱۵گرم و آب مقطر ۱لیتر) و Sea water Nutrient Agar (SWN؛ یک‌لیتر محیط کشت SWN شامل نمک ۲۰گرم، کلریدکلسیم ۰/۰۵گرم، سولفات‌منیزیم ۵گرم، کلریدمنیزیم ۳گرم، عصاره گوشت ۲گرم، عصاره مخمر ۱گرم، پپتون ۵گرم، کلریدپتاسیم ۰/۵گرم، آگار ۱۵گرم و آب مقطر ۱لیتر) به‌منظور جداسازی بیشترین جدایه‌های ممکن استفاده شد. برای تلقیح نمونه‌های آب، از رسوب حاصل از سانتریفیوژ آب برای تلقیح مستقیم به محیط کشت استفاده شد. محیط‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۴°C گرماگذاری شدند. کلونی‌های رشدکرده روی محیط‌های جامد در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جداسازی و خالص‌سازی شدند. به‌منظور دسترسی به بیشترین میزان تنوع و جداسازی انواع کندرشد، پلیت‌ها با استفاده از تامین رطوبت در محیط نگهداری و با استفاده از پارافیلم دور پلیت‌ها به مدت ۶ ماه نگهداری و در بازه‌های زمانی دو هفته‌ای بررسی و کلونی‌های جدید جداسازی شدند. در هر مرحله کلونی‌های دارای مشخصات ریخت‌شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) متفاوت جداسازی شدند. این کلونی‌ها در شرایط مشابه محیط جداسازی نگهداری شدند. همچنین تلقیح نمونه‌های لجن با استفاده از روش رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-5} بر روی محیط‌های مورد استفاده برای جداسازی انجام شد[12].

غربالگری باکتری‌های ترشح‌کننده آنزیم L- آسپاراژیناز

فعالیت L- آسپاراژینازی کلنی‌های جداسازی‌شده با استفاده از روش پلیت بر روی محیط کشت جامد اختصاصی M9 نمکی با ۰/۵گرم نمک (یک‌لیتر محیط کشت M9 شامل ۱۰گرم آسپاراژین، ٦گرم $Na_2HPO_4.2H_2O$، ۲میلی‌لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱۲گرم فنل‌رد، ۱۰میلی‌لیتر مالتوز ۲۰%، ۰/۵گرم سدیم‌کلرید، ۰/۷۵گرم KH_2PO_4، ۱میلی‌لیتر $CaCl_2.H_2O$، ۲۰گرم آگار و ۱لیتر آب مقطر) مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب، جدایه‌ها روی محیط M9 کشت و به مدت ۳-۲ روز در دمای ۳۵°C قرار داده شدند. فعالیت L- آسپاراژینازی به وسیله ناحیه صورتی اطراف کلنی‌ها مشخص شد. از یک پلیت فاقد شناساگر (فنل‌رد) و یک پلیت فاقد آسپاراژین و حاوی $NaNO_3$ (به‌عنوان منبع نیتروژن) به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد[13].

بررسی تاثیر درصدهای مختلف نمک بر آسپاراژیناز ترشحی

برای بررسی تاثیر درصدهای مختلف نمک بر آسپاراژیناز ترشحی توسط جدایه‌های به‌دست‌آمده، محیط M9 با درصدهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، و ۵۰% نمک تهیه شد. قابل ذکر است که محیط M9 در غلظت ۵۰% نمک استحکام کافی نداشت. جدایه‌های ترشح‌کننده آسپاراژیناز در درصدهای مختلف نمک M9 کشت داده شدند و پس از ۳-۲ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C، مورد بررسی قرار گرفتند[13].

بررسی تاثیر دما بر میزان آسپاراژیناز ترشحی

به‌منظور بررسی تاثیر دما بر آسپاراژیناز ترشحی، جدایه‌های به‌دست‌آمده در درصدهای مختلف نمکی، در دماهای ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۵، و ۵۰°C به مدت ۳-۲ روز گرمخانه‌گذاری شدند و مورد بررسی قرار گرفتند[13].

