Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, September 2024

Original Article

Isolation of chitinase-producing archaea from shrimp shells in Hormuz Island of Iran

Farhanaz Sadat Mirlohi[1], Soheila Abbasi[2], Maryam Jalili Tabaii[2], Giti Emtiazi[3]

[1] Student of MSc, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran. [2] Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran. [3] professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Chitin is the second most abundant polymer on the earth, that found in the cell wall of fungi, the exoskeleton of insects and crustaceans. Chitin is decomposed by chitinases and the compounds derived from them can be very useful and beneficial for treating some diseases. The production of this enzyme by halophilic microorganisms, especially archaea, increases the value of these enzymes in industries due to their ability to withstand harsh conditions.

Materials and methods: The isolates of this study were obtained by sampling from several areas of Hormuz Island in the Persian Gulf of Iran and cultivating them in DSM medium with shrimp shell as the only carbon source. Quantitative measurements were performed to examine the amount of chitinase enzyme in the isolates and select the best isolate, followed by the necessary tests to identify the selected isolate.

Results: The outcomes indicated the presence of chitinase-producing archaea with different amounts of the enzyme based on the consumption of colloidal chitin as the sole carbon source. The selected isolate (E) (*Halarchaeum rubridurum* ASFM1402) had a high potential (9.12 IU/mL) produce large amounts of chitinase enzyme from colloidal chitin.

Conclusion: Considering the geographical conditions of the southern regions of the country and the presence of the sea and the fishing industry, as well as the abundant chitinous wastes resulting from them, it is important to find ways to remove these wastes in such a way that they do not have harmful environmental effects. Our research can be the beginning of extensive research in this area.

Key words: chitinase, archaea, colloidal chitin, Hormuz Island.

Received: 29 May 2024 Revised: 24 June 2024 Accepted: 31 August 2024

Correspondence to: Soheila Abbasi
Tel: +98 9132707632
E-mail: soheila522003@yahoo.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 84 - 94

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره دوم (پیاپی ۵۹) تابستان ۱۴۰۳
صفحات ۹۴ –۸۴

Original Article

جداسازی آرکیا با پتانسیل بالای تولید کیتیناز با استفاده از پوست میگو در جزیره هرمز ایران

فرحناز سادات میرلوحی[۱]، سهیلا عباسی[۲*]، مریم سادات جلیلی طبائی[۲]، گیتی امتیازی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران. [۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران. [۳] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: کیتین دومین پلیمر فراوان روی زمین، موجود در دیواره قارچ‌ها و همچنین در اسکلت بیرونی حشرات و سخت پوستان است که به‌وسیله کیتینازها تجزیه می‌شود و ترکیبات حاصل از آن‌ها می‌تواند جهت درمان بعضی از بیماری‌ها بسیار مفید و سودمند باشند. تولید این آنزیم به‌وسیله میکروارگانیسم‌های هالوفیل خصوصا آرکیا، به‌دلیل قابلیت تحمل شرایط سخت و شدید، ارزش این آنزیم‌ها را در صنایع بالاتر می‌برد.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های این پژوهش با نمونه‌برداری از چندین منطقه از جزیره هرمز در خلیج فارس ایران و کشت آن‌ها در محیط DSM با پوست میگو به‌عنوان تنها منبع کربن حاصل شد. سنجش‌های کمی برای بررسی میزان آنزیم کیتیناز جدایه‌ها و انتخاب بهترین جدایه و سپس تست‌های لازم برای شناسایی جدایه منتخب صورت گرفت.

یافته‌ها: بررسی‌های حاکی از حضور آرکیای مولد کیتیناز با مقادیر متفاوت از آنزیم براساس مصرف کیتین کلوئیدال به‌عنوان تنها منبع کربن بود. جدایه منتخب (E) با نام *Halarchaeum rubridurum* ASFM1402 دارای پتانسیل بالا (۹/۱۲۵IU/mL) برای تولید مقادیر زیادی آنزیم کیتیناز از کیتین کلوئیدال است.

نتیجه‌گیری: با توجه به شرایط جغرافیایی مناطق جنوبی کشور و وجود دریا و صنعت شیلات و همچنین ضایعات فراوان کیتینی حاصل از آن‌ها، یافتن روش‌هایی به‌منظور حذف این ضایعات به گونه‌ای که اثرات زیست محیطی مخرب کاهش یابند، اهمیت دارد. بررسی و یافتن تعدادی از آرکیای تولید کننده آنزیم، خصوصا از منطقه جزیره هرمز که گزارشی از آن تا به حال ثبت نشده است، گام اولیه‌ی این گونه پژوهش‌ها در این مناطق است.

کلمات کلیدی: کیتیناز، آرکیا، کیتین کلوئیدال، جزیره هرمز.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۹ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۰

مقدمه

تعداد مشخصی از بیوپلیمرهای تجدید پذیر وجود دارند که به‌عنوان مواد اولیه اصلی برای فرآیندهای مختلف زیستی به کار می‌روند. کیتین یکی از بیوپلیمرها و یک پلی ساکارید نامحلول، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار، غیر سمی و جزء ساختاری بسیاری از موجودات مانند سخت پوستان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، بی‌مهرگان دریایی است که توسط کیتینازها تخریب می‌شود (۱و۲). کیتین از نظر ساختاری، یک بیوپلیمر متشکل

*) آدرس برای مکاتبه: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران.
تلفن: ۰۹۱۳۲۷۰۷۶۳۲ پست الکترونیک: soheila522003@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

از واحدهای N–استیل D–گلوکزآمین است که با پیوندهای گلیکوزیدی (1-4) β به یکدیگر متصل شده‌اند (۱).

