

جداسازی بروی باکتریوم (*Brevibacterium*) بومی با فعالیت لاکازی خارج سلولی از رسوبات ساحل دریاچه ارومیه



بابک حاجی زاده^۱، نیما شیخ بیگلر^{۱*}، مهدی ایمانی^۲، رشید جامعی^۱

^۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۱

چکیده

لاکازها پلی‌فنل اکسیدازهای حاوی مس، دارای کاربردهای متنوعی در بیوتکنولوژی و صنایع مختلف، بویژه صنایع با غلظت بالای نمک نظیر صنایع پالپ و خمیر، دباغی‌ها و صنایع نساجی هستند. در این پژوهش برای جداسازی باکتری‌های تولیدکننده لاکاز از رسوبات ساحل دریاچه شور ارومیه، محیط‌های کشت باکتریایی مایع و جامد حاوی سولفات مس (3mM) و گایاکول (0.01% w/v) استفاده شدند. باکتری‌های ایجادکننده کلنی قهوه‌ای مایل به قرمز روی محیط کشت حاوی گایاکول، به عنوان سویه‌های باکتریایی تولیدکننده لاکاز مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. فعالیت آنزیم لاکاز داخل سلولی و خارج سلولی بوسیله اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۲۰ nm و با استفاده از ABTS (2,2-azino-di-[3-ethylbenzo-thiazolin-sulphonate]) به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از چهار سویه باکتریایی جدا شده از رسوبات دریاچه ارومیه با استفاده از محیط کشت حاوی گایاکول، تنها یک سویه با فعالیت لاکازی قابل توجه به صورت خارج سلولی تشخیص داده شد. مطالعه میکروسکوپی و تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA نشان داد که این سویه گرم مثبت، میله‌ای شکل و متعلق به جنس بروی باکتریوم است و *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 نام گذاری شد. توالی 16S rRNA *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 شماره MN588176.1 در GenBank قابل دسترسی است. با توجه به فعالیت لاکازی مناسب، بروی باکتریوم جدا شده در این مطالعه جهت استفاده در صنایع مرتبط با آنزیم لاکاز می‌تواند مفید واقع شود. همچنین دریاچه شور ارومیه دارای پتانسیل بالقوه بالا جهت جداسازی میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تولید آنزیم‌های خاص نظیر لاکاز با قابلیت استفاده در شرایط شوری است.

واژه‌های کلیدی: لاکاز، دریاچه شور ارومیه، بروی باکتریوم

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۱۰۴، پست الکترونیکی: n.baygloo@urmia.ac.ir

مقدمه

دمتیلاسیون دارند (۶، ۱۳، ۳۹ و ۴۳). با توجه به متنوع بودن سوبستراهای لاکازها و گسترده بودن کاربردهای بیوتکنولوژی آن‌ها، استفاده از لاکازها در صنایع مختلف از جمله تهیه خمیر کاغذ، صنایع نساجی (رنگ‌زدایی از پساب، سفید کردن منسوجات، سنتز رنگ)، تولید کامپوزیت چوب، تهیه پارچه‌های جین در رنگ‌های مختلف، طراحی بیوسنسورها و سوخت‌های زیستی، سنتز

لاکازها (EC 1.10.3.2) پلی‌فنل اکسیدازهایی هستند که اکسیداسیون طیف وسیعی از مواد شامل ترکیبات مختلف آروماتیک و غیر آروماتیک، بویژه گروه‌های دهنده الکترون مانند فنل‌ها (-OH) و آنیلین‌ها (-NH₂) را با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان گیرنده الکترون، کاتالیز می‌کنند (۱۱ و ۱۷). بنابراین لاکازها پتانسیل بالایی برای انجام واکنش‌های پلیمریزاسیون، دپلیمریزاسیون، متیلاسیون و

تعدادی از باکتری‌ها از جمله *Bordetella*، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Caulobacter crescentus*، *compestris*، *Pseudomonas syringae*، *Mycobacterium tuberculosis* و *Yersinia pestis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Stenotrophomonas maltophilia* شناسایی شدند (۹ و ۱۲). لاکازهای باکتریایی بدلیل بیان بسیار کارآمد آن‌ها، مقاومت دمایی بسیار زیاد و مقاوم بودن در برابر قلیا در مقایسه با لاکازهای قارچی مطلوب‌تر هستند. همچنین لاکازهای باکتریایی نسبت به لاکازهای قارچی قابلیت دستکاری ژنتیکی بیشتری دارند (۲۰، ۲۵ و ۳۳). از آن‌جا که اسپور به باکتری‌ها این اجازه را می‌دهد که در شرایط سخت زنده بمانند، آنزیم‌های پوشش اسپور نیز ممکن است در برابر درجه حرارت بالا یا مقادیر pH شدید مقاوم باشند. در نتیجه لاکازهای وارد شده در پوشش اسپور باکتری‌ها می‌توانند برای کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژی مختلف مورد استفاده قرار گیرند (۱۳). باتوجه به مزیت لاکازهای باکتریایی، یافتن باکتری‌های جدید از منابع بکر که دارای فعالیت بالای لاکازی یا شبه لاکازی و از لحاظ تجاری مقرون به صرفه باشند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق غربالگری و خالص‌سازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لاکاز از نمونه‌های خاک ساحل دریاچه ارومیه به عنوان یک منبع بکر بود.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌ها: برای بررسی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم لاکاز نمونه‌برداری از سواحل دریاچه بسیار شور ارومیه انجام شد. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از سه محل مختلف در یک ناحیه از ساحل دریاچه و از عمق ۵ تا ۱۰ سانتیمتری به صورت کاملاً استریل انجام شد. نمونه‌های خاک در ظروف شیشه‌ای که قبلاً استریل شده بودند جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شدند.