بررسی و شناسایی باکتری‌های برتر تولیدکننده آسپاراژیناز

جدایه‌های برتر تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز از طریق رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی، مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی مولکولی جنس و گونه این جدایه‌ها از طریق ژن *16S* انجام شد. برای این منظور، DNA ژنومی با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد و کمیت و کیفیت آن به ترتیب با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱% مورد بررسی قرار گرفت و ژن *16S* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای عمومی F27: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و R1492: 5'-GGTTTCCTTGTTACGACAT-3' تکثیر و محصول به‌دست‌آمده با اندازه ۱۵۰۰جفت باز برای تعیین توالی ارسال شد. واکنش PCR در حجم کل ۲۵میکرولیتر شامل پرایمر رفت ۱میکرولیتر، پرایمر برگشت ۱میکرولیتر، DNA الگو ۲میکرولیتر، آب مقطر ۸/۵میکرولیتر و مسترمیکس ۱۲/۵میکرولیتر انجام شد. همچنین برنامه دمایی استفاده‌شده شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۰ چرخه اتصال در دمای ۵۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۳۰ چرخه سنتز در دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه سنتز نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. اندازه قطعه تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲% مورد بررسی قرار گرفت و برای توالی‌یابی به شرکت توپاژن ارسال شد. توالی قطعه تکثیر شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی EZBiocloud مورد بررسی قرار گرفت و جنس و گونه ایزوله‌های مربوطه شناسایی شد[14].

یافته‌ها

ایزوله‌های به‌دست‌آمده

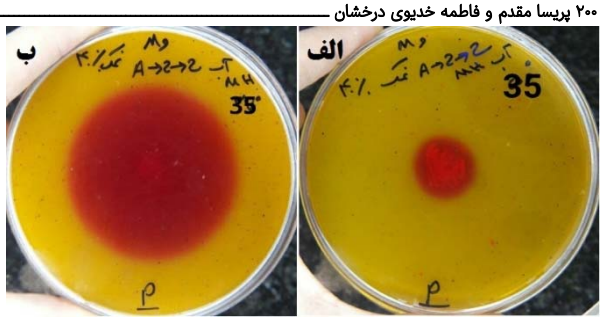
براساس نتایج حاصل، ۱۰ جدایه در محیط MH و ۹ جدایه در محیط SWN از نمونه‌های لجن به دست آمد. همچنین ۲۰ جدایه در محیط MH و ۱۸ جدایه در محیط SWN از نمونه‌های آب جداسازی شد.

ایزوله‌های تولیدکننده آسپاراژیناز

از بین ۲۷ جدایه به‌دست‌آمده بر روی محیط SWN، ۳ جدایه A_1، C_1 و D_2 قدرت بهتری از نظر ترشح آسپاراژیناز داشتند. همچنین از ۳۰ جدایه به‌دست‌آمده روی محیط MH، ۷ جدایه A_3، B_3، A_2، B_4، B_2، B_1 و D_1 قدرت بهتری را از نظر ترشح آسپاراژیناز نشان دادند. جدایه‌های تولیدکننده آسپاراژیناز روی محیط M9 در زمان‌های ۲٤ و ٤٨ ساعت پس از کشت در دمای ۳۵°C در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱) جدایه‌های تولیدکننده آسپاراژیناز بر روی محیط M9 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت در دمای ۳۵°C؛ الف) تولید آسپاراژیناز توسط جدایه A_2 روی محیط M9 پس از ۲۴ (الف) و ۴۸ ساعت (ب)

تولید آسپاراژیناز در غلظت‌های مختلف نمکی

اندازه قطر هاله‌های ایجادشده توسط آسپاراژیناز ترشحی ایزوله‌های کشت داده‌شده در غلظت‌های مختلف نمکی محیط M9 در جدول ۱ نشان داده شده است. جدایه‌های A_2 و A_3 بیشترین میزان تولید آسپاراژیناز را در غلظت‌های مختلف نمکی نشان دادند.

