مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۲۴۵-۲۳۷

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تولید کننده L-آسپاراژیناز از خلیج فارس

فاطمه ایزدپناه قشمی[۱]، صدیقه جوادپور[*۲]، کیانوش ملک زاده[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، [۳] استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

چکیده

سابقه و هدف: L-آسپاراژیناز یک ماده آنتی نئوبلاستیک می باشد که در شیمی درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد به کار می رود. این آنزیم در بسیاری از جانوران و میکروارگانیسم ها وجود دارد. با این وجود باکتری ها منبع مناسبی برای استخراج این آنزیم به شمار می روند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تولید کننده L-آسپاراژیناز از خلیج فارس انجام شد.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر از نمونه های آب و رسوبات خلیج فارس نمونه گیری به عمل آمد. به منظور غربالگری باکتری های تولید کننده L-آسپاراژیناز از محیط کشت M9 استفاده گردید. پس از تهیه عصاره خام، میزان فعالیت آنزیم با روش رنگ سنجی تعیین شد. ۱۳ سویه که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند، انتخاب و با روش PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA* شناسایی گردیدند.

یافته ها: در مجموع ۱۸۱ کلنی از نمونه های مورد بررسی جداسازی گردید. از این میان ۵۷ کلنی توانایی تولید آنزیم L-آسپاراژیناز را داشتند. آنالیز توالی ژن *16S rRNA* نشان داد که از مجموع ۱۳ باکتری با بیشترین فعالیت آنزیمی، ۸ سویه (۶۱/۵٪) متعلق به جنس *باسیلوس*، دو سویه (۱۵/۴٪) *سودوموناس* و ۱ سویه به هر کدام از جنس های *زوبلا* (۷/۷٪)، *اوشنیموناس* (۷/۷٪)، و *اسینتوباکتر* (۷/۷٪) تعلق داشت. همچنین *اسینتوباکتر* سویه PG_14 کمترین فعالیت آنزیمی (۰/۰۷ IU) و *سودوموناس* سویه PG_01 بیشترین فعالیت آنزیمی (۶/۱ IU) را دارا بودند.

نتیجه گیری: باکتری های جدا شده از خلیج فارس منبع بالقوه ای از L-آسپاراژیناز می باشند. از فعالیت بالای *سودوموناس* سویه PG_01 می توان به منظور تولید این آنزیم استفاده نمود. مطالعه حاضر، اولین گزارش تولید L-آسپاراژیناز توسط جنس *زوبلا* می باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم L-آسپاراژیناز، *16S rRNA*، خلیج فارس.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۲

مقدمه

بیشتر از ۷۰ درصد سطح زمین را اقیانوس ها پوشانده اند. بیش از ۲ میلیون پروکاریوت در هر میلی لیتر از آب دریا در نزدیکی سواحل وجود دارد. میکروارگانیسم های موجود در محیط های دریایی نسبت به انواع خشکی زی از نظر ویژگی های فیزیولوژیک و توانایی های متابولیکی متفاوت بوده و به طور معمول توان بالایی در تولید ترکیبات فعال زیستی کارآمد دارند (۱ و ۲). از آنجایی که آب دریا به طور طبیعی شور بوده و از لحاظ الکتروشیمی تشابه بیشتری به پلاسمای خون انسان دارد، بنابراین محصولات میکروبی دریایی به ویژه آنزیم ها، ایمنی بیشتر و سمیت زایی سلولی کمتری داشته و درمجموع برای کاربردهای درمانی در انسان مناسب تر می باشند (۳). آنزیم L-آسپاراژیناز (L- آسپاراژین آمینوهیدرولاز E.C.3.5.L.L) با واکنش آبکافت (Hydrolysis)، پیوند آمیدی را در L-آسپاراژین شکسته و آن را به L-آسپارتات و

*) آدرس برای مکاتبه: بندرعباس، بلوار امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۷۶۱-۶۶۸۹۶۲۴ پست الکترونیک: sedigheh.javadpour@yahoo.com

آمونیاک تبدیل می کند (۴). این آنزیم یکی از مهم ترین آنزیم های درمانی از نظر بیوتکنولوژی و زیست پزشکی محسوب می شود. سازمان غذا و دارو (Food and Drug Administration = FDA) و سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization = WHO) استفاده از L- آسپاراژیناز را برای درمان موثر لوسمی لنفوبلاستیک حاد و لنفو سارکوما که از شایع ترین بدخیمی ها در کودکان و نوجوانان است، تصویب نموده اند (۵).