طبیعی محصولاتی مانند رنگ‌دانه‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق دایمریزه کردن اسیدهای فنلی و غیر فنلی، تولید مواد ترکیبی جدید از ضایعات لیگنینی، زیست‌پالایی و سم‌زدایی از آلاینده‌های زیست محیطی و بازیابی زباله و فاضلاب و همچنین در حذف آلاینده‌هایی که پتانسیل ایجاد سرطان دارند و یا می‌توانند باعث اثرات نامطلوب بر رشد، تولید مثل، سیستم عصبی و ایمنی انسان و حیات وحش شوند مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱، ۴، ۸، ۱۵، ۱۸، ۲۶، ۳۴ و ۳۶). از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی، لاکازها گلیکوپروتئین‌های مونومری، دایمری یا تترامری هستند که حاوی چهار اتم مس از سه نوع مس هستند. مس نوع ۱ (T1Cu) مسئول اکسیداسیون سوبسترا، عامل رنگ آبی آنزیم، دارای جذب الکترونیکی قوی در حدود ۶۱۰ نانومتر و به وسیله EPR قابل تشخیص است. مس نوع ۲ (T2Cu) بی‌رنگ و به وسیله EPR قابل تشخیص است. مس نوع ۳ (T3Cu) جذب ضعیفی در نزدیکی طیف UV (۳۳۰nm) دارد اما به وسیله EPR قابل تشخیص نیست (۴۲).

لاکاز حساس به حرارت برای اولین بار در سال ۱۸۸۳ در یک درخت ژاپنی (*Rhus vernicifera*) که باعث سختی و تیرگی این درخت بود، به وسیله دانشمندی به نام یوشیدا مورد شناسایی قرار گرفت. وجود آنزیم‌های لاکاز و شبه لاکاز در قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان و حشرات نیز گزارش شده است که عملکردهای خاصی را در هر کدام بر عهده دارند (۱۹، ۲۶ و ۲۹). با وجود این که آنزیم لاکاز در گیاهان به وفور یافت می‌شود، مطالعه و استفاده از لاکازها با منشاء گیاهی، بدلیل خالص‌سازی دشوار آنزیم و همچنین بدلیل وجود تعداد زیادی آنزیم‌های اکسیداتیو با دامنه سوبسترای بالا در عصاره‌های خام گیاه، مورد توجه محققین قرار نگرفته است (۳۲).

اولین لاکاز باکتریایی در باکتری *Azospirillum lipoferum* جدا شده از ریزوسفر برنج شناسایی شد که در تولید ملانین نقش دارد. پس از آن لاکازها و شبه لاکازها در

UP200HT ساخت کمپانی Hielscher آلمان انجام شد. بعد از سانتریفوژ در دور ۱۴۰۰۰ g و دمای °C ۴ به مدت ۲۰ دقیقه، عصاره عاری از سلول حاوی آنزیم داخل سلولی به دست آمد (۹ و ۳۸). بمنظور تایید و صحت انجام سونیکاسیون و استخراج پروتئین تام، از محلول برادفورد استفاده شد که تغییر رنگ محلول برادفورد حاکی از درستی و صحت انجام سونیکاسیون و استخراج پروتئین های داخل سلولی باکتری ها است.

قبل از ارزیابی فعالیت آنزیم لاکاز، با اضافه کردن کاتالاز به محلول داخل و خارج سلولی و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت، اثرات H₂O₂ احتمالی تولید شده به وسیله باکتری از بین برده شد. فعالیت آنزیم لاکاز بوسیله اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۲۰ nm و با استفاده از (2,2-azino-di-[3-ethylbenzo-thiazolin-sulphonate]) از عنوان سوپسترا مورد بررسی قرار گرفت. حجم واکنش مورد ارزیابی ۱ میلی لیتر بود که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول داخل یا خارج سلولی، ۰/۲ میلی مولار ABTS و ۰/۱ مولار بافر استات سدیم (pH 4.5) بود. فعالیت آنزیم لاکاز بلافاصله بعد از افزودن آن به مخلوط واکنش و بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون خوانده شد. یک واحد فعالیت (U) به عنوان میزان آنزیمی که در هر دقیقه ۱ میکرومول ABTS را در ۳۰ درجه سانتیگراد اکسید می کند، تعریف شد. ضریب خاموشی مولی برای ABTS، برابر ۱⁻ cm⁻¹ × ۱۰^۴ = ۳/۶ × ۴۲۰ε در نظر گرفته شد. (۹، ۲۳، ۳۸ و ۴۶).