کیتینازها گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم‌ها هستند که کیتین، دومین پلیمر رایج جهان پس از سلولز را تجزیه می‌کنند. این آنزیم، کیتین را به مولکول‌های مونومری تجزیه می‌کند و به این صورت کاربردهای بسیاری در ارتباط با مدیریت آلودگی‌ها و زباله‌های دریایی، مدیریت ضایعات، کنترل زیستی قارچ‌ها و حشرات بیماریزا خصوصا در صنایع کشاورزی، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، پزشکی، تولید پروتین‌های تک سلولی، تولید کیتوالیگوساکاریدها (COS) و جداسازی پروتوپلاست دارد (۲).

برای اولین بار در سال ۱۹۱۱، کیتیناز توسط برنارد به‌عنوان بخشی جدا شده از خمیر ارکیده مشاهده شد که خواص کیتینولیتیک، نفوذ پذیر و پایداری در برابر حرارت را نشان داد (۱). کیتینازها بر اساس توالی ژنی به ٦ کلاس مختلف، بر اساس محل اثر آنزیم (اندوکیتینازها و اگزوکیتینازها) ۲ گروه و بر اساس گلیکوزیل هیدرولازها (طبق توالی اسیدهای آمینه) به ٤ دسته تقسیم می‌شوند (۲و۳). کیتینازهای حاصل از میکروارگانیسم‌ها در بحث صنایع، پایدارتر و مطلوب‌تر هستند (۲).

در زمینه حذف آلودگی‌ها و زباله‌های کیتینی منابع آبی، آنزیم کیتیناز می‌تواند بسیار سودمند و کارآمد باشد؛ زیرا اکثر فرآیندها و ترکیبات شیمیایی مانند مواد قلیایی مختلف (۳–۵٪ NaOH / KOH برای پروتین‌زدایی) و اسیدهای قوی (۱/۲۵ –۲ N/HCl اسید استیک برای دمینرالیزاسیون) که برای تصفیه این زباله‌های زیستی استفاده می‌شوند، از نظر اکولوژیکی، تهاجمی و منبع آلودگی می‌باشند. این مواد شیمیایی مضر مانند اسید و قلیا در محیط آبی منتشر شده و همراه محصولات جانبی صنعت فرآوری میگو به گیاهان و جانوران آبزی آسیب می‌رساند و این در حالی است که استفاده از سلول‌های کامل یا آنزیم‌های آن‌ها برای انجام واکنش‌های شیمیایی جهت حذف کیتین، به روشی سازگار با محیط زیست، جایگزینی برای غلبه بر این مشکلات است (٤).

با توجه به اینکه در فرآیندهای صنعتی، انجام واکنش تحت شرایط سخت صورت می‌گیرد، آنزیم‌ها باید ویژگی‌هایی داشته باشند که آن‌ها را برای این منظور مناسب کند (٤). اکسترموفیل‌ها گروهی از ارگانیسم‌ها هستند که تحت شرایط محیطی شدید مانند دمای بالا و پایین، شوری و فشار سازگار شده‌اند (۵). کیتینازهای اکسترموفیل به دلیل تحمل شرایط شدید و سخت، نسبت به انواع مزوفیل، برای صنعت مناسب‌تر هستند. منابع اصلی برای تولید اینگونه کیتینازها، آرکیا می‌باشند(۲).

در محیط‌های شور، گروه غالب میکروارگانیسم‌ها، هالوفیل‌ها هستند و این میکروارگانیسم‌های هالوفیل عمدتا متعلق به دامنه‌ی آرکیا می‌باشند(٤). هالوآرکیا در یک طیف وسیعی از شرایط استرس (استرس اسمزی ناشی از خشک شدن، غلظت‌های بالای نمک، اشعه یونیزان و اشعه ماوراء بنفش) زنده می‌مانند(۵). همچنین پروتین‌های هالوفیل دارای ترکیب اسید آمینه منحصر به فردی برای سازگاری با غلظت‌های بالای نمک هستند (۳). بنابراین، آنزیم‌های تولید شده توسط هالوفیل‌ها کاندیدهای خوبی برای کاربرد صنعتی محسوب می‌شوند. پایداری و فعالیت این آنزیم‌ها در محیط‌های شدید منجر به کاربردهای بیوتکنولوژیکی آن‌ها شده است (۳). زیست‌بوم‌های شور مختلفی همانند دریاچه‌های نمک، تالاب‌های نمکی و غارهای نمکی که در مناطق مختلف ایران وجود دارند، برای طیف وسیعی از جمعیت‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک مناسب می‌باشند (٦).

با توجه به آنکه بررسی‌ها و جداسازی‌ها در ارتباط با آرکیا نسبت به باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها کمتر است و اینگونه مطالعات در داخل ایران به ندرت انجام شده است، ما برای اولین بار در صدد جداسازی جدایه‌ی هالوآرکیایی مولد کیتیناز از منطقه‌ی جزیره‌ی هرمز به دلیل خاک‌های بکر این منطقه برآمدیم.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه‌ها و جداسازی میکروارگانیسم‌های

اکسترموفیل: تعداد ۲۵ نمونه از آب و خاک‌های متفاوت از نواحی مختلف جزیره هرمز، واقع در خلیج فارس ایران جمع آوری و در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. دمای نگهداری نمونه‌ها، دمای محیط بود. برای جداسازی هالوآرکیا از نمونه‌ها، محیط کشت DSM تهیه شده از ۱۲/۵ درصد نمک، ۰/۰۱۳٪ کربنات کلسیم (CaCl2)، ۰/۱٪ پپتون، ۰/۱٪ عصاره مخمر، ۰/۵٪ گلوکز، ۰/۵٪ پتاسیم سولفات (K2SO4) و ۰/۰۰۲٪ کلرامفنیکل (که پس از اتوکلاو اضافه شد) ساخته و استفاده شد. pH محیط نسبتا اسیدی و نزدیک به خنثی سنجیده شد.