جدول ۱) قطر هاله‌های ایجادشده (میلی‌متر) توسط آسپاراژیناز ترشحی ایزوله‌های کشت داده‌شده در غلظت‌های مختلف نمکی

جدایه	غلظت نمک (درصد)			
	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
A_3	۵۴	۴۰	۳۵	۳۱
B_3	۳۰	۲۷	۲۰	۳۵
A_2	۸	۱۰	۲۵	۵۲
B_4	۲۷	۱۰	بدون هاله	بدون هاله
B_2	۱۵	۷	بدون هاله	بدون هاله
B_1	۱۰	۸	بدون هاله	بدون هاله
D_1	۲۸	۹	بدون هاله	بدون هاله
A_1	۱۲	۵	بدون هاله	بدون هاله
C_1	۸	۵	بدون هاله	بدون هاله
D_2	۱۳	۷	بدون هاله	بدون هاله

تولید آسپاراژیناز در دماهای مختلف

اندازه قطر هاله‌های ایجادشده توسط آسپاراژیناز ترشحی ایزوله‌های کشت داده‌شده در دماهای مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. جدایه‌های A_2 و A_3 بیشترین میزان تولید آسپاراژیناز را در دمای ۳۵°C نشان دادند. همچنین اندازه هاله ایجادشده توسط جدایه A_3 در دمای ۳۷°C ناچیز بود و در سایر دماها هاله‌ای مشاهده نشد.

دما و غلظت نمکی بهینه تولید آسپاراژیناز

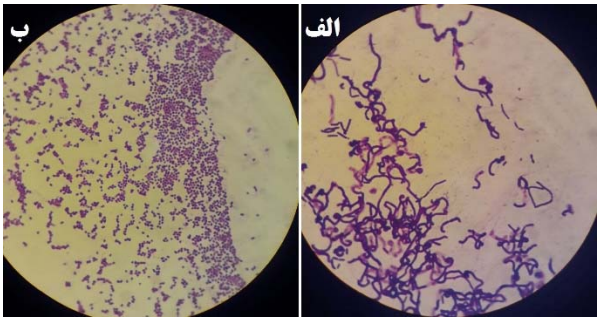
به‌طور کلی، جدایه‌های A_2 و A_3 بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را داشتند. جدایه A_3 در دمای ۳۵°C و غلظت ۱۰% نمک بزرگترین هاله به قطر ۵۴میلی‌متر را نشان داد. جدایه A_2 در دمای ۳۵°C و غلظت ۴۰% نمک بزرگترین هاله به قطر ۵۲میلی‌متر را ایجاد کرد.

جنس و گونه جدایه‌های برتر تولیدکننده آسپاراژیناز

نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی جدایه‌های برتر تولیدکننده آسپاراژیناز نشان داد که جدایه A_3 به‌صورت باسیل، رشته‌ای و گرم مثبت و جدایه A_2 به‌صورت کوکسی گرم مثبت است (شکل ۲). همچنین بررسی ژنوتیپی این جدایه‌ها نشان داد که جدایه A_3 به میزان ۱۰۰% به باکتری *باسیلوس آریابهاتای* و جدایه A_2 ۹۸/۹% به باکتری *هالوموناس الونگاتا* شباهت دارد.

جدول ۲) قطر هاله‌های ایجادشده (میلی‌متر) توسط آسپاراژیناز ترشحی ایزوله‌های کشت داده‌شده در دماهای مختلف

جدایه	دما (°C)				
	۳۰	۳۵	۳۷	۴۵	۵۰
A_3	بدون هاله	۵۴	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
B_3	بدون هاله	۳۷	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
A_2	بدون هاله	۵۲	۵۲	بدون هاله	بدون هاله
B_4	بدون هاله	۲۷	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
B_2	بدون هاله	۱۵	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
B_1	بدون هاله	۱۰	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
D_1	بدون هاله	۲۸	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
A_1	بدون هاله	۱۲	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
C_1	بدون هاله	۸	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله
D_2	بدون هاله	۱۳	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله



شکل ۲) رنگ‌آمیزی گرم جدایه‌های برتر تولیدکننده آسپاراژیناز؛ الف) جدایه A_3: باسیل، رشته‌ای و گرم مثبت؛ ب) جدایه A_2: کوکسی گرم مثبت

بحث

باکتری‌ها منبعی در دسترس و اقتصادی برای تولید آنزیم‌های مختلف به شمار می‌روند. آنزیم آسپاراژیناز در پزشکی به‌عنوان دارویی موثر برای درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد (سرطان خون) شناخته می‌شود. بنابراین محققان در تلاش برای دستیابی به L-آسپاراژیناز با توان درمانی بالا هستند. میکروارگانیزم‌هایی که در محیط‌های شور زندگی می‌کنند منبع مناسبی برای تولید این آنزیم‌ها هستند[6].

در مطالعه حاضر جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست از نمونه‌های آب و لجن دریاچه ارومیه روی محیط‌های MH و SWN انجام شد و ۵۷ جدایه از این نمونه‌ها به دست آمد. جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک و نمک‌دوست تولیدکننده آسپاراژیناز با استفاده از محیط کشت M9 نمکی با ۰/۵گرم نمک انجام شد. در ادامه تاثیر درصدهای مختلف نمک و دماها و زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری بر میزان تولید و ترشح آنزیم آسپاراژیناز در محیط کشت M9 مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۵۷ جدایه، ۱۰ جدایه (۱۷/۵%) توانایی

www.SID.ir

Archive of SID

تولید و ترشح آنزیم آسپاراژیناز را داشتند. از این میان جدایه‌های A_2 و A_3 بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را نشان دادند و به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند. جدایه A_3 در دمای ۳۵°C و غلظت ۱۰% نمک بزرگترین هاله به قطر ۵۴میلی‌متر و جدایه A_2 در همین دما و غلظت ۴۰% نمک بزرگترین هاله به قطر ۵۲میلی‌متر را ایجاد کرد. جدایه‌های بدست‌آمده در این مطالعه، به‌دلیل تحمل نمک و مقاومت در غلظت ۴۰% نمک پتانسیل کاربرد صنعتی بالایی را داشتند و نیز فعالیت آسپاراژیناز ترشحی آنها در دمای ۳۵°C نشان‌دهنده پتانسیل آنزیمی در مصارف پزشکی و دارویی است. در نهایت شناسایی فنوتیپی و مولکولی این جدایه‌ها نشان داد که جدایه A_2 به میزان ۹۸/۹% به سویه *هالوموناس الونگاتا* و جدایه A_3 ۱۰۰% به *باسیلوس آریابهاتای* شباهت دارد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که هالوموناس‌ها یک جنس از پروتئوباکتری‌های نمک‌دوست و مقاوم به نمک هستند و در محدوده ۲۵ تا ۵۰% نمک رشد می‌کنند. همچنین باسیلوس‌ها یک جنس از باکتری‌های میله‌ای شکل و گرم مثبت هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری هستند[15, 16].

مطالعات بسیاری در ایران و دنیا به‌منظور شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز از منابع مختلفی همچون آب دریا، خاک، رسوبات دریا، خاک مزرعه و غیره انجام شده‌اند. *ابراهیمی‌نژاد* و همکاران نشان دادند که از میان ۳۲ باکتری نمک‌دوست جداسازی‌شده از دریاچه نمکی مهارلو، ۱۱ سویه (۳٤/٤%) توانایی تولید آنزیم آسپاراژیناز را داشتند که اکثر آنها (۷۱/۹%) متعلق به جنس باسیلوس بودند و شرایط محیط کشت بهینه برای تولید این آنزیم دمای ۳۵°C و غلظت ۰/۵% نمک گزارش شد[17]. همچنین در مطالعه *ایزدپناه* و همکاران از ۵۷ باکتری جداسازی‌شده از آب‌های خلیج‌فارس، ۱۳ سویه (۲۲%) توانایی تولید آنزیم آسپاراژیناز را داشتند و از این میان ۸ سویه (٦۱/۵%) متعلق به جنس باسیلوس بودند و شرایط محیط کشت بهینه برای تولید این آنزیم آسپاراژیناز دمای ۳۵°C و غلظت صفر درصد نمک بود[7].