شناسایی مولکولی سویه باکتریایی تولید کننده لاکاز: بعد از کشت سویه باکتریایی تولید کننده لاکاز در محیط کشت Brain-Heart Agar به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد، DNA ژنومی با استفاده از روش Wilson و همکاران (۲۰۱۰) استخراج و در دمای °C ۲۰- ذخیره شد (۴۵). شناسایی باکتری مورد نظر به وسیله PCR و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 27F (-5'

جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لاکاز: به منظور جداسازی باکتری‌های تولید کننده لاکاز، ۱۰ گرم از نمونه خاک جمع آوری شده به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع مغذی حاوی عصاره مخمر، سولفات مس (3mM) و گایاکول (0.01% w/v: guaiacol) اضافه و به مدت ۹۶ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۲۰ انکوبه شد. لازم به ذکر است با توجه به این که نمونه های خاک از ساحل دریاچه شور ارومیه جمع آوری شده بودند برای رشد بهتر باکتری ها به محیط کشت ۱٪ NaCl اضافه شد. سپس برای شناسایی باکتری‌های تولید کننده لاکاز، بعد از تهیه رقت، باکتری ها از محیط کشت مایع به محیط کشت جامد Brain-Heart Agar حاوی سولفات مس (3mM) و گایاکول (0.01% w/v) منتقل و به صورت spread plate کشت داده شدند. بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۳۰، کلنی‌های باکتریایی با رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز به عنوان باکتری‌های تولید کننده لاکاز، جهت خالص سازی به محیط کشت جامد منتقل و به صورت streak plate کشت داده شدند (۹ و ۲۳). در نهایت سویه های خالص شده مورد بررسی میکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفتند.

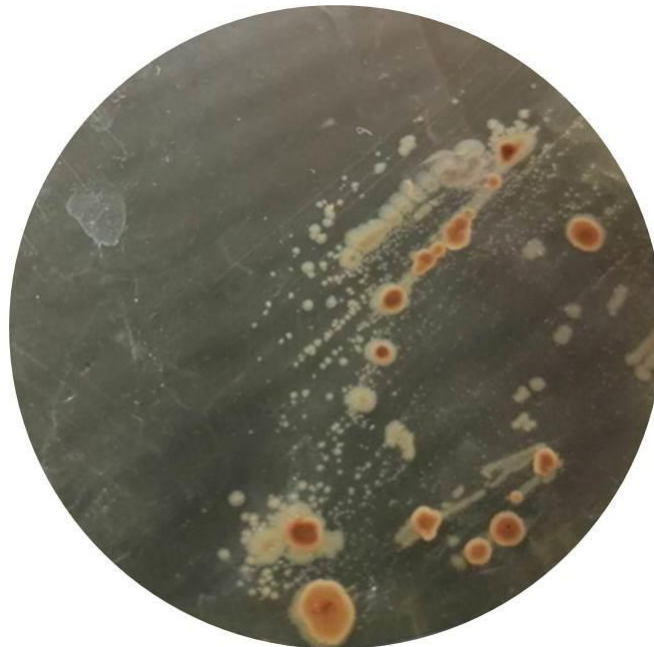
ارزیابی فعالیت آنزیم لاکاز: بمنظور سنجش فعالیت آنزیم لاکاز، باکتری ایجاد کننده کلنی قهوه ای مایل به قرمز، در محیط Brain-Heart Infusion Broth حاوی سولفات مس (3mM) و گایاکول (0.01% w/v) به صورت هوازی کشت داده شد. بعد از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۲۰ به مدت ۴۸ ساعت، سوپرناتانت کشت باکتریایی با سانتریفوژ در دمای °C ۴ و دور g ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جهت بررسی آنزیم خارج سلولی جمع آوری شد. جهت بررسی آنزیم داخل سلولی رسوب سلول های باکتریایی با بافر فسفات (0.1M; pH 6.5) دو بار شستشو داده شد. جهت شکستن سلول ها، ۵ بار سونیکاسیون (هر بار یک دقیقه و با فواصل ۱ دقیقه ای بین سونیکاسیون ها) با استفاده از هموژنایزر التراسونیک مدل

در پایگاه داده‌های NCBI آنالیز
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) و درخت
فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA-X رسم گردید
(۲۱).

نتایج

جداسازی باکتری: بعد از کشت دادن نمونه خاک ساحل
دریاچه ارومیه در محیط کشت مایع حاوی گایاکول و
انکوباسیون در 30°C به مدت ۹۶ ساعت، باکتری‌ها به
محیط کشت جامد حاوی گایاکول منتقل شدند. بعد از ۹۶
ساعت انکوباسیون در 30°C ، چهار کلنی که در اثر
اکسیداسیون گایاکول، رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز مشخصی
داشتند و از لحاظ ظاهری متفاوت به نظر می‌رسیدند
(شکل ۱) خالص سازی شدند و به عنوان باکتری‌های
تولید کننده لاکاز مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند.

