بررسی تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتریهای بومی دریاچه خزر

زینت دهقانی جویباری[۱]، علی مخدومی کاخکی[۲]، رضا پورغلام[۳]، منصور مشرقی[٤]، خدیجه جامی الاحمدی[٥]

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی - گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه فردوسی مشهد

۲ - عضو هیات علمی - گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه فردوسی مشهد

۳ - عضو هیات علمی و رئیس پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر- ساری

٤ - عضو هیات علمی - گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه فردوسی مشهد

٥ - عضو هیات علمی- گروه علوم و فنون نوین – دانشگاه علوم پزشکی مشهد

a.makhdomi@um.ac.ir ; zin.dehghanie@gmail.com

چکیده

کیتین دومین پلیمر فراوان در طبیعت و فراوانترین بیوپلیمر در محیط دریا میباشد . کیتیناز آنزیم تجزیه کننده کیتین، کاربردهای وسیعی در زمینه کشاورزی، دارویی و صنایع مختلف دارد. محیطهای دریایی منبع عظیمی برای جداسازی میکروارگانیسمهای مختلف با توانمندیهای بیوتکنولوژیک میباشند که تاکنون به میزان اندکی مورد توجه قرار گرفتهاند. در این مطالعه به منظور بررسی توانمندی بیوتکنولوژیک میکروارگانیسمهای بومی دریاچه خزر نمونهبرداری از سه عمق ۰/۵ ، ۱۵ و ۳۰ متر در چهار منطقه بهشهر، بابلسر، نوشهر و تنکابن انجام و با استفاده از محیط- روشهای کشت مختلف تعداد ۳۰۰ جدایه باکتری بدست آمد. بررسی تولید آنزیم کیتیناز به روش کیفی با افزودن (W/V) ۲/۵٪ کیتین کلوئیدی به محیط پایه نمکی واجد ۲ گرم بر لیتر عصاره مخمر انجام شد. تولید کیتیناز با ایجاد هاله تجزیه کیتین در اطراف کلنی باکتری مشخص گردید. ۱۲ سویه باکتری توانایی ایجاد هاله را داشته و به عنوان سویههای واجد آنزیم کیتیناز در نظر گرفته شدند. این سویهها شامل یک سویه گرم مثبت و یازده سویه گرم منفی و با اشکال میکروسکوپی باسیل (۱۱ سویه) و کوکسی (یک سویه) بوده اند. این سویهها گزینه مناسبی جهت کاربردهای بیوتکنولوژیک مانند تبدیل کیتین به محصولات باارزش دیگر و همچنین کاربرد در کنترل زیستی آفات میباشند.

واژههای کلیدی: کیتیناز، بیوتکنولوژی دریا، دریاچه خزر

مقدمه

اقیانوسها بیشتر از ۷۰٪ سطح زمین را پوشانده و از میلیونها سال پیش به عنوان منشا زندگی در زمین در نظر گرفته شدهاند. تکامل، میکروارگانیسمها ی دریایی را وادار میکند تا سیستم -های آنزیمی گوناگونی برای سازگاری با محیطهای پیچیده دریا تولید کنند . بنابراین آنزیمهای میکروبی دریایی میتوانند به عنوان منابع بیوکاتالیستهای جدید با ویژگیهای فوقالعاده در نظر گرفته شوند. با ظهور بیوتکنولوژی در قرن اخیر، تقاضا برای آنزیمهایی با ویژگیهای جدید رشد قابل توجهی داشته است. به همین علت بیوکاتالیستهای دریایی با داشتن ویژگیهایی مانند تحمل نمک، پایداری دمایی بالا، تحمل فشار و غیره به شدت مورد توجه قرار گرفتهاند (۱). کیتیناز (EC 3.2.1.14) آنزیم تجزیه کنندهی کیتین می باشد. کیتین دومین پلیمر فراوان در طبیعت و فراوانترین بیوپلیمر در محیط دریا میباشد (۲). تولید سالیانه و پایدار آن