L- آسپاراژین آمینواسید غیر ضروری برای بدن انسان محسوب می گردد. زیرا سلول های طبیعی دارای فعالیت آسپاراژین سنتتازی هستند. برخلاف این سلول ها، سلول های نئوپلاستیک به دلیل فقدان فعالیت آسپاراژین سنتتازی قادر به سنتز L- آسپاراژین نمی باشند. بنابراین این سلول ها آسپاراژین مورد نیاز خود را از منابع موجود در بدن از جمله خون، مایع مغزی-نخاعی و مغز استخوان تامین می کنند.

تزریق داخل وریدی L- آسپاراژیناز موجب کاهش منابع آسپاراژین در بدن شده و سلول های نئوپلاستیک در شرایط فقر آسپاراژین قرار می گیرند. بنابراین به دلیل عدم توانایی تولید پروتئین، DNA و RNA، رشد آن ها متوقف شده و یا حتی منجر به مرگ آن ها نیز می گردد (۶ و ۷). آنزیم نام برده در بسیاری از بافت های جانوران، باکتری ها، گیاهان و در سرم بعضی از جونده ها وجود دارد. با این وجود در انسان یافت نمی شود (۸ و ۹).

میکروارگانیسم هایی مانند: *ائروباکتر* (*Aerobacter*)، *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *ویبریو* (*Vibrio*)، *سراشیا* (*Serratia*)، *فوتوباکتریوم* (*Photobacterium*)، *زانتوموناس* (*Xanthomonas*)، *استرپتومایسز* (*Streptomyces*)، *پروتئوس* (*Proteus*)، *باسیلوس* (*Bacillus*) و *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) توانایی تولید آنزیم L-آسپاراژیناز را دارا می باشند. آنزیم جداسازی شده از *اروینیا کاروتوورا* (*Erwinia carotovora*) و *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد و دیگر نئوپلاسمی های بدخیم در انسان به کار می رود و تولید تجاری دارد (۶ و ۱۰).

نتایج بالینی نشان می دهد که آنزیم خالص سازی شده از این دو باکتری موجب بروز سمیت، سرکوب ایمنی و ایجاد مقاومت می گردد. اگر چه این دو آنزیم به صورت وسیعی استفاده می شوند، اما پاسخ درمانی بیماران به ندرت بدون اثرات سمی اتفاق می افتد و اکثر بیماران دچار عوارض جانبی ناخواسته می گردند.

یکی دیگر از محدودیت های استفاده از این آنزیم ها، ایجاد واکنش حساسیتی است که محدوده آن از واکنش های ملایم تا شوک آنافیلاکسی می باشد. گزارش های منتشر شده حاکی از این است که ویژگی های کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم ها به ماهیت ژنتیکی سویه میکروبی مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین نیاز به کشف منابع جدید آنزیم L- آسپاراژیناز با تاثیرات درمانی مشابه و ویژگی های سرولوژیک مطلوب تر وجود دارد (۱۱).

آنزیم L- آسپاراژیناز در صنایع غذایی گیاهی به منظور جلوگیری از تشکیل ماده ای سرطان زا به نام آکریلامید نیز کاربرد دارد. در غذاهای گیاهی، آکریلامید به طور وسیعی در نتیجه واکنش های القاء حرارتی بین L- آسپاراژین و گلوکز یا فروکتوز تولید می شود. به همین دلیل از L- آسپاراژیناز برای کاهش غلظت آسپاراژین به عنوان پیش ماده آکریلامید نیز استفاده می گردد (۱۲). با توجه به اهمیت و کاربرد روزافزون آنزیم L- آسپاراژیناز، اولین گام برای تولید انبوه آنزیم، یافتن میکروارگانیسم های جدید با توان تولید بالا و اثرات سیتوتوکسیتی کمتر ضرورت دارد. مطالعاتی در مورد میکروارگانیسم های خشکی زی تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز وجود دارد. اما اطلاعات اندکی در مورد باکتری های دریایی تولید کننده آنزیم L-آسپاراژیناز به ویژه در خلیج فارس در دسترس است. باکتری های دریایی با توجه به طبیعت نمک دوست شان، برای استخراج صنعتی و دارویی آنزیم های مناسب تری می باشند.

هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز از خلیج فارس بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها: در این مطالعه تجربی در مجموع تعداد ۶۰ نمونه شامل ۲۰ نمونه آب دریا و ۴۰ نمونه رسوبات دریای خلیج فارس از مناطق مختلف استان هرمزگان جمع آوری شد. نمونه های رسوب سواحل به وسیله قاشقک استریل از عمق ۱۰-۵ سانتی متری، در ظروف شیشه ای استریل جمع آوری گردیدند. نمونه های آب دریا نیز از قسمت ساحلی و نواحی نزدیک ساحل به وسیله قایق با غوطه ور کردن ظروف شیشه ای زیر سطح آب و قرار دادن دهانه آن کمی به طرف بالا و به سمت جریان آب، جمع آوری شدند. تمامی نمونه ها بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۱۳).

ب) جداسازی باکتری ها: به منظور تهیه رقت لازم از نمونه های رسوب، ۱۰ گرم رسوب با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. برای تهیه رقت لازم از نمونه های آب دریا، ۱۰ میلی لیتر آب دریا به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. از رقت 10^{-1} تا 10^{-4} حاصل، بر روی محیط کشت نوترینت آگار (Hi Media, India) به صورت خطی کشت داده شد. تمامی نمونه ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. به منظور خالص سازی، کلنی های جداسازی شده مجدداً بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند (۱۳).

ج) غربالگری باکتری های تولید کننده آنزیم L- آسپاراژیناز: فعالیت L- آسپاراژینازی کلنی های جدا سازی شده مطابق با روش گولاتی (Gulati) و همکاران در سال ۱۹۹۷، با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی M9 حاوی ۱۰ گرم آسپاراژین، ۶ گرم $Na_2HPo_4.2H_2o$، ۲ میلی لیتر $MgSO_4.7H_2o$ (۱ mol /L)، ۰/۰۲۵ گرم فنل رد، ۱۰ میلی لیتر مالتوز ۲۰ درصد، ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۷۵ گرم KH_2Po_4، ۱ میلی لیتر $CaCl_2.H_2o$ (۰/۱ mol /L)، ۲۰ گرم آگار و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

کلنی های جداسازی شده از مرحله قبل، در این محیط به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردیدند. فعالیت L- آسپاراژینازی در این آزمون به وسیله ناحیه صورتی رنگ اطراف کلنی ها مشخص شد. این سویه ها با ترشح آنزیم L- آسپاراژیناز، L- آسپاراژین موجود در محیط کشت را به آمونیاک و L- آسپارتات تجزیه کرده و در نتیجه اطراف کلنی به دلیل تغییر pH محیط و حضور معرف فنل رد هاله صورتی رنگ ایجاد می گردد (۱۴).

د) تهیه عصاره خام آنزیم L- آسپاراژیناز: کلنی های تولید کننده آنزیم L- آسپاراژیناز در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع M9 کشت و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس محیط کشت با سرعت ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت از مایع رویی به عنوان عصاره خام آنزیم استفاده گردید (۱۴).

ه) اندازه گیری فعالیت آنزیم L- آسپاراژیناز: در این پژوهش به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم L- آسپاراژیناز، از روش رنگ سنجی توصیف شده توسط ایمادا (Imada) و همکاران در سال ۱۹۷۳ استفاده شد. برای این منظور مقدار ۰/۵ میلی لیتر L- آسپاراژین ۰/۰۴ مولار، ۰/۵ میلی لیتر عصاره خام آنزیم و ۰/۵ میلی لیتر بافر Tris-Hcl ۰/۵ مولار را با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۱/۵ مولار به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از مایع روماند با ۰/۲ میلی لیتر معرف نسلر و ۳/۷ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت مقدار آمونیاک آزاد شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بین المللی (IU) با استفاده از منحنی استاندارد آمونیوم سولفات محاسبه شد (۱۵).