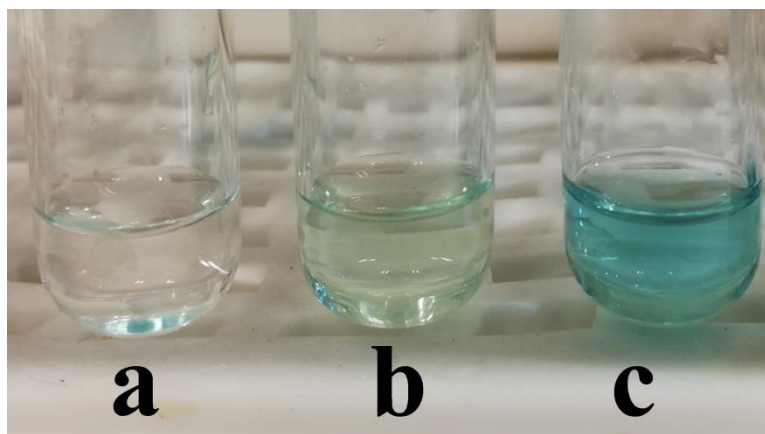
(5'- 1492R و AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
(GGTTACCTTGTTACGACTT-3') طراحی شده برای ژن
16S rRNA که به وسیله شرکت TAG Copenhagen، سنتز
شده بودند، صورت گرفت. واکنش PCR در حجم ۵۰
میکرولیتر (شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میلی مولار
MgCl₂، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، ۰/۴ میکرومولار از
هر پرایمر، ۲۰ میلی مولار Tris-HCl، ۵۰ میلی مولار KCl،
۲/۵ واحد Smar Taq DNA polymerase (CinnaGen, Iran)
و آب دو بار تقطیر استریل) و در شرایط دمایی 95°C به
مدت ۵ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل 30°C ثانیه در 95°C ،
 30°C ثانیه در 55°C و 72°C و ۷ دقیقه تکثیر نهایی
در 72°C انجام شد. به منظور بررسی وجود محصول
مورد نظر، الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز
۱٪ و بافر TBE صورت پذیرفت. سپس محصول PCR
بوسیله‌ی شرکت Macrogen کشور کره‌جنوبی تعیین توالی
شد. در نهایت توالی بدست آمده با استفاده از ابزار BLAST



شکل ۱- کلنی‌های قهوه‌ای مایل به قرمز که در اثر کشت باکتری‌های جدا شده از ساحل دریاچه ارومیه در محیط کشت حاوی گایاکول بدست آمده
اند. رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز نشان دهنده‌ی اکسیداسیون گایاکول بوسیله‌ی آنزیم لاکاز باکتریایی است.

بود که تنها در یک سویه‌ی باکتریایی فعالیت لاکازی قابل توجه وجود داشت. در این باکتری سوپرناتانت نسبت به عصاره عاری از سلول، فعالیت لاکازی بیشتری از خود نشان داد؛ به عبارت دیگر برای عصاره عاری از سلول فعالیت لاکازی کمتری مشاهده شد. میزان فعالیت لاکازی سوپرناتانت ناشی از باکتری رشد کرده در محیط کشت Brain-Heart Infusion Broth حاوی سولفات مس و گایاکول، 0.23 U/mL محاسبه گردید (شکل ۲).

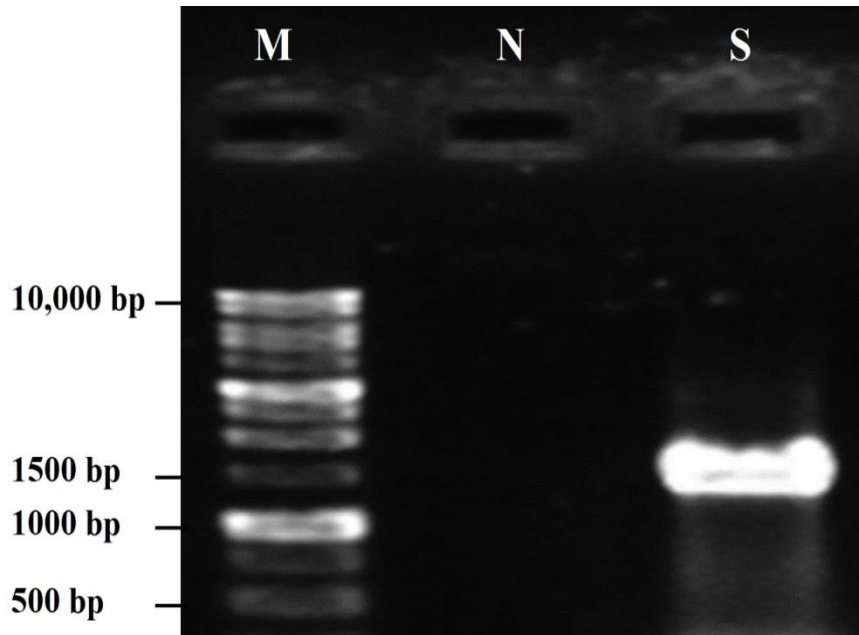
سنجش فعالیت آنزیم لاکاز: جهت بررسی فعالیت لاکازی، بعد از رشد باکتری‌های ایجادکننده کلنی قهوه‌ای مایل به قرمز به صورت هوازی در محیط کشت Brain-Heart Infusion Broth حاوی سولفات مس و گایاکول، سوپرناتانت ناشی از سانتریفیوژ محیط کشت و همچنین عصاره عاری از سلول ناشی از تخریب سلول‌ها، در معرض ABTS قرار گرفتند. نتایج حاصل از اسپکتروفتومتر و افزایش جذب در طول موج 420 nm نشان‌دهنده‌ی آن