10^{10}-10^{11} تن تخمین زده شده است(۳). این آنزیم در دامنه وسیعی از ارگانیسمها شامل ویروسها، باکتریها (*Bacillus*، *Aeromonas*، *Vibrio*، *Pseudomonas*، *Serratia*، *Entrobacter*، *Actinomycetes*)، قارچها، حشرات، گیاهان آلی و حیوانات وجود دارد که نقش آن در هریک متفاوت است. اخیرا فعالیت کیتیناز در سرم انسان نیز بررسی شده و نقش پیشنهادی دفاع در برابر پاتوژنهای قارچی است. (۵). کیتینازها کاربردهای وسیعی در بیوتکنولوژی دارند که از جمله آنها می توان به تولید پروتئینهای تکیاخته، تولید کیتواولیگوساکارید ها، ایزوله کردن پروتوپلاست، هدف برای حشرهکشهای زیستی ، تخمین بیوماس قارچی ، کنترل حشرات و پزشکی اشاره کرد(٤). در این پژوهش به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم کیتیناز در سویههای باکتری بومی دریاچه خزر، باکتریها از مناطق و اعماق مختلف دریا جداسازی و توانایی تولید آنزیم کیتیناز در آنها با روش کیفی ارزیابی گردیده است.

مواد و روشها

نمونهبرداری و جداسازی باکتریها

نمونهبرداری از آبهای مناطق بهشهر، بابلسر، نوشهر و تنکابن از اعماق ۰/۵ ، ۱۵ و ۳۰ متر و نمونه رسوب از بستر عمق ۳۰ متر در آبان ماه ۱۳۹۱ انجام پذیرفت. نمونهها در تاریکی و دمای محیط به آزمایشگاه منتقل گردید. بخشی از نمونههای به دست آمده جهت انجام آنالیزهای فیزیکو- شیمیایی استفاده شد. جداسازی میکروارگانیسمها با استفاده از محیط -های کشت زیر انجام گردید: ۱) محیط کشت مارین آگار، ۲) محیط کشت حاوی نمکهای معدنی (g/l) : $(NH_4)_2SO_4$, 0.86 ; $MgCl_2.6H_2O$, 0.17 ; $CaCl_2.2H_2O$, 0.22 ; $FeSO_4.7H_2O$, 0.009 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.75 ; NaCl, 9.1 ;KCl , 0.13 ; به همراه پپتون (g/l) ۱۰ ; عصاره مخمر (g/l) ۵ ، گلوکز (g/l) ۲ و آگار (g/l) ۱۵. pH این محیط با استفاده از NaOH ۲ نرمال ۸/۲ تنظیم شده است. ۳) محیط حاوی ترکیبات نمکی بالا به همراه غلظتهای (g/l) پپتون ۱، عصاره مخمر ۰/۵ ، گلوکز ۰/۵ و آگار (g/l) ۱۵. pH این محیط با استفاده از NaOH ۲ نرمال در ۸/۲ تنظیم شده است. ٤) آب دریای فیلتر شده توسط فیلتر میکروبی ۰/٤٥ µm به همراه غلظتهای (g/l): پپتون ۱۰ ; عصاره مخمر ۵ ; گلوکز ۲ و آگار ۱۵ (pH= 8.2). پس از تهیه رقتهای مناسب از آب دریا و رسوب در سرم فیزیولوژی استریل (۹ گرم در لیتر NaCl) از رقت مناسب بر روی محیطهای کشت تلقیح گردید و محیطهای کشت، حداقل به مدت یک ماه در دمای ۲۰°C نگهداری شدند. با انجام کشتهای متوالی کشت خالص از جدایههای دریایی بهدست آمد.

تهیه کیتین کلوئیدی

به منظور تهیه کیتین کلوئیدی به ۵ گرم پودر کیتین (مرک) به تدریج و به همراه همزدن ۹۰ میلیلیتر اسیدکلریدریک غلیظ افزوده و مخلوط حاصله به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق همزده میشود. سپس ۵۰۰ میلیلیتر اتانل ۹٦٪ با برودت 0°C در حال همزدن به آن افزوده میشود تا رسوب ژلهای کیتین تشکیل شود. نمونه به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری می شود. رسوب ژلهای مورد نظر با سانتریفیوژ جمعآوری شده و با بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=7) شسته میشود تا کیتین کلوئیدی با pH خنثی بهدست آید(٦).

