ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):441-449

Screening and Isolation of Extracellular Lipase Producing Halophilic Bacteria Marinobacter sp. S-14 Isolated from Badab-e Surt Hypersaline Spring

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Satari Faghihi L.[1] *MSc*,
Ahmady-Asbchin S.*[1] *PhD*,
Seyedalipour B.[1] *PhD*,
Riazi Gh.H.[2] *PhD*

How to cite this article
Satari Faghihi L, Ahmady-Asbchin S, Seyedalipour B, Riazi Gh H. Screening and Isolation of Extracellular Lipase Producing Halophilic Bacteria Marinobacter sp. S-14 Isolated from Badab-e Surt Hypersaline Spring. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):441-449.

[1]Molecular & Cell Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2]Institute of Biochemistry & Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Central Organization, Pasdaran Street, Babolsar, Mazandaran, Iran. Postal Code: 4741613534
Phone: +98 (11) 35302000
Fax: -
sahmadyas@yahoo.fr

Article History
Received: May 15, 2018
Accepted: July 16, 2018
ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Today, the ability to produce hydrolases enzyme that are active in high salt concentrations is considered a new approach to the use of halophilic bacteria in biotechnology. The aim of this study was the screening and isolation of extracellular lipase producing halophilic bacteria *Marinobacter sp.* S-14 isolated from Badab-e Surt Hypersaline spring.
Materials & Methods In this experimental study, 42 pure bacterial colonies were isolated from different samples of water, soil, sediment, and sludge from a hypersaline spring with a screening technique on the specific culture medium of halophilic bacteria. The isolate S-14, which showed the highest lipase activity, was selected for the identification by biochemical methods and *16S rRNA* gene analysis. In order to optimize the growth conditions of the isolate, considering the maximum time of bacterial growth (72 hours), temperature, salt concentration, pH, carbohydrate, and amino acid intake were examined. The results were edited by Chromas pro 2.1.1 software, and compared with EzTaxon database. Strains that were more similar to the isolate were identified. Sequence analysis of *16S rRNA* were performed by BioEdit 7.1.9, Clustal-2X 2.1, and MEGA 6, and the phylogenetic tree was drawn by the neighbor joining algorithm.
Findings The isolate S-14 had 99% similarity to *Marinobacter flavimaris* and *Marinobacter adhaerens*. The isolate had optimum growth in 5% NaCl concentration, 35°C, and 7.0 acidity.
Conclusion The isolate S-14 can be an appropriate candidate to produce extracellular lipase enzyme and can utilize Fructose and Phenylalanine as a sole source of carbon and energy.

Keywords Halophilic Bacteria; Marinobacter sp.; Lipase; Hydrolysis enzymes; Badab-e Surt

CITATION LINKS

[1] Biotechnological applications and potentialities of halophilic ... [2] Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological ... [3] Proteins from halophilic bacteria ... [4] A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the ... [5] Biotechnological applications of halophilic lipases ... [6] Bacterial lipases: An overview of production ... [7] Comparison of lipases and phospholipases in the ... [8] A systematic strain selection approach for halotolerant ... [9] Isolation and identification of moderately ... [10] Study on the role of cultural, social activities urban ... [11] Production of extracellular enzymes by halophilic ... [12] Biodiversity of moderately halophilic ... [13] Current protocols in ... [14] Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium ... [15] Purification and characterization of an extracellular haloalkaline ... [16] Isolation of moderately halophilic pseudoalteromonas producing extracellular hydrolytic ... [17] Rapid method for determining the activity of microorganisms ... [18] Isolation and characterization of bacterial ... [19] Chitinolytic enzymes: Their contribution to basic ... [20] Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic ... [21] Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with ... [22] MEGA6: Molecular evolutionary genetics ... [23] Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative ... [24] Isolation of moderately halophilic indigenous bacterial strains producing salt-tolerant ... [25] Extremozymes [26] Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic ... [27] Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: Growth, maintenance, and characteristics of isolates under ... [28] Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures ... [29] Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in ... [30] Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in ... [31] Marinobacter persicus sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a saline ... [32] Marinobacter halophilus sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt ... [33] Marinobacter lutaoensis sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a ... [34] Marinobacter antarcticus sp. nov., a halotolerant ... [35] Marinobacter salarius sp. nov. and Marinobacter ...

Copyright© 2018, 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.

غربالگری و جداسازی باکتری هالوفیل مارینوباکتر (جدایه S-14) تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز از چشمه آب شور باداب‌سورت

لیلا ستاری‌فقیهی MSc
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
سلمان احمدی‌اسب‌چین* PhD
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
باقر سیدعلیپور PhD
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
غلامحسین ریاضی PhD
مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: امروزه توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی که در غلظت‌های بالای نمک فعال هستند، به‌عنوان رویکرد تازه‌ای در استفاده از باکتری‌های هالوفیل در بیوتکنولوژی مطرح است. هدف این پژوهش، غربالگری و جداسازی باکتری هالوفیل مارینوباکتر (جدایه S-14) تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز از چشمه آب شور باداب‌سورت بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، ۴۲ کلنی خالص باکتری، از نمونه‌های مختلف آب، خاک، رسوب و لجن یکی از چشمه‌های آب شور باداب‌سورت با تکنیک غربالگری روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های هالوفیل جداسازی شدند. جدایه S-14 که بیشترین فعالیت لیپازی را از خود نشان داد، برای شناسایی توسط روش‌های بیوشیمیایی و آنالیز ژن *16S rRNA* انتخاب شد. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه با درنظرگرفتن بیشینه زمان رشد باکتری (۷۲ ساعت)، دما، غلظت نمک، pH، میزان مصرف کربوهیدرات و آسیدامینه بررسی شدند. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro 2.1.1 ویرایش و با اطلاعات بانک اطلاعاتی EzTaxon مقایسه شد. سویه‌هایی که تشابه بیشتری با جدایه منتخب داشتند، مشخص شدند. آنالیز توالی *16S rRNA* توسط نرم‌افزارهای BioEdit 7.1.9، Clustal-2X 2.1 و MEGA 6 انجام و درخت فیلوژنی توسط الگوریتم اتصال- همسایگی ترسیم شد.
یافته‌ها: جدایه S-14 با تشابه بیش از ۹۹% با دو گونه *مارینوباکتر فلاویماریس* (*Marinobacter flavimaris*) و *مارینوباکتر ادهارنس* (*Marinobacter adhaerens*) تجانس داشت. جدایه S-14 بیشترین میزان رشد را در غلظت نمک ۵%، دمای ۳۵°C و میزان اسیدیته ۷/۰ نشان داد.
نتیجه‌گیری: جدایه S-14، تولیدکننده مناسبی برای آنزیم خارج‌سلولی لیپاز است و می‌تواند از فروکتوز و اسیدآمینه فنیل‌آلانین به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کند.
کلیدواژه‌ها: باکتری هالوفیل، مارینوباکتر، آنزیم لیپاز، آنزیم‌های هیدرولازی، باداب‌سورت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۵
*نویسنده مسئول: sahmadyas@yahoo.fr

مقدمه

باکتری‌های هالوفیل در اکثر زیستگاه‌های طبیعی و محیط‌های شور پراکنده شده‌اند. هالوفیل‌ها زیرشاخه‌ای از باکتری‌های اکسترموفیل محسوب می‌شوند که توانایی رشد در غلظت‌های بالای نمک را دارند[1]. امروزه توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی که در غلظت‌های بالای نمک فعال هستند و دناتوره نمی‌شوند، به‌عنوان رویکرد تازه‌ای در استفاده از باکتری‌های هالوفیل در بیوتکنولوژی مطرح است[2, 3]، لذا با شناسایی باکتری‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها و بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم می‌توان نیاز بازارهای داخلی را به واردات، تولید و مصرف این آنزیم‌ها مرتفع ساخت.