و) شناسایی مقدماتی و تکمیلی باکتری ها: برخی از ویژگی های شکل شناسی و بیوشیمیایی سویه های انتخاب شده به کمک رنگ آمیزی گرم و تست های اکسیداز، کاتالاز، اوره آز، سیترات، حرکت، ایندول، تولید سولفید هیدروژن، تجزیه گلوکز، ساکارز و لاکتوز در محیط TSI مورد بررسی قرار

گرفتند. شناسایی تکمیلی باکتری ها به وسیله آنالیز ژن *16S rRNA* صورت پذیرفت. برای استخراج DNA باکتری از کیت DNA Bacterial Gold Peq ساخت کشور آلمان استفاده شد.

به وسیله پرایمرهای ۲۷F (5́AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3́) و ۱۵۲۵R (5́AAG GAG GTG ATC CAA3́) قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *16S rRNA* تکثیر گردید (۱۶).واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۴ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، پنج میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند (۱۶).

در نهایت به منظور توالی یابی، محصول PCR به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Bio edit و برنامه BLAST موجود در پایگاه داده های بانک ژنی National Center for Biotechnology Information (NCBI) مورد ارزیابی و میزان تشابه آن ها با سایر ژن های ثبت شده در این پایگاه بررسی گردید.

یافته ها

در این مطالعه از مجموع نمونه های آب و رسوبات خلیج فارس، ۱۸۱ کلنی (۳۵ کلنی از آب دریا و ۱۴۶ کلنی از رسوبات دریا) جدا سازی گردید. از این میان ۵۷ کلنی بر روی محیط M9 رشد کردند. این امر نشان دهنده توانایی تولید آنزیم L- آسپاراژیناز می باشد. از ۳۵ کلنی جدا شده از آب دریا، ۶ کلنی (۱۰٪) و از ۱۴۶ کلنی جداسازی شده از رسوبات دریا ۵۱ کلنی (۹۰٪) بر روی محیط M9 رشد کردند. با اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم از میان ۵۷ کلنی، ۱۳ سویه که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند، برای ادامه کار در مراحل بعدی انتخاب شدند. در میان آن ها، *اسینتوباکتر* سویه PG_14 کمترین فعالیت آنزیمی (۰/۰۷ IU) و *سودوموناس*

جدول ۱: میزان فعالیت آنزیمی باکتری های جداسازی شده بر حسب (IU)

سویه باکتری	فعالیت آنزیمی (IU)	شماره دسترسی	درصد تشابه	منبع جداسازی
سودوموناس سویه PG_01	۱/۶	KF044297	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_02	۰/۷۳	KF150761	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_03	۰/۶۸	KF150763	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_04	۰/۶۷	KF150760	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_05	۰/۴۹	KF150765	۹۹٪	رسوب
زوبلا سویه PG_06	۰/۴۱	KC984281	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_07	۰/۴۱	KF150764	۹۹٪	رسوب
سودوموناس سویه PG_09	۰/۲۷	KF150767	۹۸٪	رسوب
اوشنیموناس سویه PG_10	۰/۲۵	KF150762	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_11	۰/۲۱	KF044299	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_12	۰/۲۱	KF044298	۹۹٪	رسوب
باسیلوس سویه PG_13	۰/۲۱	KF150766	۹۸٪	رسوب
اسینتوباکتر سویه PG_14	۰/۰۷	–	–	رسوب

سویه PG_01 بیشترین فعالیت آنزیمی (۱/۶ IU) را دارا بودند (جدول ۱).

