Research Paper

Isolation and Molecular Identification of Lipid-Degrading Bacteria from Industrial Wastewater

Naimeh Khezeli[1*], Maryam Sadrnia[2*], Reza Haji Hosseini [3]

1. Master of Sciences in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Payam Noor University, Iran
2. Associated Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Iran
3. Professor, Department of Biochemistry, Payam Noor University, Iran

Commented [A1]: شماره ارکید اشتباه است

Received: 2023/07/17 **Accepted:** 2023/11/01

Abstract

Background: Microbial lipases are an important group of enzymes with biotechnology value. In the present research, an attempt was made to isolate and identify lipase-producing microbial strains from industrial wastewater samples.

Materials and Methods: After taking samples from sewage and sewage from different places,16 colonies were isolated from these samples. The isolates were cultured in a specific culture medium containing Tween80 to check the ability to produce lipase enzyme. Enzyme activity was determined using the light absorption curve. In order to identify the isolates molecularly, ribotyping was performed. For this purpose, the DNA of the isolates was extracted and PCR was performed with the help of 16SrRNA gene primers. The PCR product was sequenced and the strains were identified using sequence blast in the NCBI database.

Results: Out of a total of 16 isolates, ten strains (62.5%) were able to produce lipase enzyme as a result of creating a transparent halo in the culture medium of the lipid test. Among these, two isolates with the same halo formation rate and source of isolation, which had the highest growth and activity after 144 hours were selected from the culture. Enzyme activity values for bacteria isolated from slaughterhouse effluent and garage effluent ranged from 2.99 to 22.65 and 3.73to 39.2 units/ml, respectively.

Conclusion: Due to their very high lipase activity compared to the strains introduced in other researches, Aeromonas veroni and Copriavidus metallidurans bacteria are suggested as very suitable and efficient strains for the biological treatment of wastewater.

***Corresponding Author:** Maryam Sadmia
Address: Department of Biology, Payam Noor University
Tel: 09188608302
E-mail: msadrnia@pnu.ac.ir

Keywords: Industrial wastewater, Lipid decomposition, Molecular identification

How to cite this article: Khezeli N, Sadrnia M, Haji Hosseini R. Isolation and Molecular Identification of Lipid-Degrading Bacteria from Industrial Wastewater, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2024; 30(6):704-717.

Copyright © 2024 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

Introduction

Microbial lipases are an important group of enzymes with biotechnology value. This group is very suitable for various industrial applications due to specific enzyme characteristics and substrate specificity. Attempts to isolate microorganisms that produce lipase have always been of interest because this enzyme is used in biotechnology, protein, textile, dairy, oil processing, surfactant production, and chemical drug synthesis. Since each industrial application may have one property of the enzyme, there is interest in finding new lipases that can create new applications. Therefore, in the present study, an attempt was made to isolate lipase-producing bacterial strains from the effluents and wastewaters of places such as slaughterhouses and garages, and after determining their lipase activity, molecular identification of the strains was carried out.

Today, many species of microorganisms are known in nature or are being isolated, which help to clean the environment. Lipolytic bacteria break down lipid compounds by producing lipase enzyme. Various microorganisms such as fungi, yeasts and bacteria can produce lipase enzyme and have the ability of lipase activity. Various places such as sewage and soil contaminated with petroleum and oily compounds, compost and hot springs are among the places where these microorganisms can be isolated to produce lipase enzyme.

Oily wastes are among the wastes that have a lot of organic matter and the COD of these wastes is reported between 30 and 100 grams per liter. The discharge of these wastes into the environment and surface water will cause a severe decrease in oxygen and damage to aquatic life. The amount of fat and oil in these effluents is about 1.5 to 15 grams per liter, which can cause serious problems in sewage treatment systems, such as sudden discharge of sludge from the treatment system, reduction of oxygen supply to microorganisms. Currently, enzymatic treatment of these types of wastewater is the subject of various researches conducted by various researchers. To do this, lipase enzyme is needed, which breaks down the composition of oil into fatty acid and glycerol. These compounds are more easily used by microorganisms compared to oily compounds with longer side chains.

There are research reports and inventions that report the use of microorganisms or enzymes in the laboratory for the biological treatment of wastewater with high concentrations of fat and oil. For example, the Japanese company Meito Sangyo Co. has produced lipase from Candida rugosa species (Lipase-MY) to remove fat from wastewater. In addition, Neozyme International Inc. has successfully produced and commercialized biocatalytic formulations of fat, oil, and grease (FOG) removers.

Methodology

After taking samples from sewage and sewage from different places, 16 colonies were isolated from these samples. The isolates were cultured in a special culture medium containing Tween 80 and were cultured from a lipase-producing actinomycete strain to check the lipase enzyme production ability, and were considered as a positive control. Enzyme activity in two isolates was evaluated by determining the optical absorption curve and based on the standard lipase diagram. Ribotyping was performed for molecular identification of the isolates. For this purpose, the DNA of the isolates was extracted with the help of the kit, and the quantitative and qualitative evaluation of the extracted DNA was performed with electrophoresis and nanodrop device. Then PCR was performed on the isolates with the help of 16S rRNA gene primers and the PCR product was sequenced. After determining the genomic sequence of 16SrRNA of both isolates, using sequence blast in NCBI database, the strains were identified.

Results

Isolation of lipase-producing strains: after culturing the samples in the special environment of lipase-producing bacteria, the plates were examined 24, 48 and 72 hours later. Then it was removed from the single colonies and re-cultivated to check and measure the zone of inhibition.

Investigating the aura was created by the isolates in the dedicated culture environment. a) 1: garage sample of colony 1, 2: sample of restaurant 3, 3: sample of slaughterhouse 2, colony 1, 4: garage sample of colony 2. b) 1: sample of household liquid fat, 2: sample of slaughterhouse

1, colony 2, 3: sample Shiny dry fat, 4: Slaughterhouse sample 1 colony 1.

Among the above samples, two samples of slaughterhouse 2, colony 1 and the garage sample of colony 2 in terms of zone of inhibition formation and its size, as well as the type of environment obtained from industrial effluents and close to the subject of the present research, for further work and isolation Lipid-degrading bacteria were used.

Morphological identification: the isolates were stained using gram method, most of which were gram negative bacilli. Among them, two gram-positive bacilli and one coccobacillus were also observed.

The standard curve of lipase activity: The standard curve of lipase was drawn.

Enzyme activity of the isolates: In order to check and measure the enzyme activity of the isolates, first their light absorption was measured and based on them, the light absorption curves and enzyme activity of the isolates were drawn.

Ribotyping of isolates: In order to carry out ribotyping, polymerase chain reaction was first performed according to what was mentioned in the materials and methods section. Then 5 microliters of the reaction product was run in agarose gel to check the correctness of PCR performance. The product of the PCR reaction was analyzed using electrophoresis in agarose gel.

After determining the genomic sequence of 16SrRNA of both isolates, using sequence blast in NCBI database, the strains were identified. The sequence related to the isolate isolated from the wastewater of the poultry slaughterhouse was blasted in the NCBI gene bank and was shown to be similar to Aeromonas veroni bacteria with 98% identity and E.value of 0.0. The sequence related to the isolate isolated from the garage wastewater was also blasted in the NCBI gene bank and with 98% identity and E.value of 0.0, it was shown to be similar to Burkholderiaceae family and Copriavidus metallidurans species. Both mentioned isolates have been identified as new strains and their gene sequences are in the NCBI and EBI databases with the internet address https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Khezeli and https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=nucleotideSequences&query=Khezeli&submit1=1&requestFrom=ebi_index were registered under Accession: MK241569.1 and Accession: MK240539.1.

Discussion

In the present study, after taking samples from sewage and sewage from different places, the production of lipase enzyme was evaluated in them. Then the enzymatic activity of the isolates was determined based on the lipase standard curve and finally the bacterial isolates were identified. 16 different colonies were isolated from these samples and then they were cultured again in Tween Agar medium to check the clear aura (which is caused by the production of fatty acid and its combination with calcium salts and indicates lipase activity). Among these, ten colonies (62.5%) were able to produce lipase enzyme and thus create a clear aura. Two samples of slaughterhouse 2, colony 1 and garage sample of colony 2 were used to determine the level of enzyme activity and molecular identification in terms of zone of inhibition formation and size, as well as the type of environment obtained from industrial effluents and close to the subject of this research. Bacterial isolates were examined under a microscope after gram staining, most of which were gram-negative bacilli. Among them, two gram-positive bacilli and one coccobacillus were also observed. In previous studies, most of the bacteria that had lipase properties had a rod-shaped appearance, for example, in the study of Al-Bastavi et al., the isolated lipolytic bacteria were Pseudomonas and Escherichia species, which are bacilli. Ertugharel et al also isolated Bacillus species as lipolytic bacteria. In the study of Gitachapa et al., the isolated lipolytic bacteria was rod-shaped Pseudomonas

Conclusion

In the present study, lipid-degrading bacteria were isolated from wastewater and it was proved that the lipase production of two bacteria is much higher than most of the lipase-producing bacteria in other studies. Molecular identification of these two colonies showed that they are two new strains of Aeromonas veroni and Copriavidus metallidurans. Due to its very high lipase activity and lack of pathogenicity, Copriavidus metallidurans is recommended as a very suitable and efficient bacterium for the biological treatment of wastewater. The new strain of Aeromonas veroni can also be used in wastewater treatment after pathogenicity tests or removal of its pathogenic gene through genetic engineering.

Acknowledgment

This article has been extracted from the results of Master's thesis No. 49961, Microbial Biotechnology, Payame Noor University. In this regard, the assistance of the esteemed research assistant of the university is appreciated.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

مقاله پژوهشی

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده لیپید از پساب‌های صنعتی و شناسایی مولکولی آنها

نعیمه خزلی[1]، مریم صدرنیا[2]*، رضا حاجی حسینی[3]

۱. کارشناس ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران
۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران
۳. استاد گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶/ ۰۴/ ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۰/ ۰۸/ ۱۴۰۲

* نویسندهٔ مسئول: دکتر مریم صدرنیا
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.
تلفن: ۰۹۱۸۸۶۰۸۳۰۲
رایانامه: msadrnia@pnu.ac.ir
شناسه ORCID: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۰۳۰-۳۳۴۳
شناسه ORCID نویسنده اول: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۱۰۳۰-۳۳۴۳

چکیده

زمینه و هدف: لیپازهای میکروبی، گروه مهمی از آنزیم‌های باارزش بیوتکنولوژی محسوب می‌شوند. در تحقیق حاضر تلاش شد تا سویه‌های میکروبی تولیدکننده لیپاز ازنمونه‌های پساب‌های صنعتی جداسازی و شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها: پس ازنمونه‌برداری از فاضلاب و پساب محل‌های مختلف، ۱۶ کلونی از این نمونه‌ها جداسازی شد. جدایه‌ها برای بررسی توانایی تولید آنزیم لیپاز، همراه با یک سویه اکتینومیست به‌عنوان کنترل مثبت، در محیط کشت اختصاصی حاوی توئین۸۰، کشت داده شدند. فعالیت آنزیمی براساس نمودار استاندارد لیپاز، بررسی شد. به‌منظور تشخیص مولکولی جدایه‌ها ریبوتایپینگ انجام شد. بدین منظور، DNA جدایه‌ها با کمک کیت، استخراج شدند و با الکتروفورز و دستگاه نانودراپ ارزیابی گردید. سپس PCR با کمک پرایمرهای ژن ۱۶SrRNA صورت گرفته و محصول PCR تعیین توالی شده و با استفاده از بلاست توالی‌ها در پایگاه داده NCBI، سویه¬ها شناسایی شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۶ جدایه، ده سویه (۶۲/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم لیپاز و در نتیجه ایجاد هاله شفاف در محیط کشت حاوی لیپید بودند. از این میان، دو جدایه با میزان تشکیل هاله و منبع جداسازی مشابه که بیشترین رشد و فعالیت را در ۱۴۴ ساعت پس از کشت نشان داده بودند، انتخاب شدند. مقادیر فعالیت آنزیمی برای باکتری جداشده از پساب