آنزیم لیپاز (E.C.3.1.1.1) و کربوکسیل‌استراز (E.C.3.1.1.3) به‌صورت گسترده در طبیعت توسط باکتری‌ها و یوکاریوت‌های آلی‌تر تولید می‌شوند. تری‌آسیل‌گلیسرول‌های کم‌محلول در آب، سوبسترای اصلی آنزیم لیپاز را تشکیل می‌دهند. لیپازها به‌طور اختصاصی توانایی هیدرولیز پیوند استری میان کربن ۱ و ۳ گلیسرول را دارند. در واقع لیپازها می‌توانند زنجیرهای بلند کربنی آسیل‌گلیسرول‌ها را هیدرولیز کنند، در حالی که استرازها تنها می‌توانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره را هیدرولیز نمایند[4, 5]. این آنزیم‌ها به‌واسطه فعالیت بالا، دامنه گسترده سوبسترایی و پایداری در شرایط سخت فرآیندهای صنعتی، کاربردهای بسیار وسیعی در بیوتکنولوژی دارند[5, 6]. لیپازها، بیوکاتالیست‌های ارزشمندی هستند که در محیط‌های آبی و غیرآبی، فعال و همچنین در pHهایی غیر از pH خنثی و دماهای بالا مقاوم هستند، لذا این قابلیت‌ها موجب استفاده وسیع آنها در صنایع تولید شوینده، صنایع غذایی و دارویی، صنایع چرم‌سازی، تولید سوخت زیستی و سنتز انواع ترکیبات چرب شده است[6-8].

ایران کشوری گرم و خشک با پراکندگی وسیع از محیط‌های شور دایمی و فصلی است[9]. باداب‌سورت یکی از چشمه‌های شور دایمی است که پس از کوه دماوند در سال ۱۳۸۷ به‌عنوان دومین اثر ملی طبیعی ایران به ثبت رسیده است[10] و دارای منبع غنی از میکروارگانیزم‌های نمک‌دوست با قابلیت تولید آنزیم‌های خارج‌سلولی بوده، لذا شناسایی این میکروارگانیزم‌های بومی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. هدف این پژوهش، غربالگری و جداسازی باکتری هالوفیل مارینوباکتر (جدایه S-14) تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز از چشمه آب شور باداب‌سورت بود.

مواد و روش‌ها

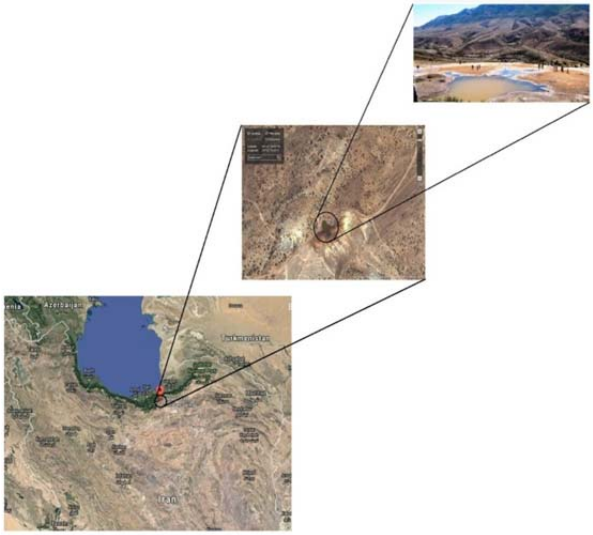
در پژوهش تجربی حاضر، توئین ۸۰، اینولین، پکتین و کیتین (Sigma-Aldrich؛ آلمان)، محیط کشت نوترینت‌براث و تست فعالیت داکسی‌ریبونوکلئاز (DNase آگار) و باقی محیط کشت‌های تست‌های بیوشیمیایی (Qlab؛ کانادا) و باقی مواد ذکرشده در پژوهش (Merck؛ آلمان) تهیه شد.

نمونه‌گیری و غربالگری باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: در این پژوهش نمونه‌های مختلف آب، خاک، رسوب و لجن یکی از چشمه‌های آب شور باداب‌سورت مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از تکنیک غربالگری روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های هالوفیل جداسازی شدند. نمونه‌ها در بطری‌های سترون با رعایت زنجیره سرد کمتر از ۲۴ساعت به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله pH نمونه‌های آب (با نمونه‌گیری از دو نقطه چشمه آب‌شور) توسط دستگاه pHمتر مدل ۳۵۱۰ (Jenway؛ انگلستان) به ترتیب ۷ و ۷/۱ اندازه‌گیری شدند. به‌منظور جداسازی بهتر باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، زمان نمونه‌گیری در فصل خشک سال در نظر گرفته شد. لذا نمونه‌گیری در اواسط مهر ۱۳۹۴ از چشمه آب‌شور باداب‌سورت (شکل ۱) واقع در کیاسر استان مازندران در موقعیت جغرافیایی N362119 E535123 و ارتفاع ۱۸۴۱متری از سطح دریا و در محدوده روستای اروست انجام شد[10].

برای جداسازی بهتر باکتری‌های هالوفیل و هالوتولرنت از محیط کشت اختصاصی جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست متوسط (MH) و محیط کشت آگار و مواد مغذی آب دریا (SWN) با pHهای مختلف استفاده شد. محیط کشت MH شامل ۱۰۱گرم بر لیتر سدیم‌کلرید (NaCl)، ۹/۶گرم بر لیتر منیزیم‌کلرید ۷آبه ($MgCl_2.7H_2O$)، ۷گرم بر لیتر منیزیم‌کلرید ۶آبه

($MgCl_2.6H_2O$)، ۰/۳۶گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید ۲آبه ($CaCl_2.2H_2O$)، ۲گرم پتاسیم‌کلرید (KCl)، ۰/۰۶گرم بر لیتر سدیم‌بی‌کربنات ($NaHCO_3$)، ۰/۰۲۶گرم بر لیتر سدیم‌بروماید ($NaBr$)، ۱۰گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵گرم بر لیتر پپتون، یک‌گرم بر لیتر گلوکز و ۱۵گرم بر لیتر آگار با pH برابر با ۰/۵±۷/۵ بود[11]. محیط کشت SWN نیز شامل ۲۰گرم بر لیتر سدیم‌کلرید، ۵گرم بر لیتر منیزیم‌کلرید ۷آبه، ۳گرم بر لیتر منیزیم‌کلرید ۶آبه، ۰/۰۵گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید ۲آبه، ۰/۵گرم بر لیتر پتاسیم‌کلرید، یک‌گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲گرم بر لیتر عصاره گوشت، ۵گرم بر لیتر پپتون و ۱۵گرم بر لیتر آگار با pH برابر با ۰/۵±۹/۰ بود[12].

نمونه‌های آب، سانتریفیوژ و از رسوب آن به‌صورت مستقیم برای کشت روی محیط کشت استفاده شد. در نمونه‌های خاک و رسوب، پس از تهیه رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-4} از سوسپانسون میکروبی حاصل استفاده و نمونه لجن به‌صورت مستقیم به محیط کشت تلقیح شد. محیط‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۷°C به‌مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری شدند. به‌منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های تُندرشد و کُندرشد در فواصل زمانی ۲۴ساعته از کلنی‌های جدید تشکیل‌شده بر بستر آگار، کشت مجدد صورت پذیرفت.



شکل ۱) منطقه نمونه‌گیری چشمه آب شور باداب‌سورت

خالص‌سازی، نگهداری و نام‌گذاری جدایه‌ها: برای خالص‌سازی سویه‌ها پس از چندین مرحله کشت هر جدایه با ایجاد تک‌کلنی، احراز خلوص آن و مشاهده تثبیت خصوصیات میکروسکوپی و مورفولوژیک، جدایه‌ها نام‌گذاری شدند و از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌ها پس از تلقیح تک‌کلنی‌ها به محلول ۱۵% گلیسرول، جدایه‌ها در فریزر ۸۰°C- به‌عنوان استوک فریز شدند.