شناسایی مقدماتی باکتری های انتخاب شده در جدول ۲ آورده شده است. نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن *16S rRNA* حضور باند ۱۵۰۰ جفت بازی را تایید نمود. در جدول ۱ درصد تشابه توالی های بلاست شده با توالی های موجود در باکتری های دیگر در پایگاه NCBI نشان داده شده است. بیشترین درصد تشابه به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید.

آنالیز توالی ژن *16S rRNA* نشان داد که از مجموع ۱۳ باکتری تولیدکننده آنزیم L-آسپاراژیناز، ۸ سویه (۶۱/۵٪) متعلق به جنس *باسیلوس*، دو سویه (۱۵/۴٪) *سودوموناس* و ۱ سویه به هر کدام از جنس های *زوبللا* (*Zobellella*) (۷/۷٪)، *اوشنیموناس* (*Oceanimonas*) (۷/۷٪)، و *اسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) (۷/۷٪) تعلق داشت. همچنین این توالی ها در پایگاه داده های ژنی NCBI ثبت گردیدند (جدول ۱).

۷۰۱ نوکلئوتید *سودوموناس* سویه PG_01 که دارای حداکثر فعالیت آنزیمی بود، به میزان ۹۹ درصد به *سودوموناس* های موجود در NCBI شباهت داشت.

بحث

در مطالعه حاضر سویه های باکتریایی از نمونه های آب دریا و رسوبات خلیج فارس جداسازی شدند. از میان آن ها ۱۳ سویه با بیشترین فعالیت L- آسپاراژینازی به وسیله روش مولکولی آنالیز ژن *16S rRNA* شناسایی گردیدند.

آنزیم های میکروبی نسبت به آنزیم های مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری مزیت هایی دارند که از آن جمله می توان به تنوع فعالیت های کاتابولیکی، هزینه ارزان تر، منابع فراوان، مستمر و حتی کمیت و پایداری نسبتاً بیشتر آن ها اشاره نمود. باکتری های دریازی آنزیم های متفاوتی را بر اساس زیستگاه و ساختار اکولوژی شان تولید می کنند (۱۷). L- آسپاراژیناز آنزیمی است که در درمان بدخیمی های چند اندامی به کار می رود. از این آنزیم برای درمان سرطان و هم چنین در صنایع غذایی برای کاهش غلظت آکریلامید استفاده می شود (۴ و ۱۸).

در این مطالعه از نمونه های جمع آوری شده آب و رسوبات دریا ۱۸۱ کلنی جداسازی گردید. به طوری که ۳۵ کلنی از آب دریا و ۱۴۶ کلنی از رسوبات جداسازی شد. این یافته نشان می دهد که باکتری های بیشتری از رسوبات نسبت به آب دریا جداسازی گردیده است. با توجه به این که رسوبات دریا حاوی ذخیره وسیعی از کربن ارگانیک، شیبی از غلظت اکسیژن و مواد غذایی آلی و غیرآلی می باشند، در واقع ترکیبی را فراهم می کنند که کنام ویژه ای برای میکروارگانیسم های متفاوت می باشد (۱۳). بنابراین تعداد بیشتر باکتری های جداشده از رسوبات نسبت به آب دریا امری منطقی به نظر می رسد.

در مطالعه حاضر، به منظور جداسازی باکتری های تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز از محیط کشت اختصاصی M9 استفاده گردید. در این محیط کشت با توجه به اینکه L-آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن به کار می رود، فقط باکتری هایی که قادر به سنتز آنزیم L- آسپاراژیناز هستند، رشد می کنند. از میان ۵۷ سویه تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز، ۱۳ سویه که بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داده بودند، با استفاده از روش

جدول ۲: خصوصیات مورفولوژی سلولی و برخی از تست های بیوشیمیایی باکتری های شناسایی شده

سویه باکتری	رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	ایندول	اوره آز	سیترات	اکسیداز	حرکت
***سودوموناس* سویه PG_01**	باسیل، -	+	-	-	+	+	+
***باسیلوس* سویه PG_02**	باسیل، +	+	-	-	-	-	+
***باسیلوس* سویه PG_03**	باسیل، +	+	-	-	+	-	+
***زوبللا* سویه PG_06**	باسیل، -	+	-	-	-	+	+
***اوشنیموناس* سویه PG_10**	باسیل، -	+	-	-	-	+	+
***اسنیتوباکتر* سویه PG_14**	کوکسی، -	+	-	-	+	-	-