ابتدا ارلن‌های حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت مایع DSM تهیه و سپس نمونه‌ها به آن‌ها افزوده شدند. نمونه‌های خاک به میزان ۱ گرم و نمونه‌ی مایع به میزان ۱ میلی‌لیتر استفاد شدند. ۱۲/۵٪ غلظت نمک در ابتدا برای جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که هالوفیل محسوب می‌شوند، مناسب است. همه نمونه‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس انتقال یافتند. در ادامه جداسازی هالوآرکیا، ارلن‌ها بعد از ۱۴ روز از طریق کشت سطحی به محیط‌های آگاردار با همان ترکیبات محیط DSM اضافه و سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از آن جهت بررسی هر گونه علائم رشد، در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ بررسی شدند. در طی این دوره‌های بررسی و حتی پس از آن، تمامی نمونه‌های رشد یافته به منظور خالص‌سازی، به محیط‌های کشت آگاردار جدیدی انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند.

ب) غربالگری کیفی جدایه‌های مولد کیتیناز: جهت غربالگری کیفی، نمونه‌های رشد یافته در مرحله قبلی (یعنی کشت‌های سطحی)، در محیط‌های کشت آگاردار با ترکیب محیط DSM و با جایگزین کردن کیتین کلوئیدال به جای گلوکز، کشت و سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شدند.

تهیه کیتین کلوییدال: برای تهیه‌ی کیتین کلوئیدال، ۱۰ گرم پوسته میگو به ۱۰۰ سی‌سی اسیدکلریدریک (HCL) ۳۷٪ افزوده و روی شیکر به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۹۶٪ اضافه و pH محیط سنجیده شد تا حتما باید در حد خنثی باشد. در صورت نیاز با افزودن سود (NaOH)۴۰ نرمال خنثی و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۸۰۰rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت پس از دور ریختن مایع رویی و چندین بار شستشو محتویات زیرین با PBS، محتوا تحت دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد.

ج) استفاده از پوسته میگو فراوری نشده به‌عنوان تنها منبع کربن: با توجه به محل جداسازی این جدایه‌ها از مناطق جنوبی ایران و فراوان بودن میزان میگو، ماهی، سایر فراورده‌های دریایی و ضایعات حاصل از آن‌ها در این مناطق، برای بررسی راه‌هایی برای کاهش هزینه‌های تولید این آنزیم، از پوسته میگو به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد.

د) سنجش کمی آنزیم کیتیناز: پس از جداسازی‌ها و غربالگری‌ها، برای انتخاب بهترین جدایه باید از تست و منحنی استاندارد قند N-استیل گلوکز آمین استفاده شود. با روش اصلاح شده تایجی ایموتو و همکاران در ۱۹۷۱ (۷)، در رسم منحنی استاندارد، ابتدا ۵ غلظت (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ میلی‌مولار) از این قند تهیه و پس از مخلوط کردن ۷۵۰ میکرولیتر از هر کدام از این غلظت‌ها با ۱ سی‌سی معرف اشل (Schale) به هر کدام، آن‌ها را در بن ماری ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه می‌جوشانیم و پس از خنک شدن، در طول موج ۵۸۵ نانومتر مقادیر جذب را خوانده و منحنی استاندارد را رسم می‌کنیم. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف ان استیل گلوکز آمین آزاد شده در مدت زمان یک ساعت تعیین شده است و با واحد IU/mL گزارش می‌گردد. یک واحد فعالیت آنزیم کیتیناز (IU/mL)، مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول ان استیل گلوکز آمین در مدت یک ساعت تحت شرایط مورد مطالعه آزاد کند.

برای سنجش میزان آنزیم هر یک از جدایه‌ها نیز، ابتدا ۱۰- ۵ میلی لیتر محیط‌های مایع کیتین کلوئیدال و پوسته میگو در لوله‌ها تهیه و سپس میزان ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌هایی که کدورت معادل نیم مک فارلند آن‌ها ساخته شده، می‌افزاییم. پس از طی شدن دوره‌ی رشد (حدود ۸ تا ۹ روز)، ابتدا آن‌ها را سانتریفیوژ کرده و سپس در لوله‌های دیگر به تعداد نمونه‌ها و برای هر

نمونه ۵۰۰ میکرولیتر محلول کیتین کلوئیدال، ۴۵۰ میکرولیتر بافر استات با pH برابر ۵ و ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را مخلوط و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار می‌دهیم. بعد از این زمان آن‌ها را خارج و ۲۰۰ میکرولیتر سود (NaOH) به‌منظور توقف واکنش افزوده و مجددا سانتریفیوژ می‌کنیم. در ادامه ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی را با ۱ میلی لیتر معرف اشل ترکیب و در بن ماری ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه قرار می دهیم. در انتها میزان جذب آن‌ها را در طول موج ۵۸۵ نانومتر خوانده و ثبت می‌کنیم.

ه) شناسایی میکروسکوپی و بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌ی برتر: همگی جدایه‌ها در محیط کشت TSA برای بررسی هالوتلرانت یا هالوفیل اجباری بودن کشت شدند. سپس بر روی جدایه‌ی منتخب از نظر تولید آنزیم کیتیناز، تست‌های بیوشیمیایی مانند تست سیترات، احیا نیترات، مصرف قندهای مختلف، MR/VP، بررسی‌های میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم طبق روش دوساولت (۸) انجام گرفت.