بررسی صفات و خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها: به‌منظور بررسی خصوصیات ظاهری و ماکروسکوپی، از محیط جامد حاوی غلظت بالاتری از آگار استفاده شد و شکل، رنگ، حاشیه، سطح و ارتفاع کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جدایه‌ها از نقطه‌نظر معطربودن بررسی شدند. شکل میکروسکوپی جدایه‌ها پس از رنگ‌آمیزی گرم توسط میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد[13].

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها: به‌منظور بررسی فعالیت اکسیدازی و کاتالازی جدایه‌ها با استفاده از کشت۲۴ساعته باکتری‌ها به‌ترتیب از تترامتیل‌پارافینیلین‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلراید ($C_6H_8N_2$) و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) به‌عنوان معرف استفاده شد. بررسی فعالیت اکسیدازی با ایجاد رنگ آبی در حداقل زمان و بررسی فعالیت کاتالازی با تولید حباب اکسیژن، مثبت گزارش شد. برای آزمون‌های بیوشیمیایی، هر یک از جدایه‌ها به محیط‌های کشت سیمون‌سیترات، سولفید ایندول موتیلیتی (SIM)، تریپل شوگر آیرون‌آگار (TSI) و متیل‌رد- وگزپروسکوئر (MR-VP) تلقیح شدند و نتایج پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری بررسی شد.

تفکیک سویه‌های نمک‌دوست از سویه‌های تحمل‌کننده نمک: برای تفکیک میان باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، غلظت کلی نمک موجود در محیط کشت مطرح است. بنابراین برای تفکیک جدایه‌ها از نظر نمک‌دوست‌بودن یا تحمل‌پذیری نمک، محیط کشت نوترینت‌آگار با صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵% نمک تهیه شد و پس از تهیه سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلندی از هر جدایه، تلقیح روی محیط کشت‌های فوق صورت گرفت و در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج به‌مدت یک هفته هر ۲۴ ساعت یک‌بار بررسی شد. جدایه‌هایی که بتوانند روی محیط کشت فاقد نمک به‌خوبی محیط کشت حاوی نمک رشد کنند، به‌عنوان سویه‌های هالوتولرنت در نظر گرفته می‌شوند[9]. همچنین به‌منظور بررسی رشد هالوفیل‌ها، محیط کشت نوترینت‌آگار با درصدهای مختلفی از نمک سدیم‌کلرید صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵% تهیه شد و جدایه‌ها پس از تهیه سوسپانیون نیم‌مک‌فارلندی به محیط‌های کشت، القا و در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند و نهایتاً رشد آنها توسط کدورت‌سنجی با جذب در ۶۰۰نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر مدل Spectrum SP-2100UV (Shanghai Spectrum؛ چین) بررسی شد. براساس تفاوت مورفولوژیک و خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌ها، تنها تعدادی از جدایه‌ها برای بررسی تولید آنزیم انتخاب شدند.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی: این بررسی روی دسته‌ای از جدایه‌ها که تفاوت آنها از لحاظ خصوصیات و صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفته بود، انجام شد. در این مرحله سنجش به روش پلیت و روی دو درصد متفاوت از غلظت نمک سدیم‌کلرید (۵ و ۱۰%) صورت گرفت.

تولید خارج‌سلولی آنزیم لیپاز: به‌منظور بررسی تولید خارج‌سلولی آنزیم لیپاز با توجه به هیدرولیز توئین ۸۰ از محیط کشت شامل ۱۰گرم بر لیتر پپتون، ۰/۱گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید یک‌آبه ($CaCl_2.1H_2O$)، ۱۵گرم بر لیتر آگار و ۱% توئین ۸۰ استفاده شد. پس از تلقیح باکتری و گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C به‌مدت چهار روز ایجاد هاله رسوبی مات و کدر در اطراف کلنی‌ها نشانه هیدرولیز توئین ۸۰ و تولید آنزیم خارج‌سلولی لیپاز[14] است. گستردگی محدوده رسوب براساس ضعف و قدرت آنزیم لیپاز تولیدشده توسط باکتری است.

به‌منظور بررسی تولید خارج‌سلولی آنزیم‌های هیدرولازی دیگر، آزمایش‌های تکمیلی زیر برای تعدادی از جدایه‌ها انجام شد:

۱- تولید خارج‌سلولی آنزیم پروتئاز: برای بررسی تولید خارج‌سلولی پروتئاز از یک محیط کشت با ترکیب ۱۰گرم بر لیتر اسکیم‌میلک (Skim Milk)، ۳گرم بر لیتر پپتون، ۵گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۵گرم بر لیتر آگار استفاده شد. پس از دو هفته گرمخانه‌گذاری، ایجاد هاله روشن و شفاف در اطراف کلنی‌ها به‌دلیل هیدرولیز پروتئین کازئین، به‌عنوان جواب مثبت در نظر گرفته شد[15].

۲- تولید خارج‌سلولی آنزیم آمیلاز: برای بررسی تولید آمیلاز

خارج‌سلولی توسط جدایه‌ها از محیط کشت نشاسته آگار با ترکیبات ۱۵گرم بر لیتر نشاسته، ۳گرم بر لیتر پپتون، ۵گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۵گرم بر لیتر آگار استفاده شد. پس از یک هفته گرمخانه‌گذاری جدایه‌ها در دمای ۳۷°C انکوباتور، با افزودن یدیدپتاسیم (I_2/KI) یا لوگل به پلیت، ظهور هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها، نشانه هیدرولیز نشاسته بود[16].

۳- تولید خارج‌سلولی آنزیم داکسی‌ریبونوکلئازها (DNase): برای مطالعه تولید خارج‌سلولی آنزیم DNase از محیط کشت DNase تست آگار با افزودن ۰/۸میلی‌گرم تولوئیدن‌بلو به‌عنوان معرف استفاده شد. پس از یک هفته گرمخانه‌گذاری در صورتی که باکتری قادر به تولید آنزیم DNase می‌شد، رنگ محیط کشت اطراف کلنی از سبز به زرد تغییر می‌یافت[17].

۴- تولید خارج‌سلولی آنزیم اینولیناز: اینولین از طریق صاف‌کردن به ترکیبات محیط کشت شامل ۳گرم بر لیتر اینولین، ۰/۲گرم بر لیتر مونوپتاسیم‌فسفات (KH_2PO_4)، ۲گرم بر لیتر آمونیوم‌سولفات با نام شیمیایی $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه و ۲۰گرم بر لیتر آگار پس از اتوکلاوکردن افزوده شد. پس از یک هفته رشد باکتری‌ها در سطح پلیت، نشانه توانایی جدایه‌ها برای تولید آنزیم خارج‌سلولی اینولیناز بود[18].

۵- تولید خارج‌سلولی آنزیم پکتیناز: محیط کشت آنزیم پکتیناز، یک محیط کشت کمپلکس از ترکیبات یک‌گرم بر لیتر پکتین، ۰/۰۲گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه، ۱/۶گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات یک‌آبه، ۰/۱۴گرم بر لیتر آمونیوم‌سولفات، ۱/۴گرم بر لیتر زینک‌سولفات ۷آبه ($ZnSO_4.7H_2O$)، ۰/۲گرم بر لیتر دی‌پتاسیم‌فسفات (K_2HPO_4)، ۵گرم بر لیتر سولفات آهن (II) ۷آبه ($FeSO_4.7H_2O$)، ۲گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید و ۲۰گرم بر لیتر آگار بود. پکتین از طریق صاف‌کردن به محیط فوق پس از اتوکلاو افزوده شد[9].