در یک مطالعه *سنتی کومار* و همکاران نشان دادند که باکتری *استرپتومایسس رادیوپوگنانس* بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را در زمان‌های ۹٦ تا ۱٦۸ ساعت و دمای ۳۰°C دارد[8]. با توجه به اینکه بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز در مطالعه حاضر در دمای ۳۵°C بود و همچنین با درنظرگرفتن اینکه این دما به دمای فیزیولوژیک بدن انسان نزدیک‌تر است، می‌توان گفت که جدایه‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر نسبت به جدایه‌های مطالعه *کومار* و همکاران کاربرد بهتری در مصارف پزشکی و بررسی‌های مولکولی خواهند داشت. همچنین با توجه به اینکه در مطالعه حاضر بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز در زمان ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری بود، می‌توان گفت که جدایه‌های شناسایی‌شده در این مطالعه نسبت به جدایه‌های *کومار* و همکاران از لحاظ صرفه‌جویی در زمان بسیار بهتر هستند.

در مطالعه دیگری *یزدانی* و همکاران نشان دادند که بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز با قطر ۳٦میلی‌متر مربوط به باکتری‌های ترموفیل جداشده از خاک و آب در دمای ٤۵°C است[18]، در حالی که در این مطالعه باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز در دمای ۳۵°C بزرگترین هاله را با اندازه قطر ۵۴میلی‌متر ایجاد کردند. بنابراین می‌توان گفت که جدایه‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر مقدار بیشتری آنزیم آسپاراژیناز را نسبت به جدایه‌های *یزدانی* و همکاران تولید می‌کنند.

در مطالعه *ذوالفقار* و همکاران بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز مربوط به باکتری‌های نمک‌دوست از جنس ویبریو و شرایط بهینه برای تولید این آنزیم دمای ۳۵°C و ۲/۵% نمک بود[19]. بنابراین باکتری‌های نمک‌دوست جداسازی‌شده در مطالعه حاضر و مطالعه *ذوالفقار* و همکاران، بیشترین تولید آنزیم را در دماهای یکسان (۳۵°C) دارند. با این حال در مطالعه حاضر باکتری‌های نمک‌دوست مورد بررسی بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز را در غلظت بیشتری نسبت به باکتری‌های نمک‌دوست مطالعه *ذوالفقار* و همکاران نشان دادند.

در یک مطالعه *قربان موحد* و همکاران نشان دادند که سویه‌های استافیلوکوکوس جداسازی‌شده از خاک کشاورزی بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را در صفر درصد نمک و دمای ۳۵°C دارند[20]. از سوی دیگر در مطالعه حاضر بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط باکتری‌های نمک‌دوست مورد مطالعه در غلظت‌های ۱۰ و ۴۰% نمک مشاهده شد. این میزان در مقایسه با غلظت صفر درصد گزارش‌شده توسط *قربان موحد* و همکاران بسیار بیشتر است و جدایه‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز را در غلظت نمک بالاتری نسبت به باکتری‌های نمک‌دوست مورد بررسی توسط *قربان موحد* و همکاران نشان دادند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت و کاربرد روزافزون آنزیم آسپاراژیناز، نتایج حاصل می‌تواند گامی برای تولید بومی این آنزیم با توان بالا و اثرات سیتوتوکسیتی کمتر باشد. جدایه‌های به‌دست‌آمده به‌دلیل تحمل نمک و مقاومت در غلظت ۴۰% نمک پتانسیل کاربرد صنعتی دارند و نیز فعالیت آسپاراژیناز ترشحی در دمای ۳۵°C نشان‌دهنده پتانسیل آنزیمی آن در مصارف پزشکی و دارویی است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این مطالعه یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: پریسا مقدم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/ پژوهشگر اصلی (۷۰%)؛ فاطمه خدیوی درخشان (نویسنده دوم)، نگارنده بحث/تحلیلگر آماری (۳۰%)

