Identifying Uricase-Producing *Arthrobacter* and *Bordetella* Bacterial Strains and Comparing the Enzyme Activity

Mojtaba Shaban
Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, shaban.mojtaba2014@gmail.com
Arastoo Badoei-dalfard*
Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, badoei@uk.ac.ir

Abstract

Introduction: Uricase (urate oxidase) is a therapeutic enzyme that belongs to the class of oxidoreductases and catalyzes the oxidation of uric acid to allantoin, carbon dioxide, and hydrogen peroxide and also plays a vital role in the purine metabolic pathway. Nowadays, bacterial uricase enzyme has received special attention from researchers.

Materials and methods: Poultry soils are great places for the growth of uricotelic bacteria due to having high sources of uric acid. Poultry soils were collected from Kerman city and bacterial strains were isolated. The decomposition of uric acid was performed by inoculating bacteria on a solid medium containing uric acid as the only source of carbon and nitrogen. The screening was performed by monitoring the appearance of clear zones around the colonies of bacteria indicating the decomposition of uric acid. Uricase activity was investigated by the Phosphotungstic acid method. The molecular identification of strains was performed using 16S rDNA gene sequence and drawing the phylogenetic tree.

Results: In this study, two bacterial species capable of producing uricase enzyme were isolated from a poultry source and screened based on the size of the clear zone using a uric acid agar plate. *Arthrobacter* sp. KBUB and *Bordetella* sp. KMU3 strains were identified based on the 16S rDNA gene sequences. The production of uricase was performed during different incubation periods and the results showed that the maximum uricolytic activity of 25 and 15 U/mL was achieved by *Arthrobacter* sp. KBUB and *Bordetella* sp. KMU3, respectively.

Discussion and conclusion: The capability of both these strains to produce uricase was confirmed using solid and liquid media. *Arthrobacter* sp. KBUB has shown a high ability to produce uricase, which can be used as a therapeutic enzyme and biosensor construction to measure uric acid.

Key words: Bacterial Uricase, Screening, Production, Molecular Identification, *Arthrobacter*, *Bordetella*

* Corresponding author
Received: March 15, 2020 / **Accepted:** June 7, 2020

فصل‌نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ۳٤، تابستان ۱۳۹۹، صص ۱-۱۲
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۸/۲۰ ، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۱
Doi: 10.22108/BJM.2020.119988.1235

شناسایی سویه‌های باکتری‌های *Arthrobacter* و *Bordetella* مولد یوریکاز و مقایسهٔ میزان فعالیت آنزیمی

مجتبی شبان: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، shaban.mojtaba2014@gmail.com
ارسطو بدویی دلفارد*: دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، badoei@uk.ac.ir

چکیده

مقدمه: یوریکاز (اورات‌اکسیداز)، آنزیم دارویی متعلق به خانوادهٔ اکسیدوردوکتازهاست که اکسیداسیون اوریک‌اسید به آلانتوئین، دی‌اکسیدکربن و پراکسیدهیدروژن را کاتالیز و نقشی حیاتی در مسیر متابولیک پورین ایفا می‌کند. امروزه، آنزیم یوریکاز باکتریایی مدنظر پژوهشگران قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: فضولات پرندگان به‌علت داشتن مقادیر زیاد اوریک‌اسید، مکان مناسبی برای رشد باکتری‌های یوریکوتلیک هستند. خاک‌های آلوده از شهر کرمان جمع‌آوری و سویه‌های باکتریایی جداسازی شدند. تجزیهٔ اوریک‌اسید با تلقیح باکتری‌ها روی محیط جامد حاوی اوریک‌اسید (تنها منبع کربن و نیتروژن) انجام شد. غربال‌گری با بررسی ظهور هالهٔ شفاف در اطراف کلنی‌ها که شاخصی از تجزیهٔ اوریک‌اسید بود، انجام شد. فعالیت یوریکازی به روش فسفوتنگستیک‌اسید بررسی شد. شناسایی مولکولی سویه‌ها با استفاده از توالی ژن *16S rDNA* و رسم درخت فیلوژنی انجام شد.

نتایج: در مطالعهٔ حاضر، دو گونهٔ باکتریایی مولد آنزیم یوریکاز بر اساس میزان قطر هالهٔ شفاف روی محیط آگار حاوی اوریک‌اسید از خاک‌های آلوده به فضولات پرندگان جداسازی و بر اساس توالی ژن *16S rDNA* با عنوان *Arthrobacter* sp. KBUB و *Bordetella* sp. KMU3 شناسایی شدند. تولید یوریکاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون انجام شد و نتایج، بیشترین میزان فعالیت یوریکازی را حدود ۲۵ و ۱۵ واحددرمیلی‌لیتر به‌ترتیب برای دو سویهٔ *Arthrobacter* sp. KBUB و *Bordetella* sp. KMU3 نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: توانایی هر دو سویه در تولید یوریکاز با استفاده از محیط جامد و مایع تأیید شد و سویهٔ ***Arthrobacter* sp. KBUB** توانایی زیادی برای تولید یوریکاز نشان داد.