۶- تولید خارج‌سلولی آنزیم کیتیناز: محیط کشت شامل ۳۰گرم بر لیتر تریپتیک سوی‌براث (TSB)، ۰/۱گرم بر لیتر کیتین‌کلوئیدال و ۱۲گرم بر لیتر آگار بود. کیتین جدا از ترکیبات دیگر محیط کشت در ۱۰۵°C به‌مدت ۵دقیقه جداگانه اتوکلاو شد. برای تولید کیتیناز خارج‌سلولی پس از گرمخانه‌گذاری، روی محیط کشت در اطراف کلنی باکتریایی هاله‌ای شفاف مشاهده می‌شود[19].

۷- تولید خارج‌سلولی آنزیم زایلاناز: محیط کشت آنزیم زایلاناز با ترکیبات ۰/۲گرم بر لیتر پپتون، ۰/۱گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۰۵گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید، ۰/۵گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات و ۲۰گرم بر لیتر آگار، اتوکلاو شد. سپس میزان ۱% زایلان به‌وسیله صاف‌کردن به آن افزوده شد. پس از یک هفته گرمخانه‌گذاری با افزودن کنگورد ۰/۱% و نمک یک‌مولار به محیط کشت (به‌عنوان معرف)، اگر در اطراف کلنی‌ها هاله شفاف ایجاد می‌شد، تاییدی بر تولید آنزیم زایلان توسط جدایه بود[20].

۸- تولید خارج‌سلولی آنزیم ژلاتیناز: برای تولید ژلاتین از محیط کشت شامل ۱۲۰گرم بر لیتر ژلاتین، ۵گرم بر لیتر پپتون و ۳گرم بر لیتر عصاره گوشت استفاده شد. پس از یک هفته گرمخانه‌گذاری، محیط کشت از انکوباتور خارج و به‌مدت ۱۰دقیقه در یخچال در دمای ۴°C قرار داده شد. در صورت تولید آنزیم ژلاتیناز توسط باکتری، پس از خروج لوله آزمایش از یخچال، اگر محیط کشت همچنان به‌صورت مایع باقی بماند، جواب تست مثبت است[14].

از میان جدایه‌هایی که برای تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج‌سلولی انتخاب شده بودند، یک جدایه با توانایی تولید آنزیم خارج‌سلولی لیپاز به‌عنوان جدایه منتخب برای توالی‌یابی، آنالیز ژن *16S rRNA* و رسم درخت فیلوژنی انتخاب شد. در واقع از میان جدایه‌هایی که قادر به تولید آنزیم خارج‌سلولی لیپاز بودند، جدایه S-14 براساس مقایسه اندازه قطر هاله نمکی تشکیل‌شده از هیدرولیز توئین ۸۰ با دیگر جدایه‌ها، به‌عنوان جدایه منتخب برای تعیین توالی و آنالیز ژن *16S rDNA* پس از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی و تایید صحت انجام واکنش توسط الکتروفورز (Macrogen؛ کره جنوبی) ارسال شد. جدایه S-14، باسیل نازک و رشته‌ای گرم‌منفی، خمیده، با کلنی‌های نقطه‌ای بسیار کوچک است. این جدایه از نظر پیگمان‌زایی، کرم‌رنگ، سطح کلنی آن نیمه‌شفاف و از نظر برجستگی کلنی برآمده و دارای بوی مطبوعی است. این جدایه با شماره دستیابی KX954612 در سایت NCBI ثبت شد.

استخراج DNA ژنومی و آنالیز ژن *16S rRNA*: برای استخراج DNA ژنومی ابتدا یک کشت ۲۴ساعته از جدایه منتخب تهیه شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت مخصوص استخراج (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) انجام شد. پس از اطمینان از استخراج DNA ژنومی با انجام الکتروفورز و مشاهده باند استخراج ژنوم، با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ژن *16S rDNA*، 27F و 1492R واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در ۳۵ سیکل با دمای ذوب اولیه ۹۵°C (۵دقیقه)، دمای ذوب ۹۵°C (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال ۵۸/۵°C (۴۵ثانیه)، دمای سنتز دو رشته ۷۲°C (۶۰ثانیه) و نهایتاً دمای سنتز نهایی ۷۲°C (۱۰دقیقه) انجام شد.

جدول ۱) توالی و خصوصیات پرایمرهای یونیورسال رفت و برگشت

پرایمر	توالی ('5—>3')	درصد GC	دمای ذوب	محصول PCR
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	%۴۷	۴۹°C	۱۵۰۰جفت‌بازی
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	%۴۲	۴۷°C	۱۵۰۰جفت‌بازی

نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro 2.1.1ویرایش و با اطلاعات بانک اطلاعاتی EzTaxon مقایسه شد[21]. سویه‌هایی که تشابه بیشتری با جدایه منتخب داشتند، مشخص شدند و توالی ژن *16S rDNA* آنها از سایت NCBI دریافت شد. آنالیز توالی *16S rRNA* توسط نرم‌افزارهای BioEdit 7.1.9، Clustal-2X 2.1 و MEGA 6 انجام شد[22]. درخت فیلوژنی توسط الگوریتم اتصال- همسایگی و بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با کمک الگوریتم تحلیل بوت‌استرپ با ۱۰۰۰بار نمونه‌گیری ترسیم شد.

بررسی شرایط بهینه رشد جدایه S-14

به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه با درنظرگرفتن بیشینه زمان رشد باکتری (۷۲ ساعت)، دما، غلظت نمک، pH، میزان مصرف کربوهیدرات و آسیدامینه بررسی شدند.

دمای بهینه رشد: جدایه S-14 به محیط کشت نوترینت‌آگار حاوی ۵% سدیم‌کلراید، تلقیح و در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵ و ۵۵°C به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. از محیط کشت حاوی باکتری هر ۲۴ ساعت مقداری به‌عنوان نمونه برداشته و جذب آن در ۶۰۰نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و میزان رشد باکتری براساس دمای بهینه رشد بررسی شد. همچنین جدایه به محیط کشت نوترینت‌آگار حاوی ۵% نمک تلقیح و در دمای ۵°C، انکوبه و در مدت سه روز رشد باکتری روی محیط کشت جامد بررسی شد.

غلظت بهینه نمک: با توجه به رشد جدایه S-14 در آزمایشاتی که برای بررسی میزان تحمل‌پذیری نمک و نمک‌دوستی انجام شده بود، باکتری به محیط کشت حاوی صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰% نمک، تلقیح و در دمای بهینه رشد گرمخانه‌گذاری شد. به‌مدت سه روز، هر ۲۴ ساعت یک‌بار از محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک، مقداری نمونه برداشته و جذب آن در ۶۰۰نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و نمودار مربوط به رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نمک رسم شد. غلظت بهینه رشد جدایه به دست آمد.

pH بهینه رشد جدایه: جدایه S-14 به محیط کشت‌هایی با غلظت بهینه نمک با میزان اسیدیته‌های متفاوت (pHهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱) در دمای بهینه رشد به‌مدت سه روز گرمخانه‌گذاری شد و با نمونه‌برداری از محیط‌های کشت به روش کدورت‌سنجی، رشد باکتری در ۶۰۰نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

مصرف کربوهیدرات توسط جدایه: برای بررسی مصرف کربوهیدرات توسط جدایه از گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز در محیط کشت شامل ترکیبات ۵۰گرم بر لیتر سدیم‌کلرید، ۰/۲گرم بر لیتر پتاسیم‌کلرید، ۰/۰۲گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه، ۰/۱گرم بر لیتر پتاسیم‌نیترات (KNO_3)، ۰/۱گرم بر لیتر دی‌آمونیوم‌فسفات با نام شیمیایی $(NH_4)_2HPO_4$، ۰/۰۵گرم بر لیتر مونوپتاسیم‌فسفات (KH_2PO_4) و ۰/۵گرم بر لیتر کربوهیدرات (pH برابر با ۰/۱±۷/۵) استفاده شد و پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، رشد باکتری به‌وسیله اسپکتروفتومتر در ۶۰۰نانومتر مورد بررسی قرار گرفت[23].