بررسی فعالیتهای کیتینازی در باکتریهای جدا شده

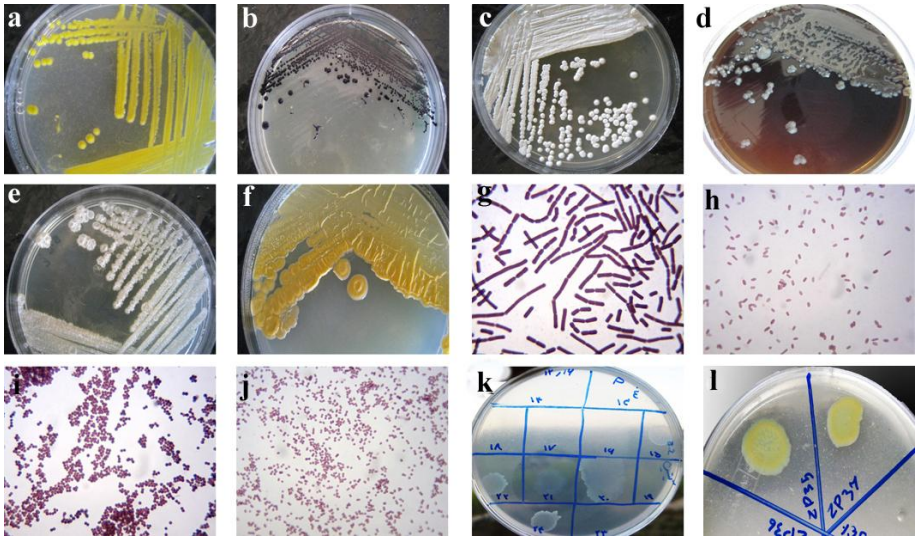
شناسایی باکتریهای کیتینولیتیک بهواسطه کشت جدایههای بهدست آمده در محیط کشت حاوی نمکهای معدنی و (g/l) ۲عصاره مخمر استفاده شده است. به این محیط غلظت (w/v) ۲/۵٪ کیتین کلوئیدی افزوده شده است. غلظت استاندارد از هر جدایه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه (معادل استاندار ۰/۵ مک فارلند) و µl ۱۰ از سوسپانسون باکتری به محیط بررسی

آنزیم کیتیناز تلقیح شد. محیطهای کشت به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۰ °C نگهداری شدند. ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی باکتریها نشان دهنده وجود فعالیت کیتینازی در میکروارگانیسم مورد نظر میباشد.

نتایج و بحث

آنالیز نمونهها و کشت باکتریها: نمونهها پس از انتقال به آزمایشگاه از نظر میزان شوری و ترکیب نمکها مورد بررسی قرار گرفتند. شوری آب دریاچه ۱/۳٪ بوده است. غلظت آنیونها و کاتیونهای آب دریاچه به شرح زیر بوده است (g/l): بی کربنات (0.26)، کلرید (5.3)، سولفات (2.9)، کلسیم (0.3)، منیزیم (0.6)، پتاسیم (0.07)، سدیم (3.11)، آهن (ناچیز) و منگنز (ناچیز). pH نمونه آب ۸/۲ و دمای آن در زمان نمونهبرداری در هر سه عمق C ° ۲۰-۱۹ بوده است.

در این پژوهش تعداد ۳۰۰ جدایه باکتری با کشت نمونههای آب و رسوب دریاچه خزر بر روی محیطهای کشت متفاوت بهدست آمد. تعداد کلنیهای خالص شده از چهار نمونه عمق ۰/۵ ، ۱۵ ، ۳۰ متر و رسوب بستر دریا به ترتیب ۶۲، ٦٤، ۹۳ و۸۱ جدایه بوده است. جدایهها از نظر رنگ، اندازه، شکل کلنی، شکل میکروسکوپی و واکنش گرم تنوع وسیعی داشتهاند (شکل ۱). از این تعداد ۱۰۵ سویه گرم مثبت (٦٥ باسیل، ٣٤ کوکسی، ٦ کوکوباسیل) و ۱۹۵ سویه گرم منفی (١٤٦ باسیل، ۳۱ کوکسی، ۱۸ کوکوباسیل) بوده است.