منابع مالی: مطالعه حاضر با هزینه شخصی نویسندگان انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Kornbrust BA, Stringer MA, Lange NE, Hendriksen HV. Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products. In: Whitehurst R, Oort MV, editors. Enzymes in food technology. 2nd Edition. Hoboken: Blackwell Publishing Ltd; 2010. pp. 59-87.

2- Warangkar SC, Khobragade CN. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. J Cell Tissue Res. 2009;9(3):1963-8.

3- Hatanaka T, Usuki H, Arima J, Uesugi Y, Yamamoto Y, Kumagai Y, et al. Extracellular production and characterization of two Streptomyces L-asparaginases. Appl Biochem Biotechnol. 2011;163(7):836-44.

4- Shah AJ, Karadi RV, Parkesh PP. Isolation, optimization and production of L-asparaginase from coliform bacteria. Asian J Biotechnol. 2010;2(3):169-77.

5- Chandrasekaran M, Rajeev Kumar S. Marine microbial enzymes. Biotechnol. In: Doelle HW, Stefan Rokem J, Berovic M, editors. Paris: EOLSS Publications; 1997. pp. 47-79.

6- Saptarshi SD, Lele SS. Application of evolutionary optimization technique in maximizing the recovery of L-asparaginase from E. caratovovora MTCC 1428. Glob J Biotech Biochem. 2010;5(2):97-105.

7- Izadpanah Qeshmi F, Javadpour S, Malekzadeh K, Tamadoni Jahromi S, Rahimzadeh M. Persian gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating. Int J Environ Res. 2014;8(3):813-8.

8- Senthil Kumar M, Selvam K. Isolation and purification of high efficiency L-asparaginase by quantitative preparative continuous-elution SDS PAGE electrophoresis. J Microbial Biochem Technol. 2011;3(5):73-83.

9- Mehrshad M, Amoozegar MA, Yakhchali B, Shahzade Fazeli SA. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. Biological J Microorg. 2012;1(2):49-70. [Persian]

10- Jookar Kashi F, Owlia P, Amoozegar MA, Yakhchali B. Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake. Mod Genet J. 2014;9(3):313-28. [Persian]

11- Das S, Lyla PS, Khan SA. Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives. Curr Sci. 2006;90(10):1325-35.

12- Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25(12):2103-11.

13- Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. Lett Appl Microbiol. 1997;24(1):23-6.

14- Mahdavi S, Sadeghi Zali M, Farajnia S, Mehmannavaz Y, Isazadeh A. The comparison of bovine fecal and buffy coat samples for diagnosis of Johne's Disease based on PCR. Gene Cell Tissue. 2018;5(2):e79745.

15- Vreeland RH, Martin EL. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium Halomonas elongata. Can J Microbiol. 1980;26(7):746-52.

16- Mahdavi S, Isazadeh A. Lactobacillus casei suppresses hfq gene expression in Escherichia coli O157: H7. Br J Biomed Sci. 2019;76(2):92-4.

17- Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. l-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. Indian J Microbiol. 2011;51(3):307-11.

18- Yazdani Y, Mobini-Dehkordi M, Rastegari A. Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. J Microb World. 2012;5(1-2):39-46. [Persian]

19- Zolfaghar M, Amoozegar MA, Khajeh K. Production of extracellular L-asparaginase by halophilic bacterium vibrio sp. Biol J Microorg. 2016;5(18):41-54. [Persian]

20- Ghorbanmovahed M, Ebrahimipour G, Akhtari J, Marzban A. Production of anti-leukemia L-Asparaginase by a strain of Staphylococcus Isolated from Agricultural Soil. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;25(132):1-2. [Persian]

www.SID.ir