مصرف اسیدآمینه به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن: برای بررسی مصرف اسیدآمینه، یک بافر نمکی با افزودن اسیدآمینه مورد نظر با ترکیبات ۵۰گرم بر لیتر سدیم‌کلرید، ۰/۲گرم بر لیتر پتاسیم‌کلرید، ۰/۰۲گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه، ۰/۰۵گرم بر لیتر مونوپتاسیم‌سولفات و ۰/۱گرم بر لیتر آمینواسید (pH برابر با ۰/۱±۷/۵) تهیه شد. اسیدهای آمینه سیستئین، آرژنین و فنیل‌آلانین به این بافر نمکی افزوده شدند. باکتری پس از رشد در محیط کشت نوترینت‌براث، به سه لوله آزمایش حاوی هر یک از اسیدهای‌آمینه و یک لوله آزمایش حاوی بافر به‌عنوان نمونه کنترل منفی تلقیح و پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری رشد باکتری توسط روش نورسنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۶۰۰نانومتر بررسی شد[23].

یافته‌ها

۴۲ کلنی خالص باکتری با استفاده از تکنیک غربالگری روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های هالوفیل مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین تعداد جدایه‌ها روی محیط کشت MH با اسیدیته ۷/۵ جداسازی شدند. براساس رنگ‌آمیزی گرم، ۴۲% باکتری‌ها گرم‌مثبت (۷% باسیل گرم‌مثبت میله‌ای و ۹۳% کوکسی گرم‌مثبت) و ۵۸% جدایه‌ها به‌صورت باسیل گرم‌منفی گزارش شدند. براساس آزمون تحمل‌پذیری نمک، ۴۷% جدایه‌ها توانستند هم روی محیط کشت حاوی نمک و هم روی محیط کشت فاقد نمک به‌خوبی رشد کنند. از میان ۴۲ کلنی باکتریایی براساس تفاوت در تست‌های بیوشیمیایی و عدم تشابه در خصوصیات ظاهری و مورفولوژیک، ۱۴ جدایه به‌منظور بررسی تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج‌سلولی انتخاب شدند. خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیک ۵ جدایه تولیدکننده آنزیم لیپاز تعیین شد (جدول ۲). همچنین حدود ۳۶% جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم خارج‌سلولی لیپاز روی محیط کشت حاوی ۱۰ و ۵% نمک بودند (جدول ۳).

جدول ۲) بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز

خصوصیات	S-3	S-10	S-11	S-14	S-18
مورفولوژیک					
شکل	نقطه‌ای	نقطه‌ای	نقطه‌ای	نقطه‌ای	نقطه‌ای
پیگمان‌زایی	شیری	کرم	شیری	کرم	گلبهی
سطح کلنی	مات	نیمه‌شفاف	مات	نیمه‌شفاف	نیمه‌شفاف
حاشیه کلنی	صاف و کامل	-	صاف و کامل	-	-
برجستگی کلنی	محدب	برآمده	برآمده	برآمده	محدب
معطربودن کلنی	-	معطر	-	معطر	معطر
رنگ‌آمیزی گرم	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی
شکل یاخته‌ای	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	کوکوباسیل
فرم باکتری	رشته‌ای	رشته‌ای	دیپلوئید خمیده	رشته‌ای خمیده	تکی و رشته‌ای
اندازه	نازک	بسیار نازک	-	-	بسیار کوچک
رشد بر غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید	۰-۱۰/۰%	۰-۱۰/۰%	۰-۱۰/۰%	۰-۱۰/۰%	۰-۱۰/۰%
کاتالاز	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+	+
حساسیت آنتی‌بیوتیک					
باسیتراسین	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
تتراسایکلین	حساس	حساس	مقاوم	حساس	حساس
جنتامیسین	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
کلرآمفنیکل	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
پنی‌سیلین	حساس	حساس	مقاوم	حساس	حساس
تست‌های مورد استفاده					
سیمون‌سیترات	-	*w	+	-	-
متیل‌رد (MR)	+	-	-	-	-
وژس‌پروسکوئر (VP)	-	+	-	+	-
احیای نیترات	-	w	+	-	+
تولید گاز	-	-	-	-	-
حرکت	-	-	-	-	w
تست ایندول	-	-	-	-	-

w* نشان‌دهنده ضعیف‌بودن آن ویژگی است

جدول ۳) بررسی تولید آنزیم‌های هیدرولازی توسط پنج جدایه تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز

ایزوله	لیپاز	DNase	پروتئاز	آمیلاز	اینولیناز	پکتین‌آز	زایلاناز	کیتیناز	ژلاتیناز
S-3	+	-	-	-	-	-	-	w*	-
S-10	+	-	-	-	-	-	-	+	-
S-11	+	+	+	+	+	+	-	w	-
S-14	+	-	-	-	-	+	-	w	-
S-18	+	-	+	w	-	-	-	+	-

w* نشان‌دهنده ضعیف‌بودن آن ویژگی است

شباهت‌ها و تفاوت‌های جدایه S-14 با شش گونه باکتریایی جنس مارینوباکتر شامل *مارینوباکتر هالوفیلووس* (*Marinobacter halophilus*) سویه XCD-X12، *مارینوباکتر پرسیکوس* (*Marinobacter persicus*) سویه M9B، *مارینوباکتر لوتائونسیس* (*Marinobacter lutaoensis*) سویه T5054، *مارینوباکتر آنتارکتیکوس* (*Marinobacter antarcticus*) سویه ZS2-30، *مارینوباکتر سالاریس* (*Marinobacter salaries*) سویه R9SW1 و *مارینوباکتر سیمیلیس* (*Marinobacter similis*) سویه A3d10 استخراج شد (جدول ۴).

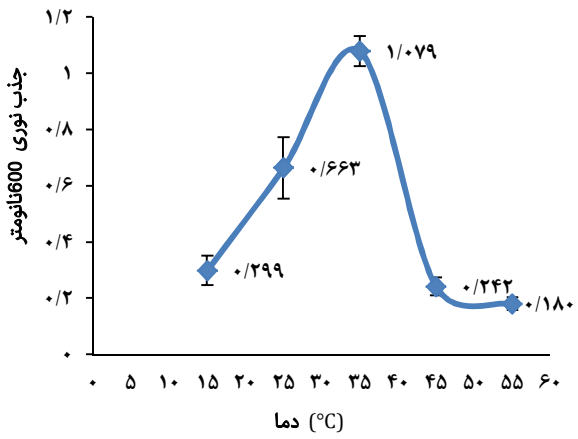
جدول ۴) شباهت‌ها و تفاوت‌های جدایه S-14 با دیگر سویه‌های جنس مارینوباکتر