مولکولی آنالیز ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. شناسایی به وسیله ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دشوار، زمان بر و در برخی موارد نامطمئن است. امروزه با توسعه علوم سلولی- مولکولی، روش مولکولی آنالیز ژن *16S rRNA* ابزار مهمی برای شناسایی صحیح و طبقه بندی باکتری ها می باشد (۱۹).

در مطالعه ای که توسط کوماری (Kumari) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در هند انجام شد، از میان *اکتینومایست* های تولید کننده آنزیم L- آسپاراژیناز، سویه ای که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود بر اساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA به عنوان *استرپتومایسس گریسئولوتس* سویه WS3/1 (*Streptomyces griseolutes* WS3/1) شناسایی شد. این سویه دارای شباهت ۹۹ درصدی به جنس *استرپتومایسس* بود (۲۰). ابراهیمی نژاد (Ebrahiminejad) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران، نیز باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیم L-آسپاراژیناز را از دریاچه مهارلو جداسازی کردند. آنها همچنین باکتری هایی که بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان دادند، بر اساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA شناسایی نمودند (۲۱).

از میان ۱۳ سویه باکتری شناسایی شده در تحقیق حاضر، بیشترین فعالیت آنزیمی با ۱/۶ IU در *سودوموناس* سویه PG_01 مشاهده شد. اما فراوان ترین باکتری شناسایی شده در این مطالعه با ۶۱/۵ درصد به جنس *باسیلوس* تعلق داشت. این باکتری دارای فعالیت آنزیمی بین ۰/۲۱ IU تا ۰/۷۳ IU بود (جدول ۱). در حقیقت تشکیل آندوسپور و توزیع هوایی اسپور ها در این جنس و نیز توانایی به کارگیری محدوده وسیعی از منابع کربن، دلیل فراوانی آن ها را در زیستگاه های متفاوت روشن می کند. در مطالعه ابراهیمی نژاد (Ebrahiminejad) و همکاران، از میان ۳۲ باکتری جدا سازی شده، ۲۳ سویه (۷۱/۹ ٪) متعلق به جنس *باسیلوس* بودند و ۱۱ سویه (۳۴/۴٪) از آن ها توانایی تولید آنزیم آسپاراژیناز را داشتند. همچنین نتایج آنها نشان داد که باسیلوس سویه BCCS 034 بیشترین فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز خارج سلولی را داشته است (۲۱).

کوشواها (Kushwaha) و همکاران در هند، باکتری های تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز را از خاک جداسازی کردند. *باسیلوس سوبتلیس* (*Bacillus subtilis*) دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم بود (۲۶). این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر از نظر فراوانی *باسیلوس* ها در زیستگاه های متفاوت هم خوانی دارد.

سینگ (Singh) و همکاران در هند، ۱۵ سویه را از خاک جداسازی نمودند. از این میان ۴ سویه توانایی تولید آنزیم L- آسپاراژیناز را داشتند. باکتری های مولد آنزیم L- آسپاراژیناز شناسایی شده متعلق به جنس های *باسیلوس*، *پروتئوس* و *سودوموناس* بودند (۲۲). کمبل (Kamble) و همکاران نیز در هند، از نمونه های جمع آوری شده خاک مزرعه، خاک نمک زار و آب، باکتری های تولیدکننده آنزیم L- آسپاراژیناز را جداسازی کردند. از ۱۱ باکتری شناسایی شده در مطالعه آنها، سه سویه به *سودوموناس*، دو سویه به *باسیلوس*، دو سویه به *سراشیا* و سه سویه دیگر *اشریشیا کلی*، *ائروموناس* و *پروتئوس* تعلق داشتند (۲۳).