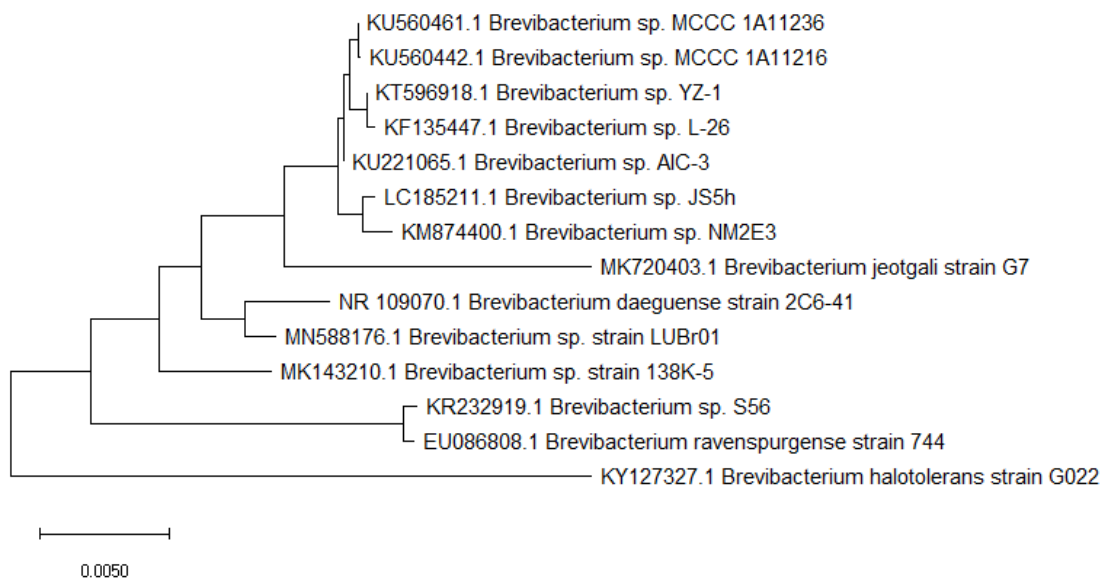
شکل ۲: اکسیداسیون ABTS به وسیله عصاره خارج سلولی و عصاره داخل سولی باکتری جدا شده از ساحل دریاچه ارومیه با فعالیت لاکازی. a: محلول ABTS فاقد عصاره باکتریایی، b: ABTS در معرض عصاره داخل سلولی، c: ABTS در معرض عصاره خارج سلولی

rRNA آن با شماره دسترسی MN588176.1 در GenBank (NCBI) قابل دسترسی است. نتایج حاصل از آنالیز BLAST نشان داد که بروی باکتریوم شناسایی شده در این مطالعه دارای همانندی ۱۰۰ درصدی با بعضی از سویه‌های جنس مربوطه در توالی نوکلئوتیدی مورد نظر است. ارتباطات فیلوژنتیکی *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 بدست آمده در این مطالعه با دیگر بروی باکتریوم‌های حاصل از مطالعات دیگر بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rRNA در شکل ۴ نشان داده شده است. در شکل توالی‌هایی که همانندی و مطابقت بیشتری دارند در یک دسته قرار گرفته‌اند.

آنالیز مولکولی باکتری تولیدکننده لاکاز: بمنظور شناسایی مولکولی باکتری تولیدکننده لاکاز بدست آمده از ساحل دریاچه ارومیه، PCR روی DNA باکتری مورد نظر با استفاده از پرایمرهای 27F و 1492R طراحی شده برای ژن 16S rRNA، انجام گرفت که محصول ناشی از تکثیر، فراورده مورد انتظار 1500bp بود (شکل ۳). با تعیین توالی فراورده حاصل از PCR و سپس آنالیز توالی نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از ابزار BLAST، مشخص شد که توالی بدست آمده متعلق به جنس بروی باکتریوم است. باکتری بدست آمده در این مطالعه *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 نامگذاری شد و توالی مربوط به ژن 16S



شکل ۳: نتایج حاصل از الکتروفورز فراورده PCR. M: مارکر، N: کنترل منفی، S: فراورده حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای 27F و 1492R که مربوط به باکتری تولیدکننده لاکاز جدا شده از ساحل دریاچه ارومیه است.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی (Neighbor-Joining Tree) بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rRNA *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 بدست آمده در این مطالعه و چندین سویه‌ی دیگر از جنس *Brevibacterium* (تعداد bootstrap replication ۱۰۰۰ می‌باشد).

توجه قرار گرفته است. بدلیل اختصاصیت کم سوبسترای، لاکازها می‌توانند طیف وسیعی از مواد شامل موادی با پیچیدگی ساختاری را اکسید کنند. بنابراین، لاکازها برای زیست‌پالایی آلاینده‌های سمی موجود در پساب صنایع مختلف نظیر صنایع تهیه خمیر کاغذ، صنایع نساجی،

بحث

لاکازها پتانسیل بسیار زیادی برای زیست‌پالایی اکسیداتیو ترکیبات شیمیایی سمی و زئوبیوتیک دارند و با توجه به سازگاری با محیط زیست، استفاده از آن‌ها بسیار مورد

Yersinia pestis, *Campylobacter jejuni aeruginosa* و *Mycobacterium leprae* شناسایی شده‌اند. تولید ملانین و فعالیت لاکاز، به احتمال زیاد به بیماری زایی این باکتری‌ها کمک می‌کند (۱۶).