متغیرها	باکتری شماره ۱	باکتری شماره ۲	باکتری شماره ۳	باکتری شماره ۴	باکتری شماره ۵	باکتری شماره ۶	باکتری شماره ۷
رنگ‌آمیزی گرم	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی	گرم‌منفی
شکل سلولی	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای
حرکت	غیرمتحرک	متحرک	متحرک	متحرک	متحرک	متحرک	متحرک
پیگمان‌زایی	کرم	-	زرد- نارنجی	-	کرم- قهوه‌ای	-	-
تحمل‌پذیری نمک	%۰-۱۰/۰	%۰-۲۰/۰	%۵/۰-۲۰/۰	%۰/۵-۱۲/۰	%۰-۲۵/۰	%۰/۵-۲۵/۰	%۰/۵-۲۵/۰
غلظت نمک بهینه رشد	%۲/۵-۵/۰	%۴/۰-۸/۰	%۷/۵-۱۰/۰	%۳/۰-۵/۰	%۳/۰-۴/۰		
تحمل‌پذیری pH	%۵/۰-۹/۰	%۶/۵-۱۰/۵	%۶/۰-۸/۰	%۵/۰-۹/۰	%۵/۰-۱۰/۵	%۶/۰-۹/۰	%۶/۰-۹/۰
pH بهینه رشد	۷/۰	۸/۵	۷/۰	۷/۰	۷/۰	۷/۵	۷/۵
رشد در دامنه دمایی مختلف	۱۵-۴۵°C	۴-۳۵°C	۲۵-۴۵°C	۲۵-۵۰°C	۴-۳۵°C	۴-۴۰°C	۴-۴۰°C
دمای بهینه رشد	۳۵°C	۳۰°C	۳۵°C	۴۵°C	۲۵°C	۲۵-۳۰°C	۲۵-۳۰°C
هیدرولیز توئین ۸۰	مثبت	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
احیای نیترات	منفی	مثبت	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت
مصرف کربوهیدرات	دی- فروکتوز	دی- گلوکز	دی- فروکتوز دی- مالتوز	دی- گلوکز	دی- گلوکز دی- مالتوز	-	دی- گلوکز w
مصرف اسیدآمینه	ال- فنیل‌آلانین	ال- آرژنین	ال- هیستیدین ال- پرولین	ال- آلانین ال- آسپارتات ال- گلوتامات ال- فنیل‌آلانین	ال- آلانین ال- سرین	ال- گلوتامیک‌اسید ال- سرین	ال- گلوتامیک‌اسید
تست کاتالاز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
تست اکسیداز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت

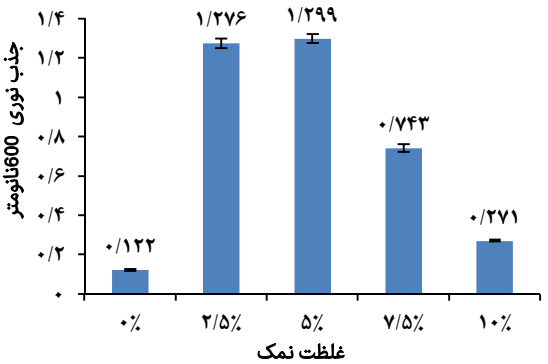
باکتری شماره ۱: جدایه S-14 نمونه انتخاب‌شده مطالعه حاضر، باکتری شماره ۲: *مارینوباکتر هالوفیلووس* سویه XCD-X12، باکتری شماره ۳: *مارینوباکتر پرسیکوس* سویه M9B، باکتری شماره۴: *مارینوباکتر لوتائوسیس* سویه T5054، باکتری شماره ۵: *مارینوباکتر آنتارکتیکوس* سویه ZS2-30، باکتری شماره ۶: *مارینوباکتر سالاریس* سویه R9SW1 و باکتری شماره ۷: *مارینوباکتر سیمیلیس* سویه A3d10 است ؛ w* نشان‌دهنده ضعف مصرف کربوهیدرات است

براساس توالی ژن *16S rDNA* برای جدایه S-14 و آنالیز نتایج در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon، این جدایه با تشابه بیش از ۹۹% با دو گونه *مارینوباکتر فلاویماریس* (*Marinobacter flavimaris*) و *مارینوباکتر ادهارنس* (*Marinobacter adhaerens*) تجانس داشت. درخت فیلوژنتیک براساس توالی *16S rRNA* برای مقایسه وضعیت سویه مورد بررسی رسم شد (شکل ۲).

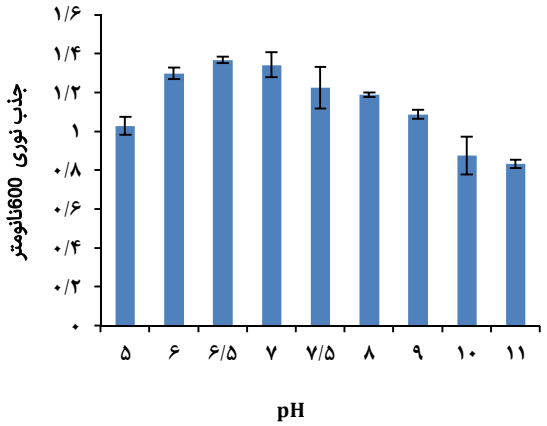
براساس زمان بهینه رشد باکتری (۷۲ساعت)، جدایه S-14 در دمای ۳۵°C، غلظت ۵% نمک سدیم‌کلرید و همچنین اسیدیته خنثی (pH برابر با ۷)، بیشترین میزان رشد براساس جذب در ۶۰۰نانومتر را از خود نشان داد. در آزمایش مصرف منابع مختلف کربوهیدرات و اسیدهای‌آمینه، جدایه S-14 بیشترین میزان رشد را با بالاترین جذب نوری در ۶۰۰نانومتر با مصرف دی- فروکتوز و ال- فنیل‌آلانین به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشت (نمودارهای ۳-۱).



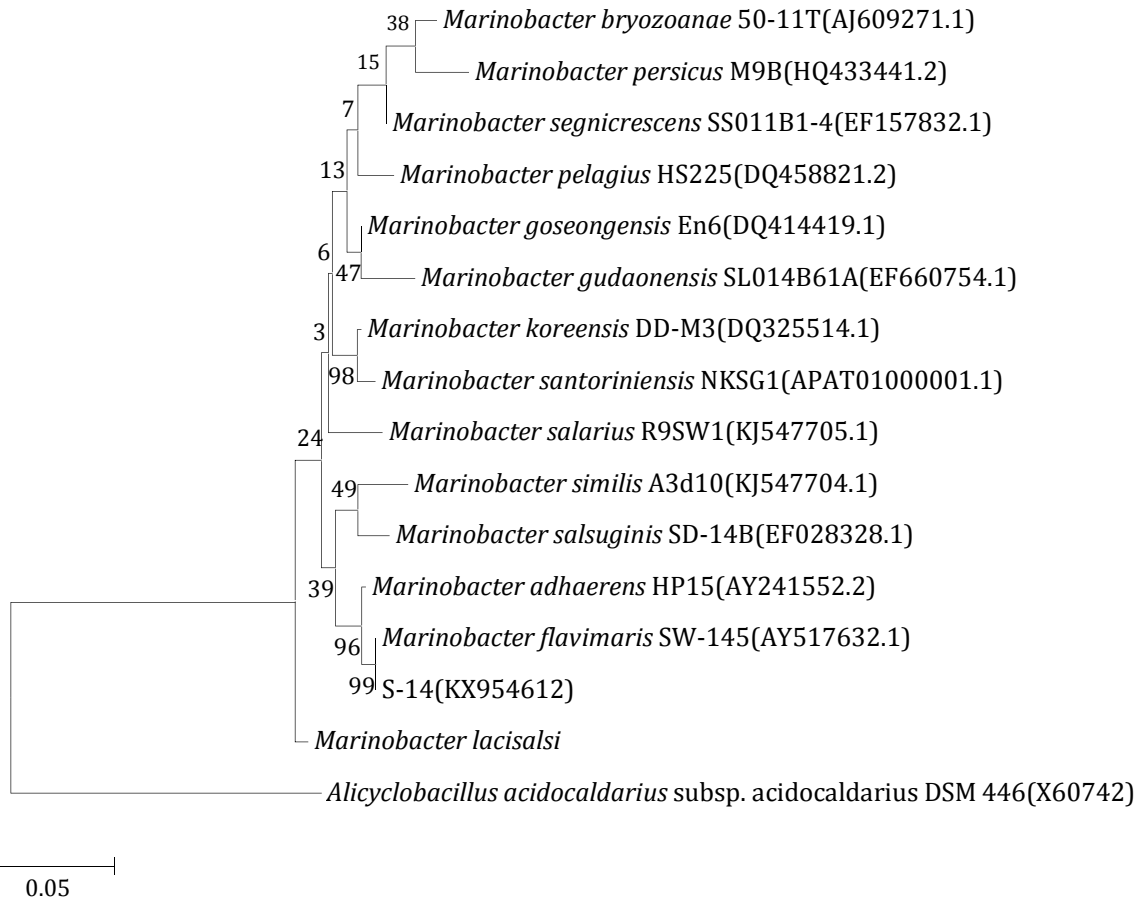
نمودار ۱) بررسی رشد جدایه S-14 در دماهای مختلف برای تعیین بهترین دمای رشد باکتری (سه تکرار)؛ متغیرهای دیگر آزمایش از جمله غلظت نمک و pH به‌ترتیب ۵% و ۷/۵ ثابت در نظر گرفته شدند