به‌منظور استخراج DNA باکتری از روش فنل- کلروفرم استفاده گردید. به‌منظور شناسایی جنس باکتری و تکثیر ناحیه 16S rRNA از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی این ژن شامل:

20F (TCCGGTTGATCCTGCCG)
1530R (AAGGAGGTGATCCAGCC)

استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ میلی‌لیتر بافر ۱۰X، ۱۲ میکرولیتر Master mix شرکت تاکارا زاپن، ۱ میکرومول از هرکدام از پرایمرها، ۶ میکرومول آب دیونیزه شده و ۵ میکرولیتر از DNA انجام شد.

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن 16S rRNA، شامل مرحله آغاز ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و مرحله پایان ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. محضولات PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. در نهایت به‌منظور تعیین توالی شناسایی و تأیید سویه انتخاب شده، نمونه به مرکز ذخایر ژنتیکی ایران ارسال گردید. توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA تعیین و با توالی‌های منتشر شده در پایگاه داده‌ها EzTaxon بلاست گردید.

و) رسم منحنی رشد: محیط کشت DSM با کیتین کلوئیدال به‌عنوان تنها منبع کربن به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در لوله‌ها تهیه گردید. از جدایه‌ی مورد نظر که به‌عنوان بهترین جدایه مولد کیتیناز بود، غلظتی معادل غلظت نیم‌مک‌فارلند در آب‌نمک ۱۲/۵٪ تهیه و به محیط‌های کشت داخل لوله‌ها افزوده شد. سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل و میزان رشد و تولید آنزیم کیتیناز به مدت ۱۲ روز سنجیده و ثبت گردید.

ه) بهینه سازی ترکیبات و شرایط محیطی رشد و تولید آنزیم کیتیناز جدایه برتر: برای بررسی اثر دماهای متفاوت (۴، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵) درجه سلسیوس بر روی رشد و تولید آنزیم، تعدادی ارلن حاوی محیط DSM با کیتین کلوئیدال به‌عنوان منبع کربن ساخته شد. سپس از جدایه مورد نظر، غلظتی معادل غلظت نیم‌مک‌فارلند تهیه و به ارلن‌ها اضافه گردید.

در ساخت محیط برای بررسی اثر غلظت نمک، محیط‌های DSM را با کیتین کلوئیدال به‌عنوان منبع کربن اما با درصدهای متفاوت نمک (۵٪، ۱۰٪، ۱۲/۵٪، ۱۵٪، ۲۰٪، ۲۵٪) تهیه و پس از آن جدایه منتخب را با غلظت معادل نیم‌مک‌فارلند، به آن‌ها تلقیح و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.

تعدادی از ترکیبات حاوی کیتین مانند پوسته میگو، کیتین کلوئیدال، گلوکز، پودر مورچه، سبوس برنج و کاه و سبوس گندم برای بررسی تاثیر آن‌ها به‌عنوان منبع کربن استفاده شدند. در ساخت محیط DSM هر بار یکی از این ترکیبات به‌عنوان تنها منبع کربن افزوده شدند. در آخر از جدایه مورد نظر به آن‌ها تلقیح و به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شدند.

تمام محیط‌های آماده و تلقیح شده بعد از مدت ۶ روز تحت سنجش برای بررسی میزان رشد و تولید آنزیم کیتیناز قرار گرفتند.

تمامی آزمایشات به صورت مستقل سه بار تکرار گردید. داده‌ها

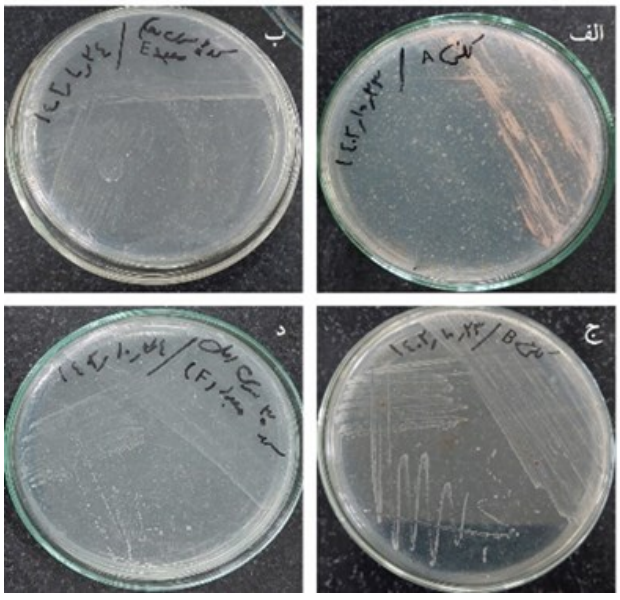
به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. در مقایسه آزمایش‌ها از t-student با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 25 مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

الف) جداسازی میکروارگانیسم‌های اکسترموفیل: از نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جزیره‌ی هرمز ایران، ۶ جدایه به‌دست آمد که به‌ترتیب با حروف A, B, C, D, E,F نامگذاری و خالص سازی گردید.

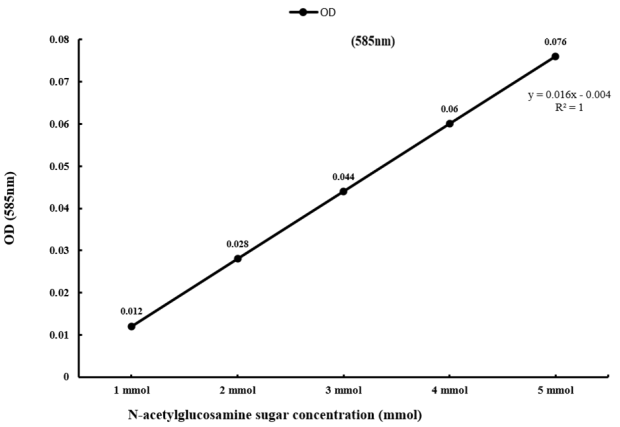
ب) غربالگری کیفی جدایه‌های مولد کیتیناز: پلیت‌های حاوی محیط کشت با کیتین کلوئیدال به‌عنوان تنها منبع کربن تهیه گردید و رشد ۶ جدایه به‌دست آمده، بر روی آن‌ها بررسی شد. هر ۶ جدایه قادر به استفاده از کیتین کلوئیدال به‌عنوان تنها منبع کربن و درواقع مولد کیتیناز بودند. سنجش کمی آنزیم هر کدام و تعیین بهترین جدایه در ادامه پژوهش صورت گرفت.