محیط‌های متنوع دریایی از لحاظ فاکتورهایی نظیر شوری، دما، pH، فشار و غیره، سرشار از میکروارگانیسم‌هایی هستند که می‌توان از آن‌ها یا فراورده‌هایشان برای استفاده در شرایط خاص محیطی جهت زیست‌پالایی یا کاربردهای دیگر بهره‌برد. تا کنون باکتری‌های متعددی با فعالیت لاکازی نظیر *Marinomonas mediterranea* MMB-1، *Oscillatoria*، *Shewanella marisflavi*، *Shewanella algae* *curviceps* BDU92191 و سویه‌هایی از *Phychrobacter* از محیط‌های دریایی جدا شده‌اند (۴۱). با توجه به این که پساب‌های صنعتی نظیر صنایع مرتبط با رنگ‌های صنعتی، صنایع پالپ و خمیر، دباغی‌ها و صنایع نساجی حاوی سطح بالایی از نمک هستند (۳۰، ۳۱ و ۴۱)، باکتری‌های جدا شده از محیط‌های شور نظیر *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 جدا شده در این مطالعه از دریاچه ارومیه و لاکازهای ناشی از آن‌ها پتانسیل بالایی برای زیست‌پالایی چنین پساب‌هایی را دارند.

مشابه با مطالعه‌های مارگوت و همکاران (۲۰۱۳) روی سویه‌های *استریپتومایسس* (۲۴)، سوندهی و همکاران (۲۰۱۴) روی *Bacillus tequilensis* جدا شده از لجن فعال مربوط به تصفیه‌خانه‌ی کارخانه‌ی کاغذسازی (۴۰) و مقدم و همکاران (۲۰۱۶) روی سویه‌های *Psychrobacter* جدا شده از محیط‌های دریایی (۲۷)، بیشترین فعالیت لاکازی *Brevibacterium* sp. strain LUBr01 جدا شده در این مطالعه، به صورت خارج‌سولی بود. ویژگی تولید خارج‌سولی آنزیم به وسیله باکتری باعث کاربرد مستقیم باکتری به جای استفاده از آنزیم در صنایع مختلف نظیر تصفیه‌خانه‌های فاضلاب‌های صنعتی حاوی مواد سمی قابل اکسید با لاکاز می‌شود. این کار باعث کاهش هزینه

صنایع سنتز رنگ صنعتی، صنایع تولید کامپوزیت چوب، کارخانه‌های تولید روغن پالم، صنایع طراحی بیوسنسورها، صنایع داروسازی و دیگر صنایع شیمیایی که حاوی مواد شیمیایی متعدد از جمله سولفات‌ها، سولفیدها، کربنات‌ها، کلریدها، ترکیبات سفیدکننده کلردار، پراکسیدها و فلزات سنگین هستند گزینه بسیار مناسبی هستند (۳، ۷، ۲۸، ۳۵، ۴۱ و ۴۴). با توجه به گسترده بودن فعالیت آنزیم‌های لاکاز و کاربرد گسترده آن‌ها در صنایع مختلف، جستجو برای یافتن منابع مقرون به صرفه و قابل دسترس این آنزیم‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است. هر چند آنزیم‌های لاکاز در گیاهان و قارچ‌ها وجود دارند و لاکاز قارچی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۵، ۲۲ و ۳۷)، با توجه به تنوع بسیار زیاد محیط زیست باکتری‌ها، می‌توان با جستجو در محیط‌های مختلف از قبیل محیط‌های شور، اسیدی، قلیایی، با درجه حرارت بالا یا پایین، بی‌هوازی (فاقد اکسیژن) و غیره، سویه باکتریایی با توانایی تولید آنزیم لاکاز و قابلیت استفاده در شرایط خاص جدا کرد (۱۴).

تاکنون فعالیت لاکازی در باکتری‌هایی که ساکن محیط‌های آبی یا خاکی و متعلق به α -proteobacteria، β -proteobacteria، Firmicutes، Cyanobacteria، Aquificae، Deinococcus-Thermus هستند و همچنین در بعضی از آرکی‌ها شناسایی شده است (۱۶). در پروکاریوت‌ها، لاکاز یا به صورت داخل سلولی و یا به صورت خارج سلولی تولید می‌شود که لاکاز خارج سلولی از لحاظ کاربرد صنعتی دارای اهمیت قابل توجهی است (۱۶ و ۴۰). موقعیت سلولی لاکاز احتمالاً به نقش فیزیولوژیکی آن مربوط می‌شود و به نظر می‌رسد وابسته به فاز رشد و وجود سوبسترای الفا‌کننده باشد. به هر حال سلول‌های باکتریایی باید راهکاری برای مقابله با لاکاز داخل سلولی به دلیل تولید محصولات جانبی سمی احتمالی داشته باشند. همچنین ژن‌های شبه لاکاز در پاتوژن‌های مهم انسانی مانند *E. coli*، *Bordetella pertussis*، *Pseudomonas*