نمودار ۲) رشد جدایه S-14 در غلظت‌های مختلف نمک به‌منظور تعیین غلظت نمک بهینه (۳ تکرار)؛ دما و pH برای تعیین غلظت بهینه نمک به‌ترتیب ۳۵°C و ۷/۵ ثابت در نظر گرفته شدند



نمودار ۳) رشد جدایه S-14 در pHهای مختلف برای تعیین بهترین میزان اسیدیته محیط کشت برای رشد باکتری (سه تکرار)؛ غلظت نمک سدیم‌کلرید و دما به‌ترتیب ۵% و ۳۵°C در نظر گرفته شد



شکل ۲) دندروگرام *16S rRNA* باکتری ترادف‌یابی‌شده S-14 با قرابت نزدیکی به *مارینوباکتر فلاویماریس* (*Marinobacter flavimaris*) و تعیین توالی به روش اتصال- همسایگی و با استفاده از معیار بوت‌استرپ

بحث

پژوهش حاضر با هدف غربالگری و جداسازی باکتری هالوفیل مارینوباکتر (جدایه S-14) تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز از چشمه آب شور باداب‌سورت انجام شد. چشمه‌های اسرارآمیز باداب‌سورت اروست مشتمل بر سه چشمه با آب‌های کاملاً متفاوت از لحاظ رنگ، بو و مزه هستند. یکی از این چشمه‌ها دارای آبی بسیار شور است که به‌علت شوری زیاد و دارابودن املاح و مواد معدنی فراوان به هیچ عنوان در فصل زمستان یخ نمی‌زند. این چشمه از نظر زمین‌شناختی از نوع ژئوپارک محسوب می‌شود[10] و تاکنون هیچ پژوهشی از فلور میکروبی این منطقه با توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی گزارش نشده است.

پژوهش حاضر براساس روش‌های مبتنی بر کشت باکتری‌ها انجام گرفت و با توجه به سهم کوچک میکروارگانیزم‌های قابل کشت در جوامع میکروبی، بررسی نتایج تنها به میکروارگانیزم‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری قابل کشت محدود می‌شود. همان گونه که اشاره شد، باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، به‌دلیل دارابودن ویژگی‌های خاص و رشد در شرایط نامتعارف، اهمیت زیادی در فرآیندهای صنعتی و زیست‌فناوری دارند[1, 5]. اگر چه مطالعات بسیار محدودی روی تولید آنزیم‌های خارج‌سلولی باکتری‌های هالوفیل انجام شده است، اما عموماً این آنزیم‌ها به‌دلیل محتوای بالای اسیدهای آمینه، در شرایط سخت و غلظت‌های بالای نمک، فعال و قادر به کاتالیز واکنش‌های شیمیایی هستند[24, 25]. آنزیم لیپاز از جمله آنزیم‌های صنعتی است که امروزه جایگاه ویژه‌ای در تجارت جهانی آنزیم‌ها به‌عنوان بیوکاتالیست به خود اختصاص داده است. شرایط ویژه راکتورهای صنعتی نظیر غلظت‌های نمک بالا، pH اسیدی یا قلیایی و دمای زیاد موجب می‌شود تا کاتالیست‌ها ساختار و عملکرد خود را از دست بدهند. تجدید دوباره بیوکاتالیست‌ها در این فرآیندها از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیست، لذا جداسازی میکروارگانیزم‌هایی که قادر به رشد و تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج‌سلولی هستند، از منابع نامحدود طبیعی بااهمیت است[4, 26].

برای جداسازی بیشترین تنوع گونه‌های باکتریایی در روش‌های مبتنی بر کشت از محیط‌های کشت متنوع، رقت‌های متوالی و همچنین گرمخانه‌گذاری‌های طولانی‌مدت استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر از دو محیط کشت MH و SWN با قدرت اسیدیته متفاوت به‌منظور جداسازی تنوع وسیع‌تری از میکروارگانیزم‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری استفاده شد که نتایج حاصل از غربالگری این پژوهش با نتایج پژوهش‌های قبلی در جداسازی تنوع گسترده‌تر جنس‌های مختلف همسویی داشت[27, 28]. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، درصد بالایی از سویه‌ها دارای شکل میکروسکوپی میله‌ای و گرم‌منفی بودند که با نتایج حاصل از پژوهش‌های مشابه روی دریاچه ارومیه، اینچه‌برون و آران و بیدگل تفاوت داشت. این تفاوت‌ها را می‌توان به ویژگی‌های متفاوت زیستگاه‌ها نسبت داد که در تعیین و میزان عیار زیستی هر منطقه تاثیرگذار بوده است و تنوع زیستی هر منطقه را منحصربه‌فرد می‌کند[9, 12, 29]. همچنین باسیل‌های گرم‌منفی مطالعه‌شده در این

تحقیق عموماً به شکل سلول‌های ویبریوفرم و مارپیچی بودند که این نتایج از نظر فراوانی و اشکال خمیده با نتایج مطالعه مشابهی که توسط *گوزلان* و همکاران در مصر صورت گرفته است، همخوانی داشت[30].

براساس هیدرولیز توئین ۸۰، از پنج جدایه تولیدکننده آنزیم خارج‌سلولی لیپاز، جدایه S-14 به‌عنوان جدایه منتخب برای PCR انتخاب شد که پس از آنالیز ژن *16S rDNA* مشخص شد که این جدایه متعلق به جنس *مارینوباکتر* بود. براساس مقایسه جدایه S-14 با پژوهش *باقری* و همکاران روی باکتری *مارینوباکتر پرسیکوس* سویه M9B از دریاچه نمک آران و بیدگل، این جنس از نظر مورفولوژیک، گرم‌منفی، میله‌ای، هوازی و جزء باکتری‌های هالوفیل میانه‌دوست بوده است[31] که منطبق بر یافته‌های پژوهش حاضر بود.

جدایه S-14 با گونه‌های جنس مارینوباکتر شامل *مارینوباکتر هالوفیلووس* سویه XCD-X12 [32]، *مارینوباکتر پرسیکوس* سویه M9B [31]، *مارینوباکتر لوتائونسیس* سویه T5054 [33]، *مارینوباکتر آنتارکتیکوس* سویه ZS2-30 [34]، *مارینوباکتر سالاریس* سویه R9SW1 و *مارینوباکتر سیمیلیس* مقایسه شدند. با توجه به یافته‌های *نگ* و همکاران که روی *مارینوباکتر سلاریوس* (*Marinobacter slarius*) سویه R9SW1 و *مارینوباکتر سیمیلیس* سویه A3d10 انجام داده‌اند، این سویه‌ها متحرک، دارای یک فیلاژل قطبی و کلنی‌های آنها فاقد پیگمان‌های رنگی بوده و از نظر تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز و اکسیداز، مثبت و همچنین قادر به هیدرولیز توئین ۸۰ بوده‌اند[35] که در مقایسه، جدایه S-14 فاقد حرکت، دارای کلنی‌هایی با پیگمان کرم‌رنگ، کاتالاز و اکسیداز مثبت و قادر به هیدرولیز توئین ۸۰ بود که تفاوت‌های جزئی موجود در این دو پژوهش را می‌توان با توجه به تفاوت موجود در گونه‌های مختلف باکتری‌های جنس مارینوباکتر تفسیر نمود. پژوهشی روی جداسازی باکتری *مارینوباکتر لوتائونسیس* سویه T5054 در تایوان، شرایط بهینه رشد شامل غلظت نمک، pH و دمای بهینه رشد با شرایط بهینه رشد را برای جدایه S-14 نشان داده است. جدایه فوق از نظر غلظت بهینه نمک مورد نیاز و pH بهینه به‌ترتیب با ۵-۲/۵% غلظت سدیم‌کلرید و اسیدیته ۷ با پژوهش *شیه* و همکاران همخوانی داشت. همچنین دمای بهینه رشد جدایه S-14، ۳۵°C گزارش شد که با نتایج حاصل از پژوهش فوق[33] مغایرت داشت و این مساله را می‌توان به تفاوت در شرایط مکان جداسازی نسبت داد.