واژه‌های کلیدی: یوریکاز باکتریایی، غربال‌گری، تولید، شناسایی مولکولی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اوریک‌اسید ($C_5H_4N_4O_3$)، ترکیبی هتروسیکل با وزن مولکولی ۱۶۸ دالتون و حلالیت اندک در آب (۶۰ میلی‌گرم‌درلیتر) است (۱ و ۲). به‌طورکلی، اوریک‌اسید به‌شکل اورات وجود دارد که نمک اوریک‌اسید است. عمده ساخت اوریک‌اسید در کبد انجام می‌شود و سرعت ساخته‌شدن اوریک‌اسید در کبد و میزان دفع آن از طریق کلیه‌ها تعیین‌کنندهٔ غلظت اوریک‌اسید در خون است. اوریک‌اسید محصول انتهایی کاتابولیسم پورین در پریمات‌ها، پرندگان و برخی دیگر از حیوانات است و در اثر آنزیم گزانتین‌اکسیداز[1] از متابولیت‌های حدواسطی همچون هیپوگزانتین و گزانتین تشکیل می‌شود. در بیشتر پستانداران و بسیاری از مهره‌داران دیگر، اوریک‌اسید در اثر عمل یوریکاز یا اورات‌اکسیداز به آلانتوئین تبدیل می‌شود که ترکیبی محلول در آب است و از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود (۳ و ۴). آنزیم زانتین‌اکسیدوردوکتاز مسئول تولید اوریک‌اسید است (۵). انسان‌ها نمی‌توانند اوریک‌اسید را به ترکیبات دارای حلالیت بیشتر تبدیل کنند؛ زیرا آنزیم یوریکاز را ندارند و به عبارتی، ژن یوریکاز در انسان به‌واسطهٔ دو جهش در کدون‌های پایان خاموش می‌شود (۵). زمانی که غلظت اوریک‌اسید بیش از ۶/۸ گرم‌بردسی‌لیتر باشد، بلورهای اوریک‌اسید به‌شکل اورات‌مونوسدیم تشکیل می‌شوند (۶ و ۷). معمولاً دفع اوریک‌اسید به‌طور روزانه و از طریق کلیه‌ها انجام می‌شود. غلظت اوریک‌اسید را می‌توان در سرم، پلاسما و ادرار سنجید. هایپراوریسمیا[2]، عامل کلیدی در ایجاد نقرس[3]، نارسایی کلیوی، افزایش فشار خون، دیابت‌ها و چاقی است که درنتیجهٔ افزایش تولید اوریک‌اسید، اختلال در دفع کلیوی اوریک‌اسید یا هر دوی این عوامل رخ می‌دهد. هایپراوریسمیا در بزرگسالان با غلظت اوریک‌اسید بیش از ۷ میلی‌گرم‌بردسی‌لیتر در مردان و ۶ میلی‌گرم‌بردسی‌لیتر در زنان تعریف می‌شود. در افراد سالم، اوریک‌اسید در ادرار دفع می‌شود؛ باوجوداین، دفع اوریک‌اسید ممکن است به‌علت بیماری‌های کلیوی مختل و به هایپراوریسمیا منجر شود (۸). علاوه‌بر مشکلات ناشی از دفع اوریک‌اسید به‌علت نارسایی کلیوی، هایپراوریسمیا ممکن است درنتیجهٔ افزایش تولید اوریک‌اسید رخ دهد (۸). اوریک‌اسید مانند ویتامین C جزو مواد آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شود و می‌توان گفت حدود نیمی از ظرفیت مواد آنتی‌اکسیدانی پلاسما در انسان ناشی از اوریک‌اسید است (۹ و ۱۰). اوریک‌اسید عمدتاً در غذاهای حیوانی مانند گوشت قرمز و همچنین حبوبات وجود دارد و بنابراین در افراد دارای رژیم غذایی عمدتاً گیاهی، سطح اوریک‌اسید سرم پایین است.

تعیین اوریک‌اسید در سرم نقش مهمی را در آزمایشگاه تشخیص طبی ایفا می‌کند. تاکنون روش‌های تحلیلی مختلفی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، الکتروفورز مویینه (CE)، کمی‌لومینسانس (CL)، الکتروشیمی و ... برای تعیین اوریک‌اسید در

نمونه‌های زیستی پیشنهاد شده‌اند. به‌طورکلی، روش‌های کروماتوگرافی مانند HPLC و CE کمک بسیاری به تشخیص اوریک‌اسید می‌کنند، اما به پیش‌پردازش نمونه‌های پیچیده و ابزار گران قیمت نیاز دارند. الکتروشیمی و CL، روش‌های تحلیلی قدرتمندی برای تعیین اوریک‌اسید در نمونه‌های واقعی با مزایای محدودهٔ تشخیصی کم و دقت زیاد هستند؛ بنابراین، لازم است روش ساده و مؤثری برای تعیین حساسیت و انتخابی‌بودن اوریک‌اسید در مایع‌های زیستی به‌منظور ارزیابی سلامت و تشخیص بیماری‌ها استفاده شود (۵). تغییر رنگ حاصل از واکنش سنجش اوریک‌اسید را می‌توان به روش‌های فتومتریک و اسپکتروفتومتری با طول موج ۶۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر ارزیابی کرد (۱۱)؛ محدودیت این روش، کدورت پیش‌بینی‌نشدهٔ ناشی از حضور پروتئین‌ها و رسوب اوریک‌اسید طی پیدایش رنگ است. مقدار اوریک‌اسید با استفاده از ستون فاز معکوس HPLC از طریق جذب UV یا MS در طول موج ۲۹۳ نانومتر نیز تعیین می‌شود (۱۱)؛ محدودیت این روش، نیاز به دست‌ورزی نمونه‌ها و همچنین استفاده از روش‌های زمان‌بر کروماتوگرافی و هزینهٔ زیاد است (۱۲). در سال ۱۹۴۱، نخستین روش برای تعیین اوریک‌اسید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و اندازه‌گیری جذب آن در ۲۹۳ نانومتر به کار گرفته شد؛ ترکیباتی که در این روش تداخل می‌کنند، عبارتند از: گوانین، گزانتین و به‌طورکلی، آنالوگ‌های ساختاری اوریک‌اسید و آمینواسید.