فودا (Foda) و همکاران در مصر، باکتری *سودوموناس اوالیس* (*Pseudomonas ovalis*) را از خاک جداسازی کردند. این باکتری توانایی بالایی در تولید آنزیم L- آسپاراژیناز داشت (۲۴). از آنجایی که باکتری های متعلق به جنس *سودوموناس*، دارای تنوع ژنتیکی و فیزیولوژیکی زیادی هستند، توانایی تولید آنزیم های برون سلولی متنوعی را دارند. به همین دلیل آنها از فعالیت آنزیمی بالایی در اکثر مطالعات برخوردار می باشند (۲۵). در مطالعه حاضر *زوبلا* سویه PG_06 و *اوشنیموناس* سویه PG_10 دارای فعالیت آنزیمی بالایی بودند.

بر اساس مطالعات ما تاکنون تولید آنزیم L- آسپاراژیناز توسط اعضای جنس *زوبلا* گزارش نشده است و پژوهش ما اولین گزارش تولید آنزیم L- آسپاراژیناز توسط این جنس می باشد. با توجه به این که آنزیم باکتری های متفاوت دارای ویژگی های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مختلفی هستند، می توان *زوبلا* سویه PG_06 را به عنوان منبع جدید آنزیم L- آسپاراژیناز معرفی نمود.

نتیجه گیری

خلیج فارس، به ویژه رسوبات آن، منبع مناسبی برای جداسازی باکتری های مولد آنزیم L-آسپاراژیناز می باشند. علاوه بر اعضاء جنس های *سودوموناس*، *باسیلوس* و *اوشنوموناس*، اعضاء جنس *زوبللا* نیز تولید کنندگان مناسبی برای این آنزیم می باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. World J Microb Biot. 2010; 26(12): 2123-2139.

2. Imada C, Koseki N, Kamata M, Kobayashi T, Hamada-Sato N. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine *Actinomycetes* in the presence of seawater. Nihon Hosenkin Gakkaishi. 2007; 21(1): 27-31.

3. Das S, Lyla P, Ajam khan S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. Curr Sci. 2006; 90(10): 1325-1335.

4. Kornbrust B A, Stringer M A, Krebs Lange N E, Hendriksen H V, Whitehurst R J, Van Oort M. Asparagines, an enzyme for acrylamide reduction in food products. Enzyme Food Technol. 2010; 4(1): 59-87.

5. Warangkar S, Khobragade C. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. J Cell Tissue Res. 2009; 9(3): 1963-1968.

6. Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Zarrini G, Ghoshoon M, Javad Raee M, Morowvat M, Kafil zadeh F, Kazemi A. An optimized medium screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. Am J Biochem Biotechnol. 2008; 4(4): 422-424.

7. Irino T, Kitoh T, Koami K, Kashima T, Mukai K, Takeuchi E, Hongo T, Nakahata T, Schuster S, Osaka M. Establishment of Real-Time PCR method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression. J Mol Diagn. 2004; 6(3): 217-224.

8. Ashraf A, Bessoumy E, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation, and purification of L- asparaginase from Pseudomonas aeruginosa 50071 using solid-state fermentation. J Biochem Mol Biol. 2004; 37(4): 387-393.

9. Shah A, Karadi R, Parekh P. Isolation optimization and production of L- asparaginase from coliform bacteria. Asian J Biotechnol. 2010; 2(3): 169-177.

10. Supriya D, Lele S. Application of evolutionary optimization technique in maximizing the recovery of L- asparaginase from *E. caratovora* MTCC 1428. Global J Biotechnol Biochem. 2010; 5(2): 97-105.

11. 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.

12. Hatanaka T, Usuki H, Arima J, Uesugi Y, Yamamaoto Y, Kumagai Y, Yamasato A, Mukaihara T. Extracellular production & characterization of two *Streptomyces* L- asparaginase. Appl Biochem Biotechnol. 2011; 163(7): 836-844.

13. Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine *Actinomycetes* isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World J Microb Biot. 2009; 25(12): 2103-2111.

14. Gulati R, Saxena R, Gupta R. A rapid plate assay for screening L- asparaginase producing microorganisms. Lett Appl Microbiol. 1997; 24(1): 23-26.

15. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganism. J Gen Microbiol. 1973; 76(1): 85-99.

16. Nimnoi P, Pongsilp N, Lumyong S. Endophytic *Actinomycetes* isolated from *Aquilaria crassna*, *Pierreex lec* and screening of plant growth promoters production. World J Microbiol Biot. 2010; 26(2): 193-203.

17. Chandrasekaran M, Rajeev Kumar S. Marine microbial enzymes. Biotechnol. 2010; 9(4): 1-15.

18. Savitri N, Asthana N, Azmi W. Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme. Indian J Biotechnol. 2002; 2(2): 184-194.

19. Lu Y, Dong X, Liu S, Bie X. Characterization and identification of a novel marine *Streptomyces* sp. produced antibacterial substance. Mar Biotechnol. 2009; 11(6): 717-724.

20. Kumari P, Sankar G, Prabhakar T. L- asparaginase production and molecular identification of marine Streptomycete strain WS3/1. Int J Pharm Biomed Res. 2012; 2(4): 244-249.

21. 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): 307-311.

22. Singh Y, Srivastava S. Screening and characterization of microorganisms capable of producing antineoplastic drug, L- asparaginase. Int J Biol Med Res. 2012; 3(4): 2548-2554.

23. Kamble K, Bidwe P, Muley V, Kamble L, Bhadange D, Musaddiq M. Characterization of L-asparaginase producing bacteria from water, farm and saline soil. Biosci Discovery. 2012; 3(1): 116-119.

24. Foda MS, Khafagy EZ, Badr El-Din SM. Production of L-asparaginase by *Pseudomonas ovalis*. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg. 1974; 129(6): 525-532.

25. Loperena L, Soria V N, Varela H, Lupo S, Bergalli A, Guigou M, Rivas F, Batista S. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. World J Microb Biot. 2012; 28: 2249-2256.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Isolation and molecular identification of L- asparaginase producing bacteria from Persian Gulf

Fatemeh IzadpanahQeshmi[1], Sedigheh Javadpour[2], Kianoosh MalekZadeh[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Research Center for Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.
[3] Assistant Professor, Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, Iran.

Abstract

Background and Objectives: L- asparaginase is an anti-neoblastic agent used in the chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia. This enzyme is widely distributed among microorganisms and animals. Microorganisms have proved to be a better alternative for L- asparaginase. The objective of this study was isolation and molecular identification of L- asparaginase producing bacteria from Persian Gulf.

Material and Methods: In this study, samples were collected both water and sediments of Persian Gulf. An screening culture was performed on M9 in order to isolate the L- asparaginase producing bacteria. Next, after preparation of bacterial cell free suspension, the L- asparaginase activity was measured by Colorimertic method. Among producing L- asparaginase strains 13 isolates with high L-asparaginase activity were selected and their phylogeny were detected based on nucleotide sequence of *16S rRNA* gene.

Results: Totally, 57 isolates out of 181 achieved bacterial colonies were able to produce L- asparaginase. Based on *16SrRNA* analysis, these 13 chosen isolates with high L-asparaginase producing ability belonged to *Bacillus* spp. (8 isolate, 61.5%), *Pseudomonas* spp. (2 isolate, 15.4%), *Zobellella* spp. (1 isolate, 7.7%), *Oceanimonas* spp. (1 isolate, 7.7%) and *Acinetobacter* (1 isolate, 7.7%). The highest and lowest L- asparaginase productivity was measured in *Pseudomonas* sp. PG-01 with 1.6 IU and *Acinetobacter* sp. PG-14 with 0.07 IU, respectively.

Conclusion: Some marine bacterial strains isolated from Persian Gulf are potential source of L- asparaginase enzyme. *Pseudomonas* sp. PG-01 is especially useful for commercial production of this enzyme. In this study, the ability of *Zobellella* spp. for production of L- asparaginase is reported for first time.

Keywords: L- asparaginase, *16S rRNA*, Persian Gulf.

Correspondence to: Sedigheh Javadpour

Tel: +987616689624

E-mail: sedigheh.javadpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 237-245.