نتایج بررسی رشد روی محیط DSM با پوسته میگو به‌عنوان تنها منبع کربن نشان داد که از میان ۶ جدایه، همه جدایه‌ها به جز جدایه‌های C و D، توانایی رشد روی پوسته میگو را داشتند (شکل ۱).



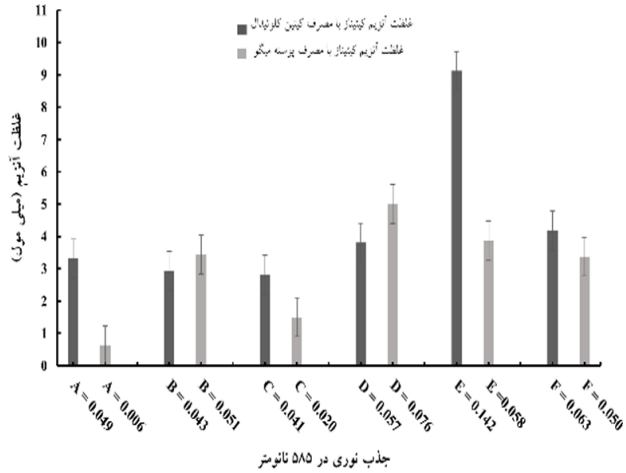
شکل ۱: کشت بر روی پوسته میگو؛ الف: جدایه A، ب: جدایه E، ج: جدایه B، د: جدایه F.

ج) سنجش کمی میزان آنزیم کیتیناز: طبق معادله خط به‌دست آمده از منحنی استاندارد قند N-استیل گلوکز آمین (شکل ۲) و محاسبه میزان غلظت قند آزاد شده (فعالیت آنزیم) با توجه به میزان جذب نوری هر جدایه، جدایه‌ی E، بالاترین میزان آنزیم کیتیناز (۹/۱۲۵IU/mL) را بر روی کیتین کلوئیدال تولید کرد و به‌عنوان بهترین جدایه در این پژوهش انتخاب گردید (شکل ۳).



شکل ۲: نمودار استاندارد قند N-استیل گلوکز آمین.

همچنین با محاسبه غلظت آنزیم تولید شده توسط هر جدایه رشدیافته در محیط حاوی پوسته میگو به‌عنوان تنها منبع کربن، جدایه D با میزان ۵IU/mL غلظت آنزیم، بیشترین میزان تولید آنزیم را داشت (شکل ۳).

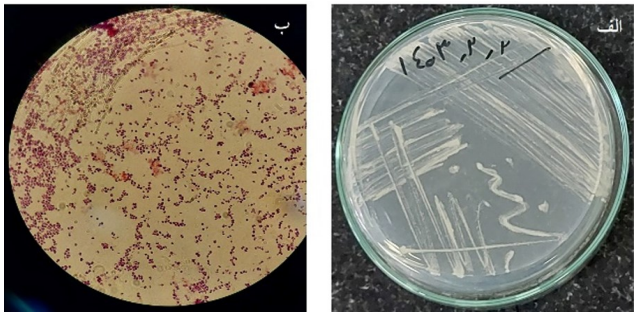


شکل ۳: غلظت آنزیم کیتینازتولید شده توسط جدایه E.

د) ویژگی‌ها و خصوصیات جدایه آرکیایی برتر مولد کیتیناز: جدایه‌ی منتخب E، از بین ٦ جدایه بر اساس مشاهدات منطبق با شکل ٤، دارای کلنی‌های مدور و نسبتا محدب سفیدرنگ بود و در رنگ‌آمیزی گرم، گرم منفی با اشکال متفاوت (پلی‌مورفیسم) در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد.

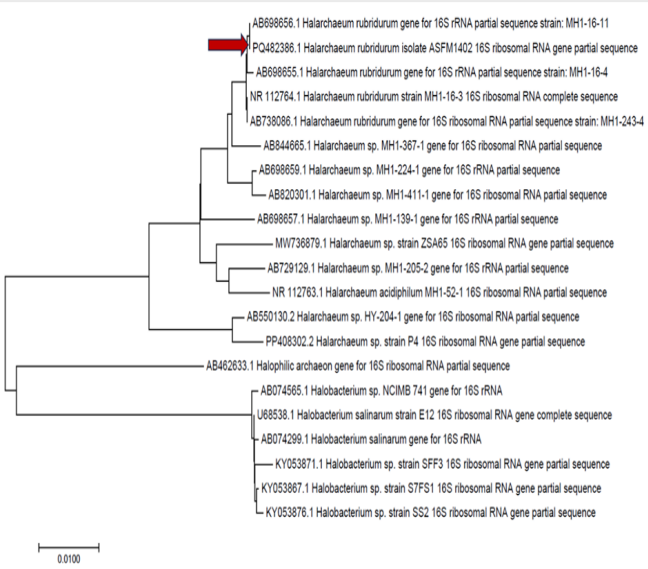
این جدایه توانایی رشد در TSA را دارد که به معنای هالوتولرانت بودن آن است. همچنین قادر به مصرف قندهای گلوکز، لاکتوز، گزیلوز، فروکتوز و آرابینوز است. در حالی که توانایی استفاده از قندهای مانیتول، ساکارز (سوکروز)، رامنوز و سوربیتول را نداشت. VP، H2S آن منفی اما سیترات، نیترات، اندول، حرکت و MR آن مثبت بود.