از جمله محدودیت‌های مطالعه پیش رو می‌توان به عدم دردسترس‌بودن منابع کربن و پساب‌های روغنی مختلف برای تجزیه آنزیمی توسط جدایه S-14 اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود آنزیم لیپاز جدایه مورد نظر تخلیص شود و شرایط بهینه فعالیت آن مورد بررسی قرار گیرد. همچنین ژن کدکننده این آنزیم برای انتقال از طریق مهندسی ژنتیک به یک میزبان مناسب مطالعه شود. پیشنهاد می‌شود تثبیت سلول و آنزیم تخلیص‌شده از این جدایه به‌منظور بررسی تغییرات فعالیت آنزیم در شرایط بهینه مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

جدایه S-14، تولیدکننده مناسبی برای آنزیم خارج‌سلولی لیپاز است و می‌تواند از فروکتوز و اسیدآمینه فنیل‌آلانین به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کند.

تشکر و قدردانی: نگارندگان این مقاله از انستیتو پاستور ایران مرکز تحقیقات شمال کشور، جناب آقای دکتر *جعفری*، جناب آقای دکتر *آشکاران* و جناب آقای دکتر *محسنی* (دانشگاه مازندران) برای کمک‌های فنی و اجرایی تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از جناب آقای *عباس‌زاده*، *صفری* و خانم *دهقان* برای حمایت‌های بی‌دریغشان نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

تاییدیه اخلاقی: پژوهش حاضر حاصل مطالعه روی باکتری‌ها بود که نیازی به تاییدیه اخلاقی ندارد.

تعارض منافع: در انتشار این مقاله هیچ تعارض منافع میان نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: لیلا ستاری‌فقیهی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)؛ سلمان احمدی‌اسب‌چین (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)؛ باقر سیدعلیپور (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)؛ غلامحسین ریاضی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)

منابع مالی: این پژوهش هیچ حمایت مالی از نهاد یا موسسه خاصی دریافت نکرده است.

منابع

1- Ventosa A, Nieto JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World J Microbiol Biotechnol. 1995;11(1):85-94.

2- Delgado-García M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-González CN, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. J Sci Food Agric. 2012;92(13):2575-80.

3- Çalımlıoğlu B, Arga KY. Proteins from halophilic bacteria: Purification and their applications. In: Iconcept Press. Protein purification: Principles and trends. Hong Kong: iConcept Press; 2014.

4- Pérez D, Martín S, Fernández-Lorente G, Filice M, Guisán JM, Ventosa A, et al. A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). PLoS One. 2011;6(8):e23325.

5- Schreck SD, Grunden AM. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(3):1011-21.

6- Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64(6):763-81.

7- Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. Process Biochem. 1995;30(5):393-401.

8- Uratani JM, Kumaraswamy R, Rodríguez J. A systematic strain selection approach for halotolerant and halophilic bioprocess development: A review. Extremophiles. 2014;18(4):629-39.

9- Babavalian H, Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Moosazadeh Moghaddam M, Shakeri F. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. Microbiology. 2013;82(4):466-74.

10- Abdolmalaki AY. Study on the role of cultural, social activities urban tourism developmonet (Case study of tourism in Sari city). 1st National Conference of

taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. J Gen Microbiol. 1982;128:1959-68.
24- Zanjirband M, Kasra Kermanshahi R, Golbang N. Isolation of moderately halophilic indigenous bacterial strains producing salt-tolerant exteracellular hydrolytic enzymes, the effect of NaCl salt on enzyme production. Iran J Biol. 2009;22(3):490-7. [Persian]
25- Hough DW, Danson MJ. Extremozymes. Curr Opin Chem Boil. 1999;3(1):39-46.
26- Amoozegar MA, Salehghamari E, Khajeh K, Kabiri M, Naddaf S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, Salinivibrio sp. strain SA-2. J Basic Microbiol. 2008;48(3):160-7.
27- Schut F, De Vries EJ, Gottschal JC, Robertson BR, Harder W, Prins RA, et al. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: Growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. Appl Environ Microbiol. 1993;59(7):2150-60.
28- Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. Appl Environ Microbiol. 1993;59(3):881-91.
29- Zarparvar P, Amoozegar MA, Fallahian MR. Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in Incheh Boroun hyper saline wetland in Iran. J Cell Mol Res. 2014;27(1):44-56. [Persian]
30- Ghozlan H, Deif H, Kandil RA, Sabry S. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. J Gen Appl Microbiol. 2006;52(2):63-72.
31- Bagheri M, Amoozegar MA, Didari M, Makhdoumi Kakhki A, Schumann P, Spröer C, et al. Marinobacter persicus sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a saline lake in Iran. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013;104(1):47-54.
32- Zhong ZP, Liu Y, Liu HC, Wang F, Zhou YG, Liu ZP. Marinobacter halophilus sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(9):2838-45.
33- Shieh WY, Jean WD, Lin YT, Tseng M. Marinobacter lutaoensis sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. Can J Microbiol. 2003;49(4):244-52.
34- Liu C, Chen CX, Zhang XY, Yu Y, Liu A, Li GW, et al. Marinobacter antarcticus sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from Antarctic intertidal sandy sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(Pt 8):1838-44.
35- Ng HJ, López-Pérez M, Webb HK, Gomez D, Sawabe T, Ryan J, et al. Marinobacter salarius sp. nov. and Marinobacter similis sp. nov., isolated from sea water. PLoS One. 2014;9(9):e106514.
Urbanism, Urban Management and Sustainable Development. Tehran: Iranian Architecture Center; 2015. [Persian]
11- Biswas J, Paul AK. Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated from solar salterns. Int J Appl Biol Pharm Technol. 2013;4(4):30-6.
12- Mehrshad M, Amoozegar MA, Yakhchali B, Shahzedeh Fazeli SA. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the Western coastal line of Urmia lake. Biol J Microorg. 2012;1(2):49-70. [Persian]
13- Coico R. Emerging Technologies. Curr Protoc Microbiol. 2008;11(1):1.0.1-1.0.4
14- Jayachandra SY, Anil Kumar S, Merley DP, Sulochana MB. Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium Salinicoccus sp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. Recent Res Sci Technol. 2012;4(4):46-9.
15- Karbalaei Heidari HR, Ziaee AA, Schaller J, Amoozegar MA. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, Salinivibrio sp. strain AF-2004. Enzyme Microb Technol. 2007;40(4):266-72.
16- Ardakani MR, Poshtkouhian A, Amoozegar MA, Zolgharnein H. Isolation of moderately halophilic pseudoalteromonas producing extracellular hydrolytic enzymes from Persian Gulf. Indian J Microbiol. 2012;52(1):94-8.
17- Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J Bacteriol. 1957;73(4):590-1.
18- Allais JJ, Kammoun S, Blanc P, Girard C, Baratti JC. Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. Appl Environ Microbiol. 1986;52(5):1086-90.
19- Shaikh SA, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: Their contribution to basic and applied research. World J Microbiol Biotechnol. 1993;9(4):468-75.
20- Govender L, Naidoo L, Setati ME. Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic Nesterenkonia sp.. Afr J Biotechnol. 2009;8(20):5458-66.
21- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(Pt 3):716-21.
22- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-9.
23- Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical