فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

غربالگری اکتینوباکترهای نمک دوست دریایی ترشح کننده آنزیم لیپاز از رسوبات آلوده به روغن دریاچه نمک ارومیه

راضیه ساداتی[۱]، نیما شیخ بیگلو[۲]*، رسول شکری[۳]

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۰

چکیده

در این مطالعه گونه‌های اکتینوباکتر تولید کننده لیپاز از محل‌های آلوده به روغن دریاچه نمک ارومیه جدا شدند. تمام سویه‌های اکتینوباکتر به منظور تعیین فعالیت لیپازی با استفاده از دو سوبسترای لیپیدی Tween-20 و روغن زیتون مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA، سویه‌های جدا شده با بررسی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. شش گونه اکتینوباکتر نمک دوست با عناوین LUG03، LUS05، LUG09، LUN15، LUG21 و LUB22 از رسوبات نمک دریاچه ارومیه (بندر شرفخانه) جدا شد که چهار گونه از آن‌ها فعالیت لیپولیتیک مناسبی داشتند و از این میان سویه LUS05 دارای بیشترین فعالیت لیپولیتیک بود. تعیین توالی ژن 16S rRNA مشخص کرد که جدایه‌ها متعلق به گونه‌های *Streptomyces* sp.، *Nocardiopsis* sp.، *Glutamicibacter* sp. و *Brachybacterium* sp. بودند.

واژگان کلیدی: *اکتینوباکترهای نمک دوست، لیپاز، دریاچه ارومیه.*

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
* نویسنده مسئول: n.baygloo@urmia.ac.ir

مقدمه

آلودگی روغنی یکی از مشکلات رایج در کشورهای توسعه یافته و صنعتی است. از منابع عمده آلودگی روغن می‌توان به نشت پساب روغنی فاضلاب‌های صنعتی، کارخانجات فرآوری روغن گیاهی و کارخانه‌های لبنیات اشاره کرد که علاوه بر ایجاد مشکلات پیچیده‌ای مانند گرفتگی و مسدود شدن شبکه‌های آب‌رسانی و لوله‌های فاضلاب، سهم بسزایی در آلودگی محیط زیست دارند. اگرچه استفاده از تکنولوژی‌های سازگار با محیط زیست و سیستم‌های با صرفه اقتصادی می‌تواند در امر حذف و تجزیه آلودگی روغنی موثر باشد (Gopinath et al., 2013)، با این حال، شاخص‌های متعددی از جمله ویژگی محلی که آلودگی روغن در آن رخ می‌دهد، دما و pH محیط و همچنین میزان مشارکت میکروبی در حذف این آلودگی نقش دارند. با توجه به حضور تنوع گسترده‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها در محیط‌های آلوده به روغن، یکی از روش‌های مطلوب برای حذف آلودگی روغنی تجزیه میکروبی است (Jensen, 1975; Essien et al., 2000).

اکتینوباکترها باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت با میزان G+C بالا در DNA خود هستند که گسترده‌ترین گروه از میکروارگانیسم‌ها در طبیعت به شمار می‌روند (Jenifer et al., 2013). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود اکتینوباکترها در محیط‌های پرنمک گوناگون از جمله دریاچه‌های نمکی، معادن استخراج نمک، رسوبات دریا و زیستگاه‌های نمکی قلیایی وجود دارد. به طوری که در سال‌های اخیر مطالعه فیزیولوژی اکتینوباکترهای نمک دوست یا تحمل کننده نمک توجه پژوهشگران را در سراسر دنیا به خود جلب کرده است (Phillips et al., 2012; Jose and Jebakumar, 2014). آن‌ها به میزان زیادی با غلظت بالای NaCl و pH قلیایی سازگار هستند که این امر باعث شده با تولید آنزیم‌های صنعتی ارزشمند، به عنوان کاتالیزور در فرایند تجزیه زیستی و فرایندهای بیوسنتزی دیگر عمل کنند (Oren, 2010; Jenifer et al., 2013). در میان اکتینوباکترها گونه‌های جنس *Streptomyces* به دلیل توانایی تولید آنزیم‌های متعدد از جمله پروتئاز، آمیلاز، لیپاز، پکتیناز، سلولاز، گزیلاناز و گلوتامیناز، میکروارگانیسم‌های بسیار مفیدی در صنعت به شمار می‌روند (Al-Dhabi et al., 2020).

یکی از مرسوم‌ترین آنزیم‌های ترشح شده خارج سلولی توسط اکتینوباکترهای نمک دوست ساکن در محیط‌های روغنی، لیپاز است. لیپازها یا تری‌آسیل گلیسرول آسیل هیدرولازها (E.C.3.1.1.3) آنزیم‌هایی هستند که هیدرولیز پیوندهای استری را در چربی‌ها و روغن‌ها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد کاتالیز می‌کنند (Hasan et al., 2006; Treichel et al., 2010). توانایی لیپازها در واکنش‌های کاتالیزی در دامنه وسیعی از سوبستراها بدون اضافه کردن کوفاکتورهای گران قیمت و پایداری آن‌ها در حلال‌های آلی سبب شده است که این آنزیم‌ها به عنوان سومین گروه بزرگ آنزیم‌های تجاری بعد از پروتئاز و کربوهیدرازها به شمار آیند. لیپازها که به طور مرسوم در صنایع غذایی، صنعت کاغذ، زمینه‌های پزشکی و همچنین مواد شوینده مورد استفاده قرار می‌گیرند، توسط گونه‌های مختلفی از جانوران، گیاهان، باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند (Hasan et al., 2006; Nagarajan, 2012). با این حال، لیپاز جدا شده از اکتینوباکترهای نمک دوست به دلیل فعالیت بهینه در شرایط قلیایی به طور ویژه‌ای مورد توجه هستند. به دلیل کاربردهای متنوع لیپازها در بیوتکنولوژی، تقاضا برای غربالگری و شناسایی اکتینوباکترهای لیپولیتیک با توانایی بالا در تجزیه زیستی پساب‌های روغنی ادامه دارد.

مناطق بکر با میزان نمک زیاد، مناطقی با شرایط بسیار نزدیک به محیط‌های دریایی، مناطق با سطح افزایش یافته pH و اکسیژن کم، محل‌های مناسبی برای جداسازی اکتینوباکترهای نمک دوست هستند (Arasu et al., 2016). از این رو در این مطالعه سه ناحیه در سواحل غربی دریاچه ارومیه (بندر شرفخانه) برای غربالگری و شناسایی اکتینوباکترهای نمک دوست با توانایی تولید آنزیم لیپاز انتخاب شد که دارای رسوبات لجنی آغشته به روغن بودند.

مواد و روش‌ها

محل نمونه‌برداری

دریاچه نمک ارومیه (N ′۳۲ °۳۷ و E ′۴۳ °۴۵) در شمال غربی ایران، یکی از بزرگ‌ترین دریاچه‌های دائمی فوق شور در جهان است که متوسط شوری آن در حدود ۲۲۰ تا ۳۰۰ گرم در لیتر بسته به شرایط محل و زمان متفاوت است. به منظور جداسازی اکتینوباکترهای نمک دوست، رسوبات آغشته به پساب روغنی از سه ناحیه در سواحل شمال شرقی دریاچه ارومیه (بندر شرفخانه) و از

عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری در ظروف استریل جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ارومیه، بلافاصله آزمایش‌های مربوط به جداسازی اکتینوباکترها انجام شد (جدول ۱). مختصات محل‌های نمونه‌برداری با استفاده از GPS ثبت شد و بررسی مولفه‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد آزمایش آب و فاضلاب انجام شد (Baird et al., 2017). شاخص‌های دما و pH نمونه‌ها در محل نمونه‌گیری با استفاده از دماسنج و pHمتر قابل حمل (Hach، آلمان) اندازه‌گیری شد (Lee et al., 2014). سنجش میزان بی‌کربنات، سدیم، کلسیم، منزیم و کلر به روش تیتراسیون و بررسی سولفات با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (DR 2000، Hach، آلمان) انجام شد.

جداسازی اکتینوباکترها از رسوبات روغنی دریاچه نمک ارومیه

جداسازی انتخابی اکتینوباکترها به این صورت انجام شد که در ابتدا یک گرم از هر نمونه رسوب در ۹ میلی‌لیتر نمک فیزیولوژی به طور کامل حل شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد (Abdelfattah et al., 2016). بعد از تهیه رقت سریالی، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در محیط مایع SCB (Starch Casein Broth) (با ترکیبات نشاسته محلول ۱۰ گرم در لیتر، کازیین ۰/۳ گرم در لیتر، نیترات پتاسیم ۲ گرم در لیتر، سولفید منیزیم ۷ آبه ۰/۰۵ گرم در لیتر، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۲ گرم در لیتر، کربنات کلسیم ۰/۰۲ گرم در لیتر، سولفید آهن ۷ آبه ۰/۰۱ گرم در لیتر) حاوی ۱ درصد روغن

جدول ۱: اطلاعات مربوط به نمونه‌برداری از سه ناحیه مختلف در سواحل بندر شرفخانه (قسمت شمال شرقی دریاچه ارومیه)

محل‌های نمونه‌برداری	مختصات محل	ویژگی نمونه‌ها	عمق نمونه‌برداری (cm)
بندر شرفخانه Sh1	۴۵°۲۶′۰۸″E ۳۸°۱۰′۰۹″N	لجن سیاه	۱۵
بندر شرفخانه Sh1	۴۵°۲۶′۰۸″E ۳۸°۱۰′۰۹″N	لجن سیاه	۱۸
بندر شرفخانه Sh2	۴۵°۲۵′۳۷″E ۳۸°۰۸′۲۲″N	رسوب چسبناک	۱۰
بندر شرفخانه Sh2	۴۵°۲۵′۳۷″E ۳۸°۰۸′۲۲″N	رسوب چسبناک	۱۰
بندر شرفخانه Sh3	۴۵°۲۷′۱۸″E ۳۸°۱۰′۲۴″N	لجن سیاه چسبناک	۱۰

زیتون تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار (Memmert، آلمان) به مدت ۱۴-۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

پس از طی دوره انکوباسیون کشت‌های غنی شده به منظور جداسازی کلنی‌های تک بر روی محیط SCA حاوی ۱/۵ درصد آگار منتقل شدند (Malviya et al., 2014; Das et al., 2018; Palla et al., 2018). لازم به ذکر است به منظور جداسازی، بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و ارزیابی آنزیم لیپاز سویه‌های اکتینوباکتر، ۱/۵ درصد NaCl به تمام محیط‌های کشت افزوده شد.

شناسایی اکتینوباکترهای تولید کننده لیپاز

پس از رشد خالص جدایه‌های اکتینوباکتر، باکتری‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط SCB و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰۰rpm انکوبه شدند. سپس کلنی‌ها با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی گرم و میکروسکوپ نوری (CW43، Olympus، ژاپن) بررسی شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی سویه‌ها مانند سرعت رشد، رنگ میسیلیوم و تشکیل پیگمان بر روی چهار محیط ISP-2 (Ibresco، ایتالیا)، R2A Agar (Merck، آلمان)، NA (Merck، آلمان) و SCA مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفتند (Claverias et al., 2015; Palla et al., 2018). برای شناسایی اکتینوباکترها ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌ها مانند اکسیداز، کاتالاز، اندول، سیترات، اوره‌آز، هیدرولیز کازئین و نشاسته و همین طور استفاده از منبع کربن (گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، سوکروز) مورد ارزیابی قرار گرفتند. رشد بهینه اکتینوباکترها در دامنه‌های مختلف pH (محدوده ۱۲-۵ با حد فاصل یک واحد pH) و NaCl (محدوده ۲۵-۰ درصد با حد فاصل ۲ درصد) با استفاده از محیط Tryptic Soy Broth (TSB) مشخص شد (Lee et al., 2014; Law et al., 2017).

غربالگری تولید لیپاز میکروبی توسط جدایه‌ها با استفاده از سوبستراهای مختلف

غربالگری کلنی‌های خالص اکتینوباکترها برای بررسی توانایی آن‌ها در تولید آنزیم لیپاز با استفاده از محیط جامد و سوبستراهای Tween-20 و روغن زیتون به همراه فنل رد انجام شد. این روش غربالگری به دلیل دشواری تعیین فعالیت لیپولیتیک با روش‌های دیگر انتخاب شد و فعالیت آنزیمی مربوطه بر اساس ارزیابی چشمی و سنجش تشکیل رسوب یا تغییر رنگ در اطراف کلنی روی سطح آگار شناسایی شد (Oren, 2010; Lee et al., 2014).

روش بررسی آنزیم لیپولیتیک با استفاده از روغن زیتون و فنل‌رد آگار

محیط فنل رد آگار (Phenol Red Agar) با ترکیبات فنل‌رد (۰/۱ درصد، W/V)، روغن زیتون (۰/۱ درصد، V/V)، کلرید کلسیم (۰/۱ درصد، W/V) و آگار (۲ درصد، W/V) تهیه شد. این روش بر این اصل استوار است که کاهش اندک در pH از ۷/۳ به سمت اسیدی شدن منجر به تغییر رنگ از قرمز به زرد می‌شود. افزایش اسیدیته در نتیجه آزاد شدن اسیدهای چرب به دنبال لیپولیز است. نمونه‌های اکتینوباکتر در پلیت‌های فنل‌رد حاوی سوبسترای روغن زیتون کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در سویه‌های تولید کننده لیپاز تغییر در رنگ محیط کشت از قرمز به زرد به عنوان شاخصی برای فعالیت لیپاز در نظر گرفته شد (Singh et al., 2006; Lee et al., 2014; Ramnath et al., 2017).

روش بررسی آنزیم لیپولیتیک با استفاده از Tween-20 Agar

آزمایش ایجاد رسوب با استفاده از سوبسترای Tween 20 برای تایید فعالیت لیپولیتیک انجام شد. در این روش از محیط کشت حاوی پپتون (۱ درصد، W/V)، NaCl (۱/۵ درصد، W/V)، $CaCl_2.2H_2O$ (۰/۰۱ درصد، W/V)، Tween-20 (۱ درصد، V/V) و آگار (۲ درصد، W/V) طبق توصیف Ramnath و همکارانش (۲۰۱۷) استفاده شد. این روش بر اساس رسوب نمک کلسیم استوار است. هیدرولیز Tween منجر به آزاد شدن اسیدهای چرب شده که با کلسیم موجود در محیط کشت ترکیب می‌شود و کریستال‌های نامحلولی را در اطراف کلنی باکتری تشکیل می‌دهند. جدایه‌های اکتینوباکتر روی پلیت‌های Tween-20 Agar به صورت خطی در مرکز، کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. رسوب سفید رنگ اطراف کلنی به عنوان شاخص فعالیت لیپازی در نظر گرفته شد (Sakai et al., 2002; Gopinath et al., 2005; Ramnath et al., 2017).

استخراج DNA سویه‌های اکتینوباکتر

کشت‌های خالص جدایه‌های اکتینوباکتر روی محیط Tryptic Soy Broth (Merck، آلمان) در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰rpm به مدت ۴-۲ روز رشد داده شدند. برای استخراج DNA از روش توصیف شده توسط Das و همکارانش (۲۰۱۸) استفاده شد. میزان خلوص

DNA با استفاده از نانودرآپ (Bio-Rad، آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت و DNA استخراج شده تا زمان انجام مطالعات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های اکتینوباکتر

جدایه‌های اکتینوباکتر با بررسی توالی مربوط به ژن 16S rRNA شناسایی شدند. برای این منظور PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال 27F (5′-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3′) و 1492R (5′-GGTT ACCTTGTTACGACTT-3′) انجام شد (Das et al., 2018). حجم واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر و حاوی ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر، ۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۲/۵ واحد Smar Taq DNA Polymerase (CinnaGen، ایران) و آب دو بار تقطیر استریل بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems، آمریکا) و در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۷ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. محصولات تکثیر یافته توسط ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و سپس با استفاده از DNA Sequencer (3730XL، ABI، کره جنوبی) تعیین توالی شدند. در نهایت توالی‌های به دست آمده با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه داده‌های NCBI آنالیز شدند (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA-X رسم شد (Kumar et al., 2018).

نتایج

بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های رسوبات

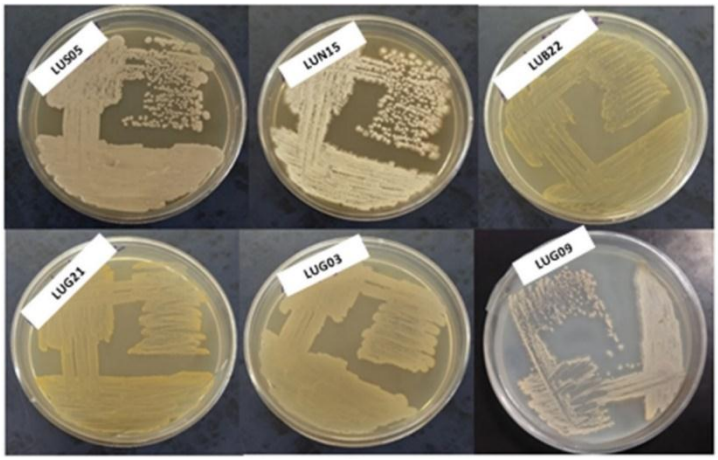
نتایج بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده از رسوبات سه ناحیه در ساحل بندر شرفخانه واقع در قسمت شمال شرقی دریاچه ارومیه در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که نمونه‌ها دارای pH ۷/۳±۰/۲ بودند و دمای آن‌ها در دامنه ۱۲ تا ۱۹ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. بررسی شیمیایی نمونه‌ها نیز نتایج تقریبا مشابهی با هم داشت (جدول ۲).

جدول ۲: ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده از سواحل بندر شرفخانه (قسمت شمال شرقی دریاچه ارومیه)

شاخص	غلظت یونی ($g.L^{-1}$)
Na^{+}	۹۱/۹
Cl^{-}	۱۷۵/۵
Mg^{2+}	۳۹/۲۶
Ca^{2+}	۰/۴۰
HCO_3^{-}	۰/۲۶
SO_4^{-2}	۰/۵۰

شناسایی اکتینوباکترهای تولید کننده لیپاز بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

در این مطالعه شش اکتینوباکتر از رسوبات دریاچه نمک ارومیه توسط محیط کشت‌های مختلف جدا شدند و شناسایی اولیه جدایه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت. اکتینوباکترهای جدا شده همگی گرم مثبت، هوازی و فاقد تحرک بودند. بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشخص کرد که باکتری‌ها بر روی دو محیط کشت SCA و R2A Agar رشد بهتری داشتند و پیگمان‌های قابل تشخیصی نسبت به محیط‌های دیگر تشکیل دادند (شکل ۱). اکتینوباکترها پس از گذشت حداقل ۵ روز بر روی محیط SCA دارای شکل و رنگ کلنی متفاوتی بودند. دامنه دمایی برای رشد جدایه‌ها ۴۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (رشد بهینه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد یا بالاتر از آن هیچ رشدی نداشتند و از این رو مزوفیل در نظر گرفته شدند (جدول ۳).



شکل ۱: بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های اکتینوباکتر بر روی محیط SCA

جدول ۳: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بیوشیمیایی جدایه‌های اکتینوباکتر

ویژگی‌ها	LUS05	LUN15	LUG03	LUG21	LUG09	LUB22
ریخت‌شناسی	رشته‌ای	رشته‌ای	میله‌ای کوتاه	میله‌ای کوتاه	میله‌ای کوتاه	میله‌ای بلند
رنگ پیگمان	پودری خاکستری	پودری سفید	براق کرم	براق زرد	براق کرم	براق زرد
محدوده NaCl (٪ W/V)	۱–۱۰	۱–۱۰	۱–۱۰	۱–۱۰	۱–۱۰	۱–۱۰
غلظت بهینه NaCl (٪ W/V)	۳	۳	۵	۵	۳	۵
محدوده دما (°C)	۲۰–۴۰	۲۰–۴۰	۲۰–۴۵	۲۰–۴۵	۲۰–۴۵	۲۰–۴۵
دمای بهینه (°C)	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
محدوده pH	۶–۹	۶–۹	۶–۸	۶–۸	۶–۸	۶–۸
pH بهینه	۹	۸	۸	۸	۸	۸
اکسیداز	–	–	–	–	+	+
سیترات	+	+	+	–	–	+
کاتالاز	+	–	–	+	+	+
اوره آز	+	–	–	–	–	–
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	–	–	+
استفاده از منبع کربن						
گلوکز	–	–	+	+	+	+
لاکتوز	+	+	+	+	+	+
سوکروز	+	–	+	+	+	+

همچنین رشد بهینه باکتری ها در pH ۸-۹ و NaCl با غلظت ۵-۳ درصد رخ داد که می‌توان آن‌ها را در گروه نمک دوست‌ها با ویژگی قلیادوستی متوسط طبقه‌بندی کرد. چرا که سویه‌های جدا شده در عدم حضور نمک تقریبا رشد نکردند. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، اندول، سیترات، هیدرولیز کازئین و نشاسته و استفاده از قندهای مختلف به عنوان منبع کربن در جدول ۳ آورده شده است.

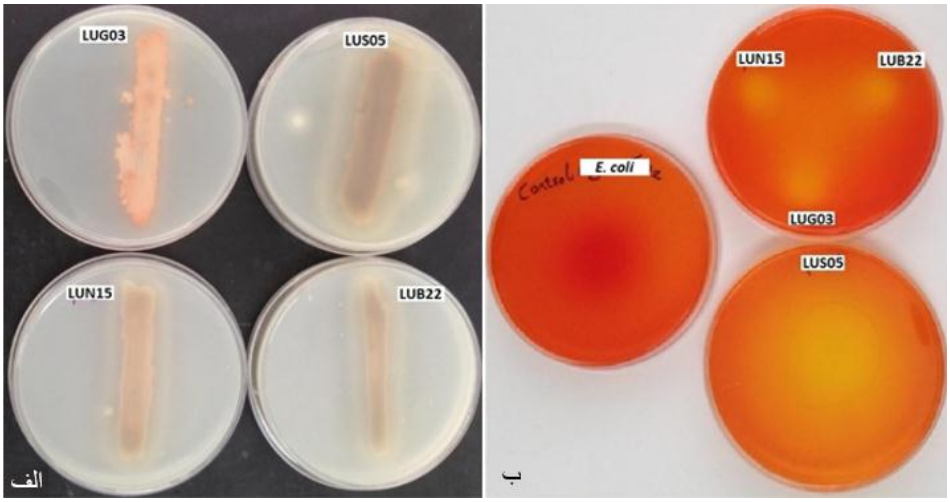
بررسی کیفی فعالیت لیپازی

در این بررسی از شش اکتینوباکتر جدا شده، چهار جدایه LUS05، LUN15، LUG03 و

LUB22 رسوب کلسیم قابل توجهی را در اطراف کلنی‌ها نشان دادند که به عنوان شاخص فعالیت لیپولیتیک در نظر گرفته شد (شکل ۲- الف). اندازه‌گیری قطر ناحیه رسوب در اطراف کلنی‌ها نشان داد که جدایه LUS05 با قطر ۵/۷ سانتی‌متری بیشترین فعالیت لیپولیتیک را داشت. در صورتی که قطر ناحیه رسوب در جدایه‌های LUN15، LUG03 و LUB22 به ترتیب ۳/۷، ۲/۵ و ۳/۵ سانتی‌متر بود. بر اساس آزمایش فنل‌رد که برای تایید بیشتر فعالیت لیپولیتیک انجام گرفت، فعالیت لیپولیتیک این چهار جدایه اکتینوباکتر تایید شد (شکل ۲- ب).

شناسایی مولکولی اکتینوباکترهای ترشح کننده لیپاز خارج سلولی

ویژگی مولکولی اکتینوباکترهای جدا شده از قسمت‌های مختلف بندر شرفخانه (ناحیه شمال شرقی دریاچه ارومیه) بر اساس توالی ژن 16S rRNA نشان داد که باکتری‌های LUG21، LUG09 و LUG03 متعلق به جنس *Glutamicibacter*، LUB22 متعلق به جنس *Brachybacterium*، LUN15 متعلق به جنس *Nocardiopsis* و باکتری LUS05 متعلق به جنس *Streptomyces* بودند.



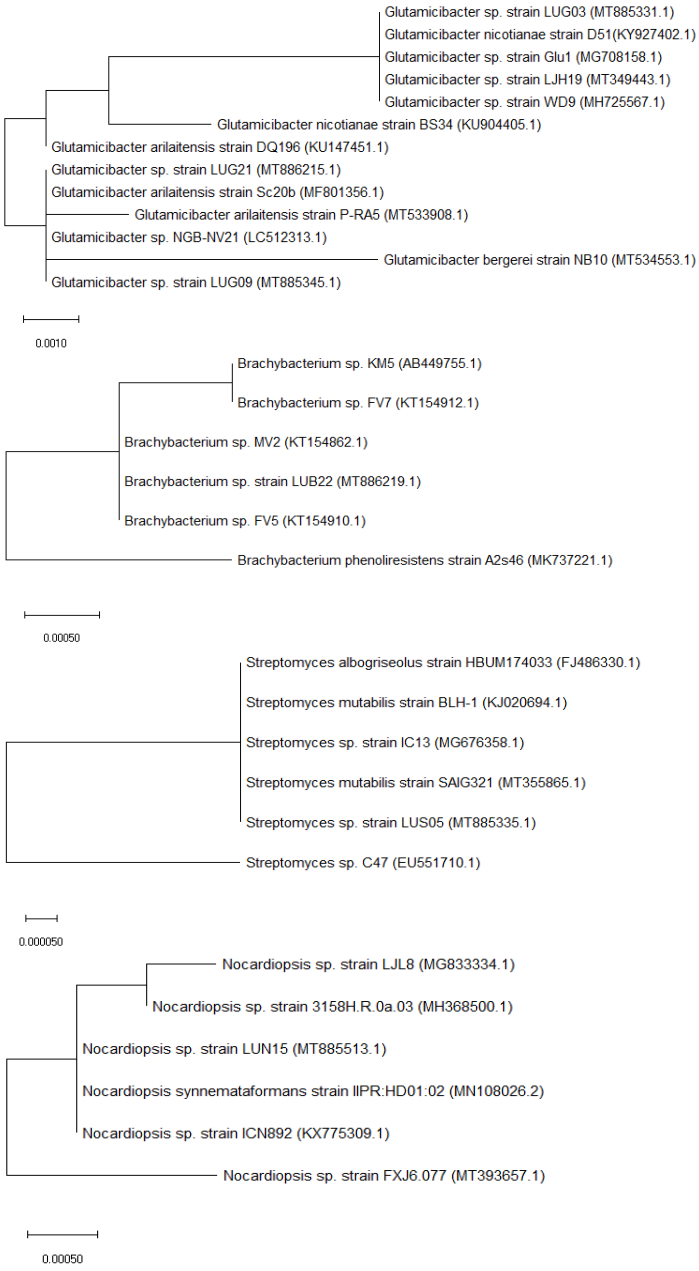
شکل ۲: بررسی کیفی فعالیت لیپازی. الف) غربالگری تولید لیپاز میکروبی بر روی پلیت آگار حاوی Tween-20 به عنوان سوبسترا. ب) غربالگری تولید لیپاز میکروبی بر روی پلیت آگار حاوی روغن زیتون به عنوان سوبسترا با فنل رد. شاهد منفی باکتری *Escherichia coli* است.

توالی 16S rDNA جدایه‌های LUG03، LUS05، LUG09، LUN15، LUG21 و LUB22 به ترتیب با شماره‌های MT885331، MT885335، MT885345، MT885513، MT886215 و MT886219 در پایگاه داده‌های NCBI قابل دسترسی هستند. در این مطالعه نتایج به دست آمده از آنالیز BLAST نشان داد که تمامی اکتینوباکترهای شناسایی شده دارای همانندی ۱۰۰ درصدی با بعضی از سویه‌های جنس مربوطه در توالی نوکلئوتیدی مورد نظر بودند. ارتباطات فیلوژنتیکی اکتینوباکترهای به دست آمده در این مطالعه با چندین سویه از جنس‌های مربوطه، بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rRNA در شکل ۳ نشان داده شده است که توالی‌های با ۱۰۰ درصد همانندی در یک دسته قرار گرفته‌اند.

بحث

جداسازی میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تولید آنزیم لیپاز به جهت داشتن کاربردهای متعدد در فرایندهای بیوتکنولوژی از جمله صنایع شوینده، صنایع نساجی، صنایع لبنیات، فرآوری روغن و تولید سورفکتانت توجه زیادی را به خود جلب کرده است. میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها می‌توانند آنزیم‌های لیپولیتیک را روی سوبستراهای غیرمحلول آلی ترشح کنند (Arasu et al., 2016). با این حال، تاکنون تنها ۲۰ آنزیم میکروبی توسط صنایع مختلف به بهره‌برداری رسیده است. از این رو پژوهشگران در جستجوی سویه‌های میکروبی جدید از جمله اکتینوباکترها برای تولید آنزیم‌ها هستند. چرا که اکتینوباکترها به دلیل تولید و ترشح دامنه گسترده‌ای از آنزیم‌های هیدرولیتیک ایمن برای محیط زیست، دارای اهمیت قابل توجهی هستند (Mehnaz et al., 2017).

محل‌هایی با آلودگی روغنی منابع غنی از تجمعات میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هستند. در این مطالعه از محل‌هایی در ساحل بندر شرفخانه که دارای آلودگی به پساب روغنی بودند، تعداد ۶ باکتری جداسازی شد که تنها ۴ مورد قابلیت تولید لیپاز را داشتند.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی (Neighbor-Joining Tree) اکتینوباکترهای به دست آمده در این مطالعه *Glutamicibacter* sp. strain LUG03, LUG09, LUG21، *Streptomyces* sp. strain LUS05،

Nocardiopsis sp. strain LUN15 و _Brachybacterium_ sp. strain LUB22 و چندین سویه از جنس‌های مربوطه، بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rRNA و همانندی بیش از ۹۹ درصد (Bootstrap Replication: 1000). شماره‌های داخل پرانتز، شماره‌های دسترسی در GenBank هستند.

پس از انجام آزمایش گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی، نتایج بررسی ژن 16S rRNA نیز تایید کرد که جدایه‌ها متعلق به چهار جنس *Streptomyces*، *Nocardiopsis*، *Brachybacterium* و *Glutamicibacter* بودند. با انجام روش‌های غربالگری با استفاده از سوبستراهای مختلف Tween 20 و روغن زیتون مشخص شد که سویه *Streptomyces* sp. strain LUS05 بیشترین فعالیت لیپازی را در بین جدایه‌ها داشت. مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی از جمله شاخص‌های فیزیکوشیمیایی دما و pH و همچنین منبع کربن بر تولید لیپاز موثر است (Al-Dhabi et al., 2020). در این بررسی اکتینوباکترهای جداسازی شده از سواحل شمال شرقی دریاچه نمک ارومیه (بندر شرفخانه) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH قلیایی در محدوده ۹-۸ بیشترین فعالیت لیپولیتیک را داشتند. اگرچه pH مناسب برای اکثر باکتری‌های دارای توانایی تولید لیپاز در محدوده ۷ است، با این حال، بیشترین فعالیت لیپازی در pH بالاتر از ۷ نیز گزارش شده است. Ilesanmi و همکارانش (۲۰۲۰) که از خاک‌های آلوده موفق به جداسازی سویه‌های باکتریایی لیپولیتیک شدند، فعالیت بهینه باکتری‌ها را برای تولید آنزیم لیپاز در pH ۱۱ گزارش کردند.

لیپاز باکتریایی بیشتر به صورت خارج سلولی است و موثرترین شاخص در بیان فعالیت لیپولیتیک نیازمندی باکتری به منبع کربن است. از این رو، در این مطالعه از دو منبع مختلف Tween 20 و روغن زیتون استفاده شد. Tween 20 با اسیدهای چرب C12 و طول متوسط زنجیره، به عنوان سوبسترای بالقوه برای سنجش فعالیت لیپاز خاک در نظر گرفته می‌شود (Sakai et al., 2002; Ramnath et al., 2017). استفاده از Tweenها مورد انتقاد برخی از پژوهشگران است، چرا که احتمال هیدرولیز Tween توسط استرازها وجود دارد که می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب در روش غربالگری لیپاز شود. با این حال، Tween به دلیل قابلیت ترکیب شدن با محیط کشت و افزایش ارتباط بهینه بین سلول‌ها (و یا آنزیم‌ها) و سوبسترا هنوز هم به عنوان سوبسترای کاربردی لیپاز مورد استفاده قرار می‌گیرند

(Thomson et al., 1999). Tween 20 با این که تحریک کننده رشد باکتری نیست اما مشارکت مهمی در تولید آنزیم دارد. Rowe و Gilmour (۱۹۸۲) در گزارش خود اعلام کردند که در محیط حاوی Tween 20 بیشترین تولید لیپاز انجام شد و بنابراین Tween 20 را بهترین القاء کننده برای تولید لیپاز معرفی کردند. به همین ترتیب Espinosa و همکارانش (۱۹۹۰) دریافتند که Tween 20 بهترین القاکننده است و نشان دادند که اثر مضاعف Tween 20 به عنوان القا کننده قوی می‌تواند به دلیل شباهت ماهیت شیمیایی آن به برخی از سوبستراهای طبیعی چربی و یک سورفاکتانت باشد که باعث تحریک ترشح آنزیم می‌شود. القا لیپازها توسط Tween 20 برای سویه‌هایی از *Bacillus* نیز گزارش شده است. همچنین در مطالعه‌ای Rathi و همکارانش (۲۰۰۲) گزارش کردند که روغن زیتون نیز پرمصرف‌ترین سوبسترای لیپیدی برای القای تولید لیپاز در باکتری‌ها است. نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف با داده‌های مطالعه حاضر نیز مطابقت دارد، چرا که در روش غربالگری با استفاده از Tween 20 میزان فعالیت لیپازی باکتری‌ها در بیشترین میزان ثبت شد. همین طور مشابه با نتایج این مطالعه که سویه *Streptomyces* sp. strain LUS05 جدا شده از سواحل دریاچه نمک ارومیه بیشترین فعالیت لیپازی و تشکیل ناحیه شفاف را با قطر رسوب ۵/۷ سانتی‌متری در اطراف کلنی داشت، در بررسی‌های دیگر نیز این جنس دارای بیشترین فعالیت لیپازی بود. Mishra و Gupta (۲۰۱۴) از محل‌های مختلفی (آب، خاک و گیاه) ۱۰۵ *Streptomyces* جدا کردند که از میان آن‌ها *Streptomyces halstedii* بیشترین فعالیت لیپازی را داشت. در این مطالعه از ۹ سوبسترای مختلف از جمله Tweenهای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰، روغن آفتاب گردان، روغن سویا و روغن زیتون برای غربالگری فعالیت لیپازی استفاده شد که نتایج، بیشترین فعالیت آنزیمی را با استفاده از سوبسترای Tween 20 نشان داد (Mishra and Gupta, 2014). Vishnupriya و همکارانش (۲۰۱۰) نیز تولید لیپاز توسط *Streptomyces griseus* را با استفاده از روغن زیتون، روغن پالم و روغن آفتاب گردان به عنوان سوبسترا بررسی کردند و پس از ۷۲ ساعت تولید بهینه آنزیم لیپاز با استفاده از روغن زیتون به دست آمد.

در مجموع، جنس *Streptomyces* پتانسیل بالقوه‌ای را در تولید دامنه گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های خارج سلولی

دارد که برای تجزیه زیست‌توده ضروری است. این آنزیم‌ها هیدرولازهایی از جمله سلولاز، لیگنیناز، آمیلاز و لیپاز هستند که جنس *Streptomyces* را به یکی از میکروارگانیسم‌های مهم صنعتی تبدیل کرده است. از این رو مطالعات بر روی پتاسیل میکروبی محیط‌های بکر و بسیار شور مانند دریاچه نمک ارومیه می‌تواند در جهت جداسازی جنس‌های باکتریایی ارزشمند مفید باشد.

منابع

Abdelfattah M.S., Elmallah M.I., Hawas U.W., Abou El-Kassema L.T. and Eid M.A. 2016. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(8): 651–657.

Al-Dhabi N.A., Esmail G.A., Ghilan A.K. and Arasu M.V. 2020. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(1): 474–479.

Arasu M.V., Esmail G.A. and Al-Dhabi N.A. 2016. Hypersaline actinomycetes and their biological applications. P: 229–245. In: Dhanasekaran D. and Jiang Y. (Eds.). Actinobacteria- Basics and Biotechnological Applications. InTechOpen, UK.

Baird R.B., Eaton A.D. and Rice E.W. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, USA. 1796P.

Claverias F.P., Undabarrena A.N., Gonzalez M., Seeger M. and Camara B.P. 2015. Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaiso bay, Chile. Frontiers in Microbiology, 28(6): 1–11 (737).

Das R., Romi W., Das R., Sharma H.K. and Thakur D. 2018. Antimicrobial potentiality of Actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. BMC Microbiology, 18(1): 1–16.

Espinosa E., Sanchez S. and Farres A. 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. Biotechnology Letters, 12(3): 209–214.

Essien J.P. and Udosen E.D. 2000. Distribution of actinomycetes in oil contaminated ultisols of the Niger Delta (Nigeria). Journal of Environmental Sciences, 12(3): 296–302.

Gopinath S.C., Anbu P., Lakshmipriya T. and Hilda A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. BioMed Research International, 20(1): 1–10.

Gopinath S.C., Hilda A. and Anbu P. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience, 46(2): 119–126.

Hasan F., Shah A.A. and Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, 39(2): 235–251.

Ilesanmi O.I., Adekunle A.E., Omolaiye J.A., Olorode E.M. and Ogunkanmi A.L. 2020. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. Scientific African, 8: 1–10 (e00279).

Jenifer J.S., Donio M.T., Viji V.T., Velmurugan S., Babu M.M. and Dhas S.A. 2013. Halo-alkaliphilic actinomycetes from solar salt works in India: Diversity and antimicrobial activity. Blue Biotechnology Journal, 2(1): 137–151.

Jensen V. 1975. Bacterial flora of soil after application of oily waste. Oikos, 26(2): 152–158.

Jose P.A. and Jebakumar S.R. 2014. Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. Frontiers in Microbiology, 5: 1–3 (242).

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549.

Law J.W.F., Ser H.L., Duangjai A., Saokaew S., Bukhari S.I., Khan T.M. Ab Mutalib N.S., Chan K.G., Goh B.H. and Lee L.H. 2017. *Streptomyces colonosanans* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Malaysia mangrove soil exhibiting antioxidative activity and cytotoxic potential against human colon cancer cell lines. Frontiers in Microbiology, 16(8): 1–15 (877).

Lee L.H., Zainal N., Azman A.S., Eng S.K., Goh B.H. and Yin W.F. 2014. Diversity and antimicrobial activities of Actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. The Scientific World Journal, 14: 234–242.

Malviya N., Yandigeri M.S., Yadav A.K., Solanki M.K. and Arora D.K. 2014. Isolation and characterization of novel alkali-halophilic actinomycetes from the Chilika brackish water lake, India. Annals of Microbiology, 64(4): 1829–1838.

Mehnaz D., Abdulla K., Aiysha D., Zaheer A. and Mukhtar S. 2017. Actinomycetes: A source of industrially important enzymes. Journal of Proteomics Bioinform, 10: 316–319.

Mishra S. and Gupta N. 2014. Inducers for the enhanced production of lipase by *Streptomyces* isolated from mangrove ecosystem. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(11): 370-376.

Nagarajan S. 2012. New tools for exploring "old friends-microbial lipases". Applied Biochemistry and Biotechnology, 168(5): 1163–1196.

Oren A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology, 31(8-9): 825–834.

Palla M.S., Guntuku G.S., Muthyala M.K., Pingali S. and Sahu P.K. 2018. Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(2): 250–256.

Phillips K., Zaidan F., Elizondo O.R. and Lowe K.L. 2012. Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic bacterial communities from a hypersaline lake, La Sal del Rey, in extreme South Texas (USA). Aquatic Biosystems, 8(1): 1–11.

Ramnath L., Sithole B. and Govinden R. 2017. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. Biotechnology Reports, 15: 114–124.

Rathi P., Goswami V.K., Sahai V. and Gupta R. 2002. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. Journal of Applied Microbiology, 93(6): 930–936.

Rowe M.T. and Gilmour A. 1982. Growth, enzyme production and changes in oxygen tension occurring during batch cultivation of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains. Milk Science International, 37: 597–600.

Sakai Y., Hayatsu M. and Hayano K. 2002. Use of Tween 20 as a substrate for assay of lipase activity in soils. Soil Science and Plant Nutrition, 48(5): 729–734.

Singh R., Gupta N., Goswami V.K. and Gupta R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. Applied Microbiology and Biotechnology, 70(6): 679–682.

Thomson C.A., Delaquis P.J. and Mazza G. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39(2): 165–187.

Treichel H., De Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M. and Oliveira J.V. 2010. A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology, 3(2): 182–196.

Vishnupriya B., Sundaramoorthi C., Kalaivani M. and Selvam K. 2010. Production of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of bioparameters.

International Journal of ChemTech Research, 2(3): 1380–1383.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 3, Autumn 2021

Research Paper

Screening of lipase-secreting marine halophilic Actinobacteria from oil-contaminated sediments of hypersaline Lake Urmia

Razieh Sadati[1], Nima Shaykh-Baygloo[2]*, Rasoul Shokri[3]

Received: January 2021 Accepted: April 2021

Abstract

In this study, the lipases-producing Actinobacterial species were isolated from oil-contaminated sites of the hypersaline Lake Urmia. All Actinobacteria isolates were examined for lipase activity by Tween-20 and olive oil as lipid substrates. After DNA extraction, the isolated strains were identified by 16S rRNA gene analysis. Six isolates of halophilic Actinobacteria named LUG03, LUS05, LUG09, LUN15, LUG21 and LUB22 were isolated from the salt sediments of Lake Urmia (Bandar Sharafkhaneh). Among them four isolates showed high potential for lipase production with the highest lipolytic activity for LUS05 strain. Sequence analysis of 16S rRNA identified that the isolates belonged to *Streptomyces* sp., *Nocardiopsis* sp., *Glutamicibacter* sp. and *Brachybacterium* sp.

Key words: *Halophilic Actinobacteria, Lipase, Lake Urmia*.

1- Ph.D. Student in Microbiology, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

*Corresponding Author: n.baygloo@urmia.ac.ir