شکل ۱. ویژگیهای باکتریهای جدا شده. a-f: شکل کلنی و j-g: شکل میکروسکوپی برخی از جدایهها؛ k-l: بررسی کیفی تولید آنزیم کیتیناز با ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی باکتری.

بررسی فعالیت کیتینازی در جدایهها: از مجموع ۳۰۰ جدایه بهدست آمده ۱۲ سویه در محیط کشت بررسی کیفی آنزیم کیتیناز هاله شفاف تشکیل داده و به عنوان سویههای کیتیناز مثبت در نظر گرفته شدند. از این تعداد ۱۱ سویه، باکتریهای گرم منفی (۱۰ باسیل و یک کوکسی) و ۱ سویه باکتری گرم مثبت (باسیل) بوده است. مقایسه میزان تولید هاله در این سویهها مشخص نمود توانایی تولید کیتیناز در این سویهها متفاوت و قطر هاله شفاف از ۱۰-۲ میلیمتر متغیر بوده است. باکتریهای بهدست آمده گزینههای مناسبی جهت استفادههای بیوتکنولوژیک در تبدیل کیتین ارزان قیمت به محصولات باارزش دیگر میباشند. مطالعات بیشتر جهت بررسی کمی میزان تولید آنزیم و اثر فاکتورهای مختلف بر تولید و همچنین شناسایی سویهها در حال انجام می-باشد.

منابع

1. **Zhang. C and Kim S.K.**, **2010**, *Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects.* Marine drugs. **8**(6): p. 1920-1934
2. **Bansode. V.B and Bajekal .S.S**, **2006**, *Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar lake.* Indian Journal of Biotechnology. **5**(3): p. 3-363
3. **Beier. S**, **2010** ,*Bacterial degradation and use of chitin in aquatic habitats*, Uppsala University.
4. **Dahiya. N, Tewari. R, and Hoondal. G..**, **2006**, *Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review.* Applied microbiology and biotechnology. **71**(6): p. 773-782.
5. **Patil. R.S., Ghormade. V, and Deshpande. M.V**, **2000**, *Chitinolytic enzymes: an exploration.* Enzyme and Microbial Technology. **26**(7): p. 473-483.
6. **Jami al Ahmadi. K , Tabatabaei Yazdi. M , Fathi Najafi. M , Shahverdi. A.R , Faramarzi. A.M , Zarrini. Gh and Behravan. J** , Isolation and characterization of a chitinolytic enzyme producing microorganism , *paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran , **2008** , research Jeurnal of Microbiology **3**(6) : 395-404

Study of chitinase production by native bacterial strains from Caspian Sea

Zinat Dehghani Joybari, Ali Makhdoumi-Kakhki, Reza Pourgholam, Mansour Mashreghi, Khadijeh Jamialahmadi

Abstract

Chitin is the second most abundant biopolymer on the earth and the most common polymer in the marine environments. Chitinase catalyzes the degradation of chitin and has a broad range of application in agricultural, pharmaceutical and various chemical industries. Marine environments are the great source for the isolation of microorganisms with valuable biotechnological application. In this study in order to isolation the native Caspian Sea bacterial strains with chitinolytic activity; sampling was carried out at different depths including 0.5, 15 and 30 meter from four regions; Behshahr, Babolsar, Nowshar and Tonekabon. A total of 300 isolates were obtained by various media-culture methods. Production of chitinase from these isolates were studied qualitatively in the defined media containing salt solution supplemented by 2(g/l) yeast extract. 2.5% (w/v) of colloidal chitin was added to this media. The clear zones around colonies after 15 days incubation of cultures at 20°C indicated qualitative chitinase activity. A total of 12 strains were identified as chitinase producing bacteria. Of them 11 strains were Gram negative and one strain was Gram positive. The microscopic study of these strains indicated most of them (11 strains) had rod shape and one strain was appeared as coccoid cell. These strains are good candidate for the biotechnological application like converting of chitin to renewable sources and bio-control of plant pathogens.

Keyword: Chitinase, Marine Biotechnology, Caspian Sea