پس از استخراج DNA، PCR وتعیین توالی ژن 16S rRNA، نتایج تعیین‌توالی با استفاده از نرم افزارجستجوگر BLAST در سایت NCBI با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه گردید. نتایج حاصل از توالی‌خوانی ژن 16S rRNA نشان دادند که سویه مذکور با ۱٤۷٦ نوکلئوتید به میزان ۹۹٪ با سویه *Halarchaeum rubridurum* قرابت فیلوژنی داشت. این سویه به نام *Halarchaeum rubridurum* ASFM1402 نامگذاری و با شماره دسترسی Gen bank PQ482386 در پایگاه داده NCBI به ثبت رسید.



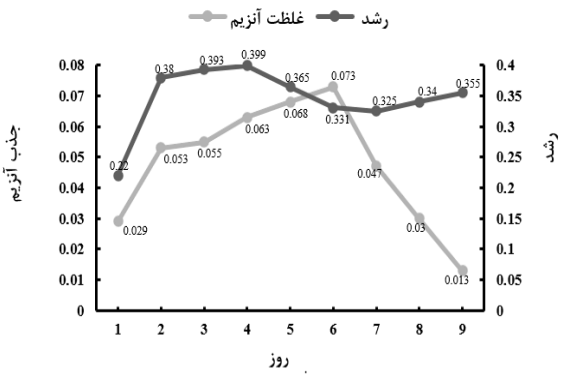
شکل ٤: الف: کشت جدایه E بر روی محیط DSM، ب: رنگ‌آمیزی گرم جدایه E با بزرگنمایی x100.

در شکل ٥ درخت فیلوزنی سویه قابل مشاهده است.



شکل ٥: درخت فیلوژنی سویه *Halarchaeum rubridurum* ASFM1402

ه)ارتباط منحنی رشد و تولید آنزیم: بر اساس نتایج به‌دست آمده و قابل مشاهده در شکل ٦، رشد و تولید آنزیم این جدایه در سنجش در روزهای متوالی، به طور کامل با هم منطبق نبود. در مدت زمان سنجش مداوم آنزیم و رشد جدایه E، به مدت ٦ روز، این زمان به‌عنوان بهترین مدت زمان برای تولید بالاترین میزان آنزیم کیتیناز این جدایه به‌دست آمد.



شکل ٦: منحنی رشد و تولید آنزیم کیتیناز سویه E.

و) بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آنزیم کیتیناز جدایه برتر: در بررسی شرایط رشد و تولید آنزیم، مصرف کیتین کلوئیدال به‌عنوان منبع کربن به همراه غلظت نمک ۱۲/۵٪، و دمای انکوباسیون ۳۵ درجه سلسیوس به‌عنوان شرایط بهینه رشد و تولید آنزیم مشخص شد.

همان‌گونه که در شکل ۷ نشان داده شده است، رشد این سویه در غلظت‌های نمک پایین‌تر در بالاترین میزان خود قرار داشت و با افزایش میزان غلظت نمک، میزان رشد کاهشی بود در صورتی که بالاترین میزان تولید آنزیم در غلظت ۱۲/۵٪ مشاهده گردید. همچنین با آنکه کیتین کلوئیدال به‌عنوان منبع کربن، نسبت به سایر منابع رشد بسیار کمتری را ایجاد می‌کند، اما بیشترین میزان تولید آنزیم مربوط به آن است.

بحث

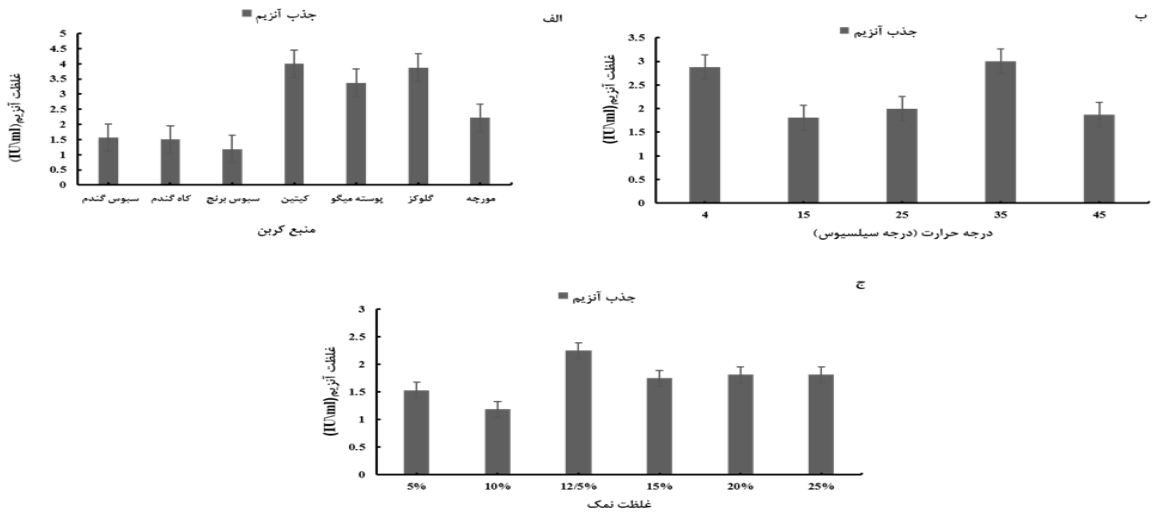
در محیط‌های با شوری بالا، شرایط مختلف دیگری مانند دما، فشار، خشکی، کمبود مواد مغذی، ارتفاع و pH نیز ممکن است دیده شود (۹). جمعیت میکروبی غالب در این محیط‌ها، هالوفیل‌ها خصوصا هالوآرکیا، می‌باشند (٤). آرکیای هالوفیل که برای رشد نیازمند غلظت‌های بالای نمک بین ٦-۲ مولار هستند، سازگاری‌های متابولیکی متفاوتی برای تحمل این شرایط سخت پیدا کرده‌اند (۹). بدین صورت آنزیم‌های این نوع از میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای صنعتی مناسب‌تر و کارآمدتر خواهند بود (۳).