های قابل توجه استخراج و خالص‌سازی آنزیم می‌شود و از طرفی با توجه به رشد و تکثیر باکتری، نیاز به اضافه کردن دائمی باکتری به سیستم جهت سمیت‌زدایی مواد سمی و یا به طور کلی اکسید کردن مواد نیست. در این مطالعه فعالیت لاکازی اندکی نیز به صورت درون سلولی مشاهده شد. با طولانی شدن کشت باکتری‌ها و وارد شدن آن‌ها به فاز سکون، در اثر مرگ سلولی و لیز باکتری‌ها، لاکاز درون سلولی آزاد می‌شود (۲ و ۲۴) که در این مطالعه برای جلوگیری از این پدیده، از کشت‌های تازه باکتری جهت بررسی فعالیت لاکاز استفاده شد. ماندیک و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه روی سویه‌های *Sordomonas* (۲۳)، شیخی و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه روی سویه‌های *باسیلوس* (۳۸)، نشان دادند که بیشترین فعالیت لاکازی مربوط به لاکاز درون سلولی است. همچنین، در مقایسه با *بروی باکتریوم* جدا شده در این مطالعه، مندز و همکاران (۲۰۱۹) از روده مورچه، سویه‌ای از *Brevibacterium permense* با قدرت رنگ‌زدایی بالا را جدا کردند که دارای فعالیت لاکازی به صورت داخل سلولی بود (۱۰). در این رابطه می‌توان چنین استنباط نمود که در سویه‌های

مختلف باکتریایی با توجه به ویژگی‌های ژنتیکی و شرایط محیطی، مکانیسم‌های اکسیداسیون مواد با استفاده از آنزیم‌های لاکازی متفاوت است.

نتیجه‌گیری

باکتری‌های هالوفیل تولیدکننده آنزیم لاکاز خارج سلولی (نظیر باکتری جدا شده در این مطالعه از دریاچه شور ارومیه) می‌توانند در صنایعی که نیاز است آنزیم لاکاز در حضور غلظت‌های بالای نمک مورد استفاده قرار گیرد، همچنین می‌توانند برای زیست‌پالایی پساب‌های شور بسیار مفید واقع شوند. از طرفی دریاچه ارومیه دارای پتانسیل بالقوه بالایی جهت جداسازی چنین میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تولید آنزیم‌های خاص نظیر لاکاز با قابلیت استفاده در شرایط شوری است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهش و فن‌آوری دانشگاه ارومیه حمایت مالی شده است و نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

منابع

1. Annamalai J, Namasisivayam V. (2015). Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. *Environment International*. 76:78-97.
2. Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4):1953-58.
3. Chappell HA, Milliken A, Farmer C, Hampton A, Wendland N, Coward L, et al. (2017). Efficient remediation of 17 α -ethinylestradiol by *Lentinula edodes* (shiitake) laccase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 10:64-8.
4. Couto SR, Herrera JLT. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*. 24(5):500-13.
5. Curran LM, Pham LTM, Sale KL, Simmons BA. (2022). Review of advances in the development of laccases for the valorization of lignin to enable the production of lignocellulosic biofuels and bioproducts. *Biotechnology Advances*. 54:107809.
6. D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Sermanni GG. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*. 77(2-3):265-73.
7. D'Souza-Ticlo D, Sharma D, Raghukumar C. (2009). A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. *Marine Biotechnology*. 11(6):725-37.
8. Desai S, Nityanand C. (2011). Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology*. 3(2):98-124.
9. Dhiman K, Shirkot P. (2018). Bioprospecting and characterization of laccase producing bacteria from paddy fields of Himachal Pradesh.

- Indian Journal of Experimental Biology. 56:334-41.
10. Díez-Méndez A, García-Fraile P, Solano F, Rivas R. (2019). The ant *Lasius niger* is a new source of bacterial enzymes with biotechnological potential for bleaching dye. Scientific Reports. 9:15217.
 11. Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal. 3(1):1-26.
 12. Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M-L, Bally R. (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiology Letters. 108(2):205-10.
 13. Held C, Kandelbauer A, Schröder M, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. (2005). Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores. Environmental Chemistry Letters. 3(2):74-7.
 14. Hemmati R, Yousefzadeh M, Saffar B, Noori AR. (2022). Isolation, identification and evaluation of enzymes of a new psychrophilic bacterium from the intestine of Crustacean *Gammarus* sp collected from cold springs of Saman (Chahrmahal va Bakhtiari). Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 35(2): 239-55.
 15. Hüttermann A, Mai C, Kharazipour A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. Applied Microbiology and Biotechnology. 55(4):387-94.
 16. Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. International Journal of Molecular Sciences. 21(3):966.
 17. Jiang M, Ten Z, Ding S. (2013). Decolorization of synthetic dyes by crude and purified laccases from *Coprinus comatus* grown under different cultures: the role of major isoenzyme in dyes decolorization. Applied Biochemistry and Biotechnology. 169(2):660-72.
 18. Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá Á, Martínez ÁT, Martínez MJ. (2009). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. Bioresource Technology. 100(24):6378-84.
 19. Keilin D, Mann T. (1939). Laccase, a blue copper-protein oxidase from the latex of *Rhus succedanea*. Nature. 143(3610):23-4.
 20. Koschorreck K, Schmid RD, Urlacher VB. (2009). Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis. BMC Biotechnology. 9(1):12.
 21. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35(6):1547-9.
 22. Loi M, Glazunova O, Fedorova T, Logrieco AF, Mulè G. (2021). Fungal Laccases: The Forefront of Enzymes for Sustainability. J Fungi (Basel). 7(12):1048.
 23. Mandic M, Djokic L, Nikolaivits E, Prodanovic R, O'Connor K, Jeremic S, et al. (2019). Identification and characterization of new laccase biocatalysts from *Pseudomonas* species suitable for degradation of synthetic textile dyes. Catalysts. 9(7):629.
 24. Margot J, Bennati-Granier C, Maillard J, Blánquez P, Barry DA, Holliger C. (2013). Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. AMB Express. 3(1),63.
 25. Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, et al. (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. Journal of Biological Chemistry. 277(21):18849-59.
 26. Mayer AM, Staples RC. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 60(6):551-65.
 27. Moghadam MS, Albersmeier A, Winkler, A, Cimmino L, Rise K, Hohmann-Marriott MF, et al. (2016). Isolation and genome sequencing of four Arctic marine *Psychrobacter* strains exhibiting multicopper oxidase activity. BMC Genomics. 17,117.
 28. Morsy SAGZ, Ahmad Tajudin A, Ali MSM, Shariff FM. (2020). Current development in decolorization of synthetic dyes by immobilized laccases. Frontiers in Microbiology. 11:572309.
 29. Mukhopadhyay M, Banerjee R. (2015). Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13. 3 Biotech. 5(3):227-36.
 30. Ogugbue CJ, Sawidis T, Oranusi NA. (2011). Evaluation of colour removal in synthetic saline wastewater containing azo dyes using an immobilized halotolerant cell system. Ecological Engineering. 37(12):2056-60.

31. Raghukumar C, D'Souza-Ticlo D, Verma A. (2008). Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. *Critical Reviews in Microbiology*. 34(3-4):189-206.
32. Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, et al. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*. 259(1-2):485-95.
33. Ruijssenaars H, Hartmans S. (2004). A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(2):177-82.
34. Saparrat MC, Cabello MN, Arambarri AM. (2002). Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. *Biotechnology Letters*. 24(16):1375-7.
35. Saravanakumar K, Kathiresan K. (2014). Bioremoval of the synthetic dye malachite green by marine *Trichoderma* sp. *Springerplus*. 3:631.
36. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127(3-5):204-15.
37. Sheikhi F, Roayaei Ardakani M, Enayatzamir N, Ghezelbash G. (2014). Isolation and identification of two laccase producer fungi from bagass and sugarcane rhizosphere. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 27(3): 389-398.
38. Sheikhi F, Roayaei Ardakani M, Enayatzamir N, Rodriguez-Couto S. (2012). The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4):701-7.
39. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*. 96(7):2563-606.
40. Sondhi S, Sharma P, Saini S, Puri N, Gupta N. (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PLoS ONE*. 9(5):e96951.
41. Theerachat M, Guieysse D, Morel S, Remaud-Siméon M, Chulalaksananukul W. (2019). Laccases from marine organisms and their applications in the biodegradation of toxic and environmental pollutants: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 187(2):583-611.
42. Thurston CF. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140(1):19-26.
43. Ullah MA, Bedford CT, Evans CS. (2000). Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(2):230-4.
44. Vallecillos L, Sadeh Y, Borrull F, Pocurull E, Bester K. (2017). Degradation of synthetic fragrances by laccase-mediated system. *Journal of Hazardous Materials*. 334:233-43.
45. Wilson GS, Raftos DA, Corrigan SL, Nair SV. (2010). Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiological Research*. 165(4):300-11.
46. Yang X, Wu Y, Zhang Y, Yang E, Qu Y, Xu H, et al. (2020). A thermo-active laccase isoenzyme from *Trametes trogii* and its potential for dye decolorization at high temperature. *Frontiers in Microbiology*. 11:241.

Isolation of *Brevibacterium* from shore sediments of hypersaline Lake Urmia with extracellular laccase activity

Hajizadeh B.¹, Shaykh-Baygloo N.^{1*}, Imani M.² and Jamei R.¹

¹Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

² Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Laccases, copper-containing polyphenol oxidases, have numerous biotechnological and industrial applications, especially in industries that require high salt concentrations such as pulp and paper industries, tanneries, and textile industries. In the current study, solid and liquid bacterial culture media containing CuSO₄ (3 mM) and guaiacol (0.01% w/v) were used to isolate laccase-producing bacteria from the shore sediments of hypersaline Lake Urmia. Bacteria producing reddish-brown colonies on the culture medium containing guaiacol were considered as laccase-producing strains. Intracellular and extracellular laccase activities were measured spectrophotometrically at 420 nm using ABTS (2,2-azino-di-[3-ethylbenzo-thiazolin-sulphonate]) as a substrate. In this study, four bacterial strains were isolated from the shore sediments of Lake Urmia using a culture medium containing guaiacol, of which only one strain was detected with significant extracellular laccase activity. Microscopic investigation and 16S rRNA gene sequence analysis showed that this strain is a rod-shaped Gram-positive bacterium belonging to the genus *Brevibacterium* and was named *Brevibacterium* sp. strain LUBr01. The 16S rRNA sequence of LUBr01 strain is available on the GenBank nucleotide database under the accession number MN588176.1. Due to the proper laccase activity, LUBr01 can be useful for industrial process related to laccase. Also, saline Lake Urmia can act as a source of microorganisms with the ability to produce special enzymes such as laccase that can be used in salinity conditions.

Keywords: Laccase, saline Lake Urmia, *Brevibacterium*