بیشتر روش‌های رایج برای تشخیص اوریک‌اسید در سرم بر پایهٔ استفاده از آنزیم یوریکاز هستند (۱۳). آلانتوئین در آب پنج تا ده برابر محلول‌تر از اوریک‌اسید است (۱۴). آنزیم یوریکاز در کاهش تجمع اورات سمی استفاده می‌شود. استفاده از بیوسنسور[۴]های آمپرومتریک جدید مبتنی بر کوپلینگ دو آنزیم یوریکاز و پراکسیداز برای اندازه‌گیری ویژهٔ اوریک‌اسید پیشنهاد شده‌اند (۱۵ و ۱۶). در روش کوپلینگ، دو آنزیم یوریکاز و پراکسیداز برای تعیین اوریک‌اسید استفاده می‌شوند؛ در این روش، اوریک‌اسید اکسید و به آلانتوئین، H_2O_2 و CO_2 تبدیل می‌شود و سپس H_2O_2 تولیدشده در حضور آنزیم پراکسیداز، ماده‌ای رنگی ایجاد می‌کند که می‌توان آن را به روش رنگ‌سنجی و در طول موج معین اندازه‌گیری کرد. توسعهٔ بیوسنسورها در پیشرفت تجزیه‌وتحلیل ترکیبات فعال زیستی امیدوارکننده است؛ به‌طوری‌که طی دو دههٔ گذشته، بیوسنسورها از آزمایشگاه‌ها ظاهر شدند و به‌علت داشتن مزیت‌هایی ازجمله روش اندازه‌گیری ساده، زمان پاسخ کوتاه، حساسیت و قدرت انتخاب زیاد توانستند به ابزارهای تشخیصی متداول برای تجزیه‌وتحلیل بسیاری از متابولیت‌ها تبدیل شوند (۱۷). روش‌های مانیتورینگ کلاسیک اغلب آهسته‌تر هستند و از تجهیزات گران‌قیمت استفاده می‌کنند که این امر سبب می‌شود برای کنترل زمان واقعی مناسب نباشند و باعث جذاب‌ترشدن حسگر بیوسنسور شوند (۱۸ و ۱۹). بیوسنسور جدیدی مبتنی بر کوپلینگ دو آنزیم گزارش شده که از جفت‌شدگی دو آنزیم اورات‌اکسیداز و پراکسیداز تشکیل شده است و با داشتن حساسیت زیاد، زمان سنجش کوتاه و اختصاصیت زیاد، قابلیت زیادی برای سنجش اوریک‌اسید دارد. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از منحنی‌های استاندارد انجام می‌شوند که با تعیین میزان اکسیژن مصرفی مربوط به غلظت اوریک‌اسید در واکنش‌های آنزیمی به دست می‌آیند.

یوریکاز در پستانداران، حشرات، گیاهان، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها یافت می‌شود (۲۰-۲۲). تهیهٔ یوریکاز از انواع منابع میکروبی مانند قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها به‌علت ساده‌بودن کار با آنها و مقرون‌به‌صرفه‌بودن کشت و نگهداری آنها گزارش شده است. نکتهٔ مهم در تشخیص و درمان با یوریکاز، ضروری‌بودن غربال‌گری منابع جدید برای تولید یوریکاز است؛ منابعی که اقتصادی و دارای ویژگی‌های سودمند باشند (۲۱ و ۲۲). امروزه، گزارش شده است باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Micrococcus*، *Brevibacterium*، *Escherichia coli*، *Proteus vulgaris*، *Streptomyces albosriseolus* و *Klebsiella* و *Serratia* توانایی تولید یوریکاز را دارند (۲۳ و ۲۴). مخمرها ازجمله *Candida tropicalis* به‌طور کارآمدی یوریکاز را با اضافه‌کردن اوریک‌اسید به محیط‌کشت رشد فراهم می‌کنند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند چندین قارچ ازجمله *Deuteromycotina*، *Zygomycotina*، *Ascomycotina*، *Basidiomycotina* و *Mastigomycotina* توانایی تولید یوریکاز را دارند (۲۵ و ۲۶). شاخص‌های گوناگون ازجمله اسیدیته، دما و کوفاکتورها[5] برای فعالیت بهینهٔ انواع یوریکازها ضروری هستند. یوریکاز میکروبی به‌عنوان عامل کلینیکی برای تعیین غلظت اوریک‌اسید سرم و خون، به‌عنوان بیوسنسور[6] اوریک‌اسید در شکل تثبیت‌شده[7]، به‌عنوان پروتئین دارویی راسبوریکاز[8] برای درمان هایپراوریسمیا[9] و همچنین به‌عنوان عامل رنگ‌کنندهٔ مو کاربرد دارد (۲۵-۲۷). هدف پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد یوریکاز از فضولات پرندگان است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های مدنظر از کودهای بومی موجود در فروشگاه‌های پرنده‌فروشی شهر کرمان انتخاب شدند. نمونه‌های انتخاب‌شده برای انتقال به آزمایشگاه از ۱۰ سانتی‌متری ژرفای کودها برداشته و درون فالکون‌های استریل ریخته شدند.

جداسازی سویه‌های باکتریایی تولیدکنندهٔ یوریکاز: به‌منظور جداسازی باکتری‌های مدنظر از سایر باکتری‌ها و میکروب‌های موجود در محیط نمونه‌های انتخاب‌شده، ۵ گرم از نمونه‌های انتخاب‌شده در محیط مایع اختصاصی اتوکلاوشدهٔ حاوی ۰/۵ گرم اوریک‌اسید، ۰/۲ گرم دی‌پتاسیم‌فسفات، ۰/۰۵ گرم پتاسیم‌دی‌فسفات، ۰/۰۱ گرم منیزیم‌سولفات هفت‌آبه، ۰/۰۱ گرم نمک خوراکی و ۰/۰۱ گرم کلسیم‌کلراید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌منظور رشد باکتری‌های مدنظر حل و برای یک هفته در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با دور چرخش ۱۳۰ دوردردقیقه انکوبه شدند؛ پس‌از یک هفته، ۱ میلی‌لیتر از محیط به محیط اختصاصی جدید تلقیح و برای یک هفته در شرایط یادشده انکوبه شد. این فرایند چهار بار دیگر تکرار شد (۲۳-۲۷).

جداسازی بهترین سویهٔ مولد یوریکاز: به‌منظور جداسازی بهترین سویهٔ مولد یوریکاز، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع اختصاصی حاوی باکتری‌های مدنظر روی محیط جامد اختصاصی اتوکلاوشدهٔ حاوی مواد محیط اختصاصی مایع به همراه ۲ گرم آگار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسیدیتهٔ ۷/۵ به شیوهٔ کشت چمنی روی پلیت‌های استریل کشت داده شد و پس‌از ۲۴ ساعت انکوبه‌شدن در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، کلنی‌ها رشد کردند و دارای هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید شدند. پلیت‌ها برای آزمایش‌های بعدی در یخچال نگهداری شدند.

بررسی رشد و ایجاد هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید: در این فرایند، کلنی‌هایی که رشد بیشتری در کشت چمنی داشتند، با لوپ استریل برداشته و به‌شکل دایره‌وار روی پلیت‌های جامد اختصاصی اتوکلاوشده کشت شدند. سرعت رشد کلنی‌ها و سرعت تولید یوریکاز بررسی شد و بهترین باکتری‌ها ازنظر رشد و تولید یوریکاز برای اطمینان از تک‌سویه‌بودن کشت شدند؛ سپس کلنی‌هایی که رشد بیشتر و ایجاد هالهٔ بزرگ‌تری داشتند، با لوپ استریل به شیوهٔ کشت خطی روی محیط کشت جامد اختصاصی، کشت چهار مرحله داده شدند تا کلنی‌های خالص به دست آیند؛ درنتیجه، اطمینان حاصل شد که هر کلنی غربال‌شده معرف یک سویهٔ باکتریایی است.

غربال‌گری سویه‌های دارای بیشترین تولید یوریکاز: در این فرایند، کلنی‌های خالص‌شده برای غربال‌گری بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ یوریکاز با لوپ استریل به‌شکل دایره‌وار در محیط جامد اختصاصی کشت شدند و سرعت تولید یوریکاز و رشد تک‌کلنی برای یافتن بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ یوریکاز بررسی شد.

تهیهٔ عصارهٔ آنزیمی: به‌منظور تهیهٔ عصارهٔ سلولی، ابتدا سویهٔ مدنظر در محیط مایع اختصاصی تلقیح و به‌مدت سه روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دور چرخش ۱۳۰ دوردردقیقه انکوبه شد. پس‌از پایان سه روز، محیط کشت در فالکون‌های استریل ریخته شد و فالکون‌ها در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور چرخش ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند؛ سپس سوپ رویی تقریباً دور ریخته شد و رسوب‌های باکتریایی دو بار با بافر فسفات شسته و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر حل شدند. فالکون در بشر پر از یخ به دستگاه سونیکاتور پروب‌دار رسانده شد و به‌شکل ۳۰ ثانیه پالس به ۳۰ ثانیه استراحت برای ۲۰ بار پالس داده شد و دوباره فالکون مدنظر با شرایط یادشده سانتریفیوژ و محلول رویی (عصارهٔ سلولی) برداشت شد. پس‌از انجام این فرایند، عصارهٔ سلولی برای آزمایش‌های بعدی در دمای منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش فعالیت یوریکاز: سنجش فعالیت یوریکاز به دو شیوهٔ استفاده از کیت تشخیص اوریک‌اسید و روش معمولی انجام شد (۲۳-۲۵).

در روش استفاده از کیت، اساس واکنش به این شکل است که اوریک‌اسید، فسفوتنگستن را در محیط قلیایی احیا و به آبی تنگستن تبدیل می‌کند؛ شدت رنگ با مقدار اوریک‌اسید نسبت مستقیم دارد. مقدار ۵۰ میکرولیتر آنزیم حل‌شده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس درون میکروتیوب آزمایش ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر اوریک‌اسید (پیش‌ماده) به آن اضافه شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر معرف اول به آن اضافه و پس از مخلوط کردن، ۵۰۰ میکرولیتر معرف دوم اضافه و مخلوط شد. پس‌از ۱۰ دقیقه نگهداری در بنماری ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، جذب در طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانده شد. به‌منظور کنترل آزمایش، جذب میکروتیوب شاهد هم خوانده شد. میکروتیوب شاهد تمام شرایط میکروتیوب آزمایش را داشت، ولی به‌جای حجم آنزیم، بافر به آن اضافه شده بود.

در روش معمولی، مقدار ۵۰ میکرولیتر آنزیم حل‌شده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس درون میکروتیوب آزمایش ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر اوریک‌اسید (پیش‌ماده) به آن اضافه شد و پس‌از انکوبه‌شدن به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد، جذب در طول موج ۲۹۳ نانومتر خوانده شد. به‌منظور کنترل آزمایش، جذب میکروتیوب شاهد نیز خوانده شد. میکروتیوب شاهد تمام شرایط میکروتیوب آزمایش را داشت، ولی به‌جای حجم آنزیم، بافر به آن اضافه شده بود.

شناسایی مولکولی

استخراج DNA ژنومی از سویه‌های انتخاب‌شدهٔ نهایی: به‌منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا سویه‌های انتخاب‌شده در محیط نوترینت‌آگار کشت تازهٔ ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد داده شدند و سپس DNA ژنومی استخراج شد. به‌منظور اطمینان‌یافتن از درستی استخراج، ۳ میکرولیتر محلول حاوی DNA احتمالی به همراه شناساگر روی چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری و خالص‌بودن DNA هسته‌ای و مقدار DNA استخراج‌شده ارزیابی شد. ژن *16S rDNA* در DNA ژنومی باکتری‌ها تقریباً به‌طور حفاظت‌شده وجود دارد؛ بنابراین با توالی‌یابی کردن این ژن در سویهٔ مدنظر و هم‌ردیف کردن آن با ژن‌های *16S rDNA* موجود در بانک ژن می‌توان سویهٔ مدنظر را شناسایی کرد؛ در این روش، هر DNA برای تکثیرشدن در حجم ۲۵ میکرولیتر آماده می‌شود. آغازگر رفت با توالی 5′-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و آغازگر برگشت با توالی 5′-GGC/T TACCTTGTTACGACTT-3′ اضافه و مخلوط شد.

تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی: محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت پیش‌گام فرستاده شدند و توالی ژن‌های *16S rDNA* آنها تعیین شد. این سویه‌های توالی‌یابی‌شده به شیوهٔ BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در سایت NCBI مقایسه و نزدیک‌ترین سویه‌ها به سویه‌های مدنظر بر اساس میزان شباهت توالی *16S rDNA* تعیین شدند؛ در مرحلهٔ بعد، هشت توالی از توالی‌های سویه‌های دارای درصد شباهت زیاد و یک توالی با درصد شباهت کم (Out Group) به سویه‌های مدنظر در نرم‌افزار MEGA 6 وارد شدند و درخت فیلوژنی آنها ترسیم شد.

نتایج و بحث

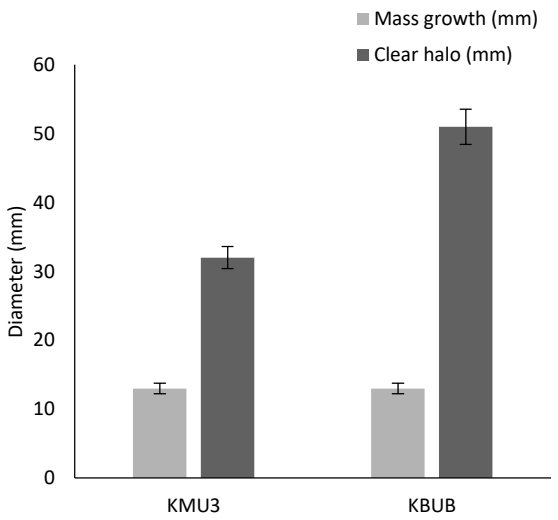
مکان‌های نمونه‌برداری در سطح شهر کرمان: نمونه‌برداری از پرنده‌فروشی‌های سطح شهر کرمان با مختصات جغرافیایی 30°17′14.8″N57°05′07.8″E انجام شد (شکل ۱).

انتخاب کلنی‌های برتر: به‌منظور بررسی میزان تولید یوریکاز، باکتری‌هایی انتخاب شدند که قطر هالهٔ تجزیهٔ یوریکاز بیشتری روی محیط جامد اختصاصی داشتند. میزان فعالیت کلنی‌های مدنظر در شکل ۲ نشان داده شده است.

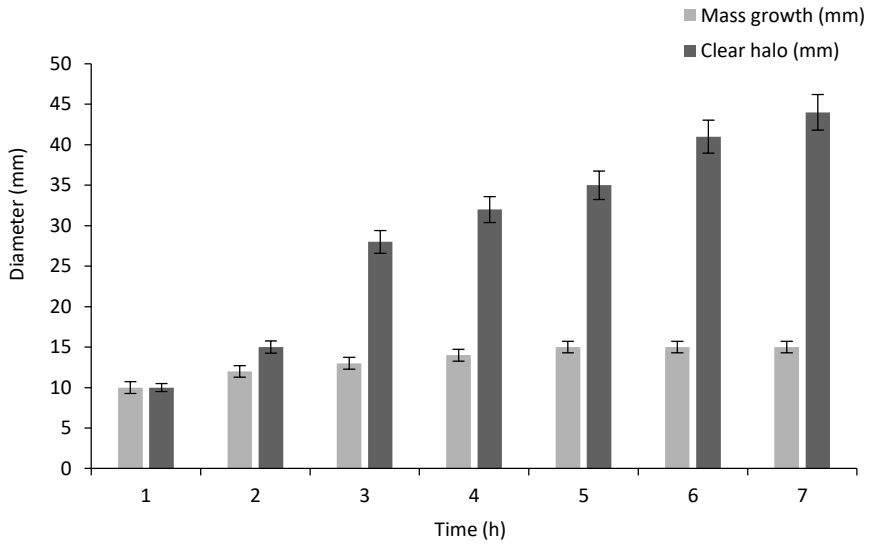
شکل ۱- انواع مناطق نمونه‌برداری

شکل ۲- میزان فعالیت کلنی‌ها در محیط جامد اختصاصی

بررسی سرعت رشد کلنی و سرعت تولید یوریکاز: به این منظور، کلنی‌های مناسب در محیط‌های اختصاصی کشت و میزان تولید یوریکاز و میزان رشد سویه‌ها با اندازه‌گیری قطر هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید و قطر کلنی بررسی شدند. در شکل ۳، میزان کمّی رشد و تولید هاله به‌واسطهٔ یوریکاز در دو سویهٔ برگزیده بررسی شده است. در شکل ۳، میزان رشد و تولید یوریکاز بهترین سویه‌ها نشان داده شده است. نتایج نشان دادند سویهٔ KBUB بیشترین مقدار تولید یوریکاز را دارد و این سویه ۹۶ ساعت پس‌از تلقیح دارای بیشترین مقدار تولید آنزیم می‌شود (شکل ۴).

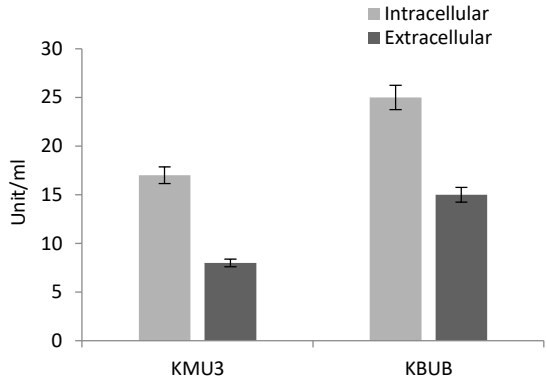


شکل ۳- بررسی میزان رشد و تولید هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید در چهار سویهٔ برگزیده



شکل ۴- بررسی میزان رشد و تولید هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید در باکتری KBUB طی زمان

بررسی میزان درون‌سلولی و برون‌سلولی‌بودن فعالیت آنزیم: به‌منظور تعیین فعالیت درون‌سلولی و برون‌سلولی آنزیم، پس‌از ۲۴ ساعت کشت در محیط مایع اختصاصی، محیط سانتریفیوژ و محلول رویی به‌شکل آنزیم برون‌سلولی سنجیده شد. رسوب باکتریایی با بافر تریس سونیکیت شد تا لیز شود و محلول حاصل از لیز باکتریایی به‌شکل آنزیم درون‌سلولی بررسی شد. در شکل ۵، میزان فعالیت آنزیم درون‌سلولی و برون‌سلولی نشان داده شده است. نتایج نشان دادند آنزیم یوریکازی که باکتری KBUB تولید می‌کند به میزان ۲۵ واحددر میلی‌لیتر درون‌سلولی و ۱۵ واحددر میلی‌لیتر برون‌سلولی است.

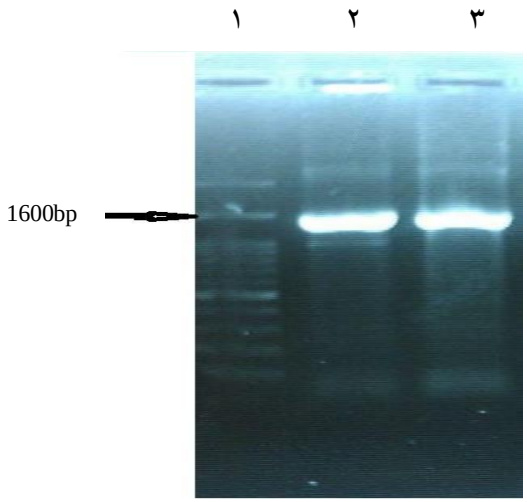


شکل ۵- میزان تولید برون‌سلولی و درون‌سلولی آنزیم یوریکاز سویه‌ها

شناسایی مولکولی

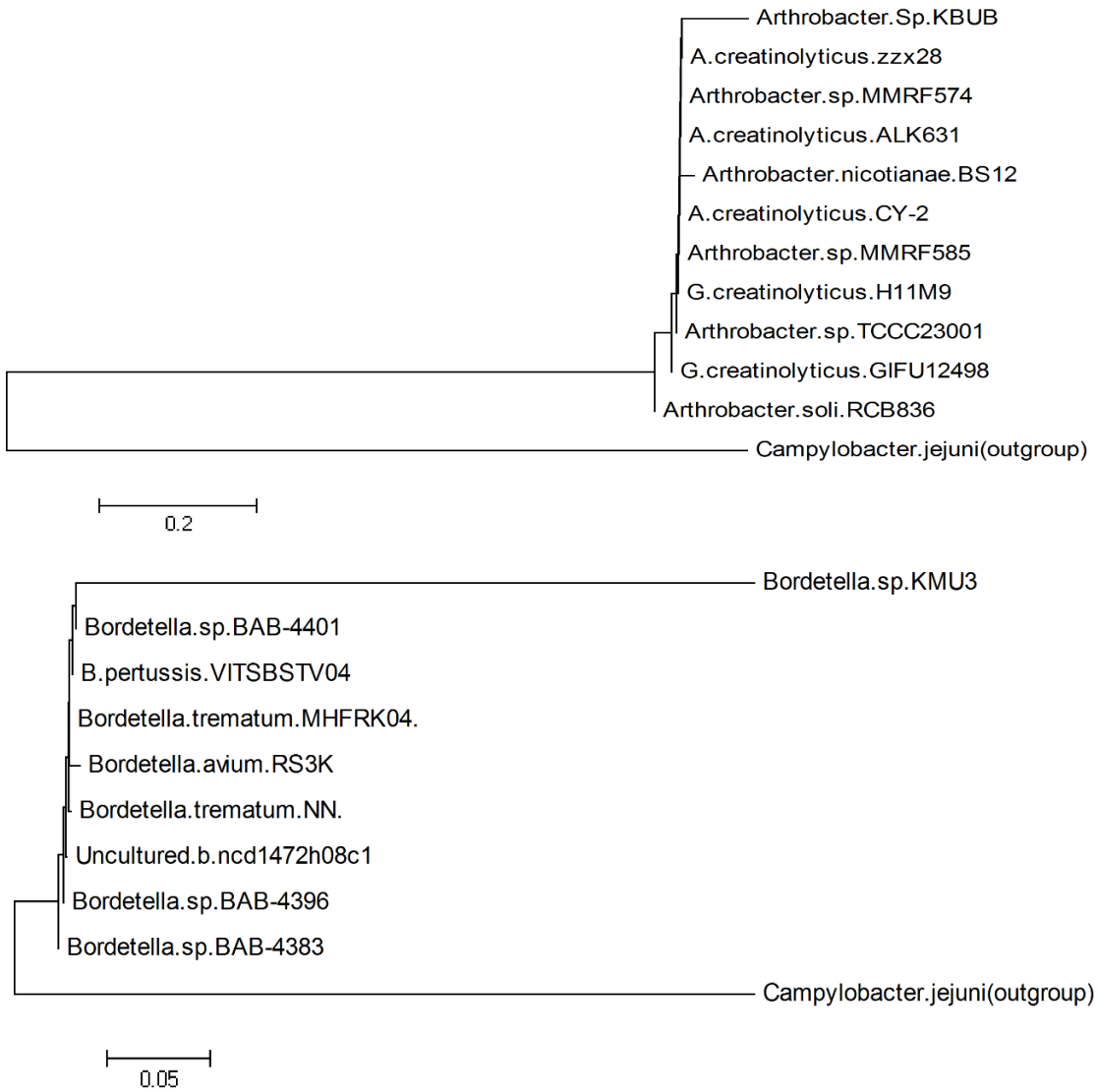
استخراج DNA ژنومی و بارگذاری روی ژل آگارز: استخراج DNA ژنومی سویه‌های KBUB و KMU3 با سه‌فازی‌کردن محیط به روش استفاده از فنل و کلروفرم انجام شد. به‌منظور اطمینان‌یافتن از درستی فرایند استخراج، DNAهای ژنومی استخراج‌شده به همراه شناساگر با پهنای باند ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ کیلوباز روی ژل آگارز بارگذاری شدند و میزان خالص‌بودن DNAهای ژنومی استخراج‌شده با دستگاه الکتروفورز بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): پس‌از مشاهده‌شدن باند DNA ژنومی استخراج‌شده، فرایند PCR برای تکثیر ژن *16S rDNA* روی نمونه‌های استخراج‌شده انجام شد. به‌منظور بررسی نتایج PCR، محصولات آن روی ژل آگارز بارگذاری شدند. در شکل ۶، نتایج PCR دیده می‌شوند. نتایج نشان دادند محصولات PCR اندازه‌ای حدود ۱۶۰۰ جفت باز دارند.



شکل ۶- باندهای محصولات PCR ژن *16S rDNA* روی ژل آگارز؛ ۱. شناساگر، ۲. KBUB، ۳. KMU3

تعیین توالی ژن *16S rDNA* محصولات PCR و رسم درخت فیلوژنی: محصولات فرایند PCR مشاهده‌شده روی ژل آگارز برای تعیین توالی به شرکت پیشگامان ژن فرستاده شدند. پس‌از تعیین توالی، توالی‌های مدنظر با سایر ژن‌های موجود در سایت NCBI هم‌ردیف شدند؛ درنتیجه، جنس و گونهٔ سویه‌های مدنظر مشخص شد. پس‌از هم‌ردیفی و مقایسه با سایر توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژنی NCBI، توالی‌های مدنظر در نرم‌افزار MEGA6 قرار گرفتند و درخت فیلوژنی رسم شد. در شکل ۷، درخت فیلوژنی سویه‌های KBUB و KMU3 مشاهده می‌شود.



شکل ۷- درخت فیلوژنی باکتری‌های *Arthrobacter* sp. KBUB و *Bordetella* sp. KMU3 بر اساس شباهت توالی ژن *16S rDNA*. درخت فیلوژنی به روش neighbor joining و با نرم‌افزار MEGA5 رسم شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم یوریکاز در بسیاری از گونه‌ها (میکروب‌ها تا پستانداران) وجود دارد؛ ولی به‌علت جهش در ژن یوریکاز، پریمات‌ها یوریکاز فعال ندارند (۶). پژوهشگران بسیاری منابع گوناگون یوریکاز را برای یافتن آنزیم جدید و بهتر به‌منظور نیازهای تشخیصی و درمانی پیشنهاد کرده‌اند؛ علاوه‌براین، توجه به استفاده از آنزیم در فرایندهای صنعتی، تحلیلی و پزشکی افزایش یافته است (۶). در پژوهش حاضر، فضولات پرنده‌فروشی‌های سطح شهر کرمان به‌منظور غربال‌گری باکتری‌های مولد یوریکاز نمونه‌برداری شدند. به‌منظور غربال‌گری باکتری‌های مولد یوریکاز در نمونه‌های انتخاب‌شده از محیط اختصاصی استفاده شد. باتوجه‌به قطر هاله‌های ایجادشده از طریق باکتری‌های مولد یوریکاز، دو سویه با کدهای KBUB و KMU3 انتخاب شدند که بیشترین تولید یوریکاز را داشتند. در بهترین

سویهٔ تولیدکنندهٔ یوریکاز، قطر هاله در محیط اختصاصی پس‌از ۲۴ ساعت حدود ۳۹ میلی‌متر تعیین شد. پس‌از سنجش فعالیت آنزیمی، مشخص شد آنزیم سویهٔ KBUB بیشتر درون‌سلولی است(۲۵ واحددر میلی‌لیتر). به‌منظور شناسایی دقیق سویه‌ها، توالی ژن *16S rDNA* آنها تعیین و پس‌از هم‌ردیفی توالی‌های آنها با سایت NCBI مشخص شد سویه‌های به‌دست‌آمده با کدهای KBUB و KMU3 بیشترین شباهت ژنتیکی را به‌ترتیب با *Bordetella trematum* و *Arthrobacter creatinolyticus* دارند. در پژوهش Ghosh و Sarkar در سال ۲۰۱۴، باکتری مصرف‌کنندهٔ اوریک‌اسید از خاک مرغ‌سانان به دست آمد و پس‌از بررسی توالی *16S rDNA*، این باکتری تولیدکنندهٔ یوریکاز برون‌سلولی با فعالیت ۸ واحددرمیلی‌گرم با عنوان *Comamonas* sp BT UA شناسایی شد؛ قطر هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید از طریق این باکتری در محیط‌کشت Nutrient agar-uric acid (NA-UA) برابر ۲۵ میلی‌متر طی ۲۴ ساعت بود (۷). در سال ۲۰۱۴، Nanda و همکاران سه گونه باکتری را از منابع مرغ‌سانی جداسازی کردند که توانایی تولید یوریکاز برون‌سلولی داشتند و بهترین باکتری تولیدکنندهٔ یوریکاز که بیشترین فعالیت (۱۵ واحددر میلی‌لیتر) را داشت، بر اساس توالی *16S rDNA* با عنوان *Bacillus cereus* DL3 در نظر گرفته شد (۲۵). در پژوهش Khade و همکاران در سال ۲۰۱۶، دو باکتری *Pseudomonas aeruginosa* Ph3 و *Pseudomonas aeruginosa* 5Y2 تولیدکنندهٔ یوریکاز برون‌سلولی با فعالیت به‌ترتیب ۱۳/۴۲ و ۱۷/۷۷ واحددر میلی‌لیتر شناسایی کردند. قطر هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید از طریق Y25 و Ph3 در محیط‌کشت Nutrient agar-uric acid (NA-UA) به‌ترتیب برابر ۲۵ و ۱۷ میلی‌متر طی ۲۴ ساعت بود (۲۸). در پژوهش Azab و همکاران در سال ۲۰۰۵، هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید در باکتری‌های *P. vulgaris* 1753، *P. vulgaris B*-317-*C*، *S. graminofacience* و *S. albidoflavus* اندازه‌گیری شد؛ قطر هالهٔ تجزیهٔ اوریک‌اسید از طریق باکتری‌های یادشده در انواع محیط‌های کشت به‌ترتیب برابر ۱۴، ۱۸، ۴ و ۶ میلی‌متر طی ۲۴ ساعت بود (۲۹). باتوجه‌به داده‌های یادشده مشخص می‌شود میکروب‌ها منابع خوبی برای تولید آنزیم یوریکاز هستند و در محیط‌هایی که اوریک‌اسید به‌طور طبیعی وجود دارد (فضولات پرندگان)، باکتری‌های تولیدکنندهٔ یوریکاز یافت می‌شوند. باتوجه‌به قطر هاله در محیط جامد و میزان فعالیت آنزیمی در محیط مایع، سویهٔ KBUB قابلیت زیادی در تولید یوریکاز دارد؛ درنتیجه، سویهٔ یادشده می‌تواند برای تولید انبوه این آنزیم مهم استفاده شود.

References

(1) Ghiuță I., Cristea D., Croitoru C., Kost J., Wenkert R., Vyrides I., Anayiotos A., Munteanu D. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using *Bacillus* species. *Applied Surface Science* 2018; 438: 66-73.

(2) Kumar CG., Mamidyala SK. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 84(2): 462-466.

(3) Muthukkumarasamy S., Sharadha A., Vignesh S., Dhanabalan K., Gurunathan K. Extracellular synthesis of polygonal silver nanoparticles using extract of *Escherichia coli* ATCC 25922 and its antibacterial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2012; 7: 1419-1426.

(4) Saifuddin N., Wong CW., Yasumira AA. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *Journal of Chemistry* 2009; 6(1): 61-70.

(5) Rai T., Panda D. An extracellular enzyme synthesizes narrow-sized silver nanoparticles in both water and methanol. *Chemical Physics Letters* 2015; 623: 108-1012.

(6) Ravichandran R., Hemaasri S., Cameotra SS., Jayaprakash NS. Purification and characterization of an extracellular uricase from a new isolate of *Sphingobacterium thalpophilum* (VITPCB5). *Protein Expression and Purification* 2015; 114: 136-142.

(7) Ghosh T., Sarkar P. Isolation of a novel uric-acid-degrading microbe *Comamonas* sp. BT UA and rapid biosensing of uric acid from extracted uricase enzyme. *Journal of Biosciences* 2014; 39(5): 805-819.

(8) Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96(24): 13611-13614.

(9) Wei X., Luo M., Li W., Yang L., Liang X., Xu L., Kong P., Liu H. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and $AgNO_3$. *Bioresource Technology* 2012; 103(1): 273-278.

(10) Oves M., Khan MS., Zaidi A., Ahmed AS., Ahmed F., Ahmad E., Sherwani A., Owais M., Azam A. Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS one* 2013; 8(3): e59140.

(11) Cavaco-Paulo A., Gubitz G. *Textile processing with enzymes*. 1st ed. Netherlands: Elsevier; 2003.

(12) Tavčer PF. Biotechnology in textiles–an opportunity of saving water. In: Einschlag FSG., editor. *Waste Water-Treatment and Reutilization*. London, UK: InTech; 2011: 387-404.

(13) Mojsov K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)* 2012; 2(10): 583-609.

(14) Kamerlin SC., Warshel A. At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2010; 78(6): 1339-1375.

(15) Álvarez-Lario B., Macarrón-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology* 2010; 49(11): 2010-2015.

(16) Cammalleri L., Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *International Journal of Medical Sciences* 2007; 4(2): 83-87.

(17) Zhang H., Li Q., Lu Y., Sun D., Lin X., Deng X., He N., Zheng S. Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by Corynebacterium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2005; 80(3): 285-290.

(18) Parikh RY., Ramanathan R., Coloe PJ., Bhargava SK., Patole MS., Shouche YS., Bansal V. Genus-wide physicochemical evidence of extracellular crystalline silver nanoparticles biosynthesis by *Morganella* spp. *PLoS One* 2011; 6(6): e21401.

(19) Wadhwani SA., Shedbalkar UU., Singh R., Karve MS., Chopade BA. Novel polyhedral gold nanoparticles: green synthesis, optimization and characterization by environmental isolate of *Acinetobacter* sp. SW30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014; 30(10): 2723-2731.

(20) Wallrath LL., Friedman TB. Species differences in the temporal pattern of Drosophila urate oxidase gene expression are attributed to trans-acting regulatory changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991; 88(13): 5489-5493.

(21) Yamamoto K., Kojima Y., Kikuchi T., Shigyo T., Sugihara K., Takashio M., Emi S. Nucleotide sequence of the uricase gene

from *Bacillus* sp. TB-90. *The Journal of Biochemistry* 1996; 119(1): 80-84.

(22) Montalbini P., Redondo J., Caballero JL., Cárdenas J., Pineda M. Uricase from leaves: Its purification and characterization from three different higher plants. *Planta* 1997; 202(3): 277-283.

(23) Tanaka A., Yamamura M., Kawamoto S., Fukui S. Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as a substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 1977; 34(4): 342-346.

(24) Mahmoud M., El Dein N., El-Fallal A. Screening of some fungi for uricolytic activity. *Qatar University Science Journal* 1996; 16(1): 71-76.

(25) Nanda P., Jagadeesh Babu PE. Isolation, screening and production studies of uricase producing bacteria from poultry sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 2014; 44(8): 811-821.

(26) Amirthanathan A., Vijayakumar S. Purification and optimization of uricase enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Sciences* 2011; 2(11): 5-8.

(27) Lotfy WA. Production of a thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenulatus* strain. *Bioresource Technology* 2008; 99(4): 699-702.

(28) Khade S., Srivastava SK., Tripathi AD. Production of clinically efficient uricase enzyme induced from different strains of Pseudomonas aeruginosa under submerged fermentations and their kinetic properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2016; 8: 139-145.

(29) Azab EA., Ali MM., Fareed MF. Studies on uricase induction in certain bacteria. *Egyptian Journal of Biology* 2005; 7(1) 44-54.

[1]- Xanthine oxidase
[2]- Hyperuricemia
[3]- Gout
[4]- Biosensor
[5]- Cofactors
[6]- Biosensor
[7]- Immobilize
[8]- Rasburicase
[9]- Hyperuricemia