هالوآرکیا در ارتباط با فساد محصولات نمکی مانند ماهی شور و یا پوست‌های دباغی شده در صنعت چرم، شناخته شدند و در ژنوم خود ژن‌های مقاوم به نمک زیادی دارند (۵).

کیتینازها به دلیل قابلیت هیدرولیز کیتین در اسکلت بیرونی حشرات، دیواره سلولی قارچ‌ها، تجزیه‌ی ضایعات کیتینی دریایی کاربردهای بیوتکنولوژیکی مختلفی دارند. در سال‌های گذشته، جدایه‌های باکتریایی و قارچی مختلف جداسازی، خالص‌سازی و مشخص شده‌اند که کیتینازها را سنتز می‌کنند (۱). با این حال کیتینازهای آرکیایی در کنار دیگر کیتینازهای باکتریایی از منابع مهم و اصلی تولید کیتینازهای اکسترموفیل محسوب می‌شوند (۲).

کشف و توصیف اولین هالوآرکئا در سال ۱۹۸۰ توسط آنتونی‌والس‌بی انجام گرفت و به نام *هالوکوادراتوم والس‌بی* شناخته شد؛ اگرچه تا ۲۵ سال بعد موفق به کشت این میکروارگانیسم نبودند (۱۰).

در سال ۲۰۱۳، اولین بررسی تنوع آرکی‌های نمک‌دوست قابل کشت در تالاب اینچه‌برون، به‌عنوان محیطی منحصر به فرد با هدف بررسی گوناگونی و شناسایی آرکی‌های نمک‌دوست ساکن و تعیین نقشه زیستی این محل، توسط مهرنوش رسولی و همکاران در ایران انجام شد (۱۱). همچنین تحقیقی برای اولین بار در زمینه‌ی فعالت ژن کیتیناز در جنس *ناترینما* (*Natrinema*) جداسازی شده از دریاچه ارومیه با استفاده از PCR و بررسی‌های کمی توسط مریم یاوری و همکاران در سال ۲۰۱۹ در ایران انجام شد (۳).



شکل ۷: نمودارهای بهینه سازی جدایه E، الف) بهینه سازی منبع کربن، ب) بهینه درجه حرارت، ج) غلظت نمک بهینه.

زیست بوم‌های پرشور مختلف در ایران، زیستگاه بسیار مناسبی برای حضور طیف گسترده‌ای از گروه‌های فیلوژنی نمک دوست و تحمل کننده نمک می‌باشد. حضور فراوان گاما پروتئوباکترها و هالوآرکیا به ترتیب از گروه باکتری‌ها و آرکیا در دریاچه میقان، نتیجه‌ای بود که در مطالعه‌ی ناقونی (Naghoni) و همکاران در سال ۲۰۱۹ به‌دست آمد (٦).

با توجه به عدم وجود گزارشاتی در زمان نگارش این مقاله از جداسازی هالوآرکیای مولد کیتیناز در منطقه‌ی جزیره‌ی هرمز، این پژوهش اولین بررسی در این زمینه محسوب می‌شود. ما با بررسی نمونه‌هایی از مناطق مختلف جزیره هرمز، به جستجوی جدایه‌های هالوآرکیایی مولد کیتیناز پرداختیم. بر اساس گزارش‌هایی مانند بررسی دیتر الهارد و همکاران ۱۹۸۲ (۱۲)، آرکیا، برخلاف آنیزومایسین، نسبت به کلرامفنیکل حساس نبوده و به‌همین دلیل برای جداسازی آرکیا از همان مراحل اولیه به ترکیب محیط کشت کلرامفنیکل اضافه شد تا از رشد باکتری‌ها در یک طیف وسیع ممانعت نماید و به این گونه ما تنها شاهد رشد آرکیا در محیط بودیم.

در این پژوهش بهترین جدایه مولد کیتیناز (از نظر مصرف کیتین کلوئیدال) از مناطق مختلف جزیره‌ی هرمز را با تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی بررسی نمودیم. جدایه‌ی منتخب دارای کلنی‌های محدب، کروی و سفید با تست حرکت، سیترات، نیترات، اندول و MR، مثبت بود در حالی که VP، H_2S ان منفی بودند.

در ادامه‌ی روند جداسازی و مشخص کردن جدایه‌ای با توانایی بهتر در تولید کیتیناز از کیتین کلوئیدال که معمولا در غربالگری‌های کیفی به شیوه‌ی استاندارد پرکاربرد است استفاده شد. به علت فراوان و متمرکز بودن صنعت شیلات در نواحی جنوبی کشور و ضایعات کیتینی حاصل از آن‌ها، جدایه‌ها از نظر رشد بر روی محیط حاوی پوسته میگو فراوری نشده، همچنین مصرف این ماده به‌عنوان تنها منبع کربن و تولید آنزیم نیز بررسی شدند. میزان جذب نوری و غلظت آنزیم جدایه E به ترتیب با مصرف کیتین کلوئیدال ۰/۱٤۲ و ۹/۱۲۵mmol و با مصرف پوسته میگو ۰/۰۵۸ و ۳/۸۷۵mmol بود.

نحوه سنجش آنزیم در پژوهش‌هایی همانند بررسی فعالیت ژن کیتیناز در جنس *ناترینما* (*Natrinema*) با استفاده از PCR و بررسی‌های کمی توسط مریم یاوری و همکاران در سال ۲۰۱۹ در ایران (۳) و پژوهش چن، لینا و همکاران ۲۰۱۹ یک کیتیناز آرکیا با ظرفیت ثانویه برای کاتالیز سلولز و کاربردهای بیوتکنولوژیکی آن در تخریب پوسته و کاه (۱۳)، روش DNS (۳,۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید) بود که این روش میزان هر نوع قند احیاکننده آزاد شده را سنجش می‌کند؛ در حالی که ما در پژوهش خود برای سنجش آنزیم کیتیناز از معرف اشل استفاده کردیم که اختصاصا میزان قند N-استیل گلوکز آمین را می‌سنجد. در این صورت نتیجه‌ی دقیق‌تری نسبت به تحقیقات و بررسی‌هایی که در آن از روش DNS (۳,۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید) استفاده شده، به‌دست می‌آید.

برای جداسازی آرکیا و باکتری‌های نمک‌دوست اجباری محیط‌های MGM و JCM 168 محیط‌های مناسبی معرفی شده است، در حالی که محیط‌های MH1 و JCM، محیط‌هایی هستند که می‌توان با آن‌ها جداسازی میکروارگانیسم‌های اسید دوست یا قادر به رشد بهینه در pH اسیدی را انجام داد (۱۱). در بررسی حاضر، با توجه به غلظت نمکی (۱۲/۵ درصد) که در محیط DSM استفاده شده بود، توانستیم انواع هالوفیل‌های اجباری متوسط و هالوتولرانت‌ها را جدا سازی نماییم.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش با نمونه برداری از چندین بخش جزیره هرمز اولین جداسازی تعدادی از میکروارگانیسم‌های آرکیا در این منطقه انجام گرفته و پس از بررسی‌ها و غربالگری‌های صورت گرفته، بهترین جدایه مولد کیتیناز با استفاده از کیتین کلوئیدال، جداسازی شد و مورد بررسی‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی قرار گرفت. جدایه به‌دست آمده قادر به رشد بر روی پوست میگو به‌عنوان تنها منبع کربن می‌باشد که بهره‌وری تولید کیتیناز را در صنایع افزایش می‌دهد. قابلیت‌های بکر و جمعیت‌های آرکیایی شناسایی نشده در این منطقه و کاربردهای بسیاری که می‌توانند در صنایع گوناگون داشته باشند، می‌توانند در آینده

محور پژوهش‌های دیگر قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اشرفی اصفهانی اصفهان انجام گردیده است. بدین وسیله از مسئوولین این دانشکده تشکر و قدردانی می‌نماییم.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Singh RV, Sambyal K, Negi A, Sonwani S, Mahajan R. Chitinases production: A robust enzyme and its industrial applications. Biocatalysis and Biotransformation. 2021 May 4;39 (3):161-89.
2. Poria V, Rana A, Kumari A, Grewal J, Pranaw K, Singh S. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. Biology. 2021 Dec 12;10(12):1319.
3. Yavari-Bafghi M, Babavalian H, Amoozegar MA. Isolation, screening and identification of haloarchaea with chitinolytic activity from hypersaline lakes of Iran. Archives of Biological Sciences. 2019;71(1):71-81.
4. Dayakar B, Xavier KM, Das O, Porayil L, Balange AK, Nayak BB. Application of extreme halophilic archaea as biocatalyst for chitin isolation from shrimp shell waste. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2021 Dec 25;2:100093.
5. Abbasi S, Emtiazi G. Antimicrobial peptides of haloarchaea: Properties and applications of halocin. Journal of Microbial World. 2022 Sep;15(2):88-108. [In Persian]
6. Layalestani SS, Shavandi M, Haddadi A, Ali M, Amoozegar SM. Bacterial community structure in saline sediments from hypersaline wetland in south of Halghe Dare hills, Alborz province. Journal of Microbial World. 2020 Sep;13(3):215-27. [In Persian]
7. Imoto T, Yagishita K. A simple activity measurement of lysozyme. Agricultural and Biological Chemistry. 1971;35(7):1154-6.
8. Dussault HP. An improved technique for staining red halophilic bacteria. Journal of bacteriology. 1955 Oct;70(4):484-5.
9. Moopantakath J, Imchen M, Anju VT, Busi S, Dyavaiah M, Martínez-Espinosa RM, Kumavath R. Bioactive molecules from haloarchaea: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. Frontiers in Microbiology. 2023 Mar 31;14:1113540.
10. Bolhuis H, Palm P, Wende A, Falb M, Rampp M. Rodriguez-Valera F, Pfeiffer F, Oesterhelt D. The genome of the square archaeon Haloquadratum walsbyi: life at the limits of water activity. BMC genomics. 2006 Dec;7:1-2.
11. Rasouli, M., M.A. Amouzgar, and A. Akhwan Sepehi. Isolation and identification of cultivable obligate salt-loving archaea in Inche Brun's brackish lagoon, Golestan province. 2012. [In Persian]
12. Elhardt D, Böck A. An in vitro polypeptide synthesizing system from methanogenic bacteria: sensitivity to antibiotics. Molecular and General Genetics MGG. 1982 Nov;188(1):128-34.
13. Chen L, Wei Y, Shi M, Li Z, Zhang SH. An archaeal chitinase with a secondary capacity for catalyzing cellulose and its biotechnological applications in shell and straw degradation. Frontiers in microbiology. 2019 Jun 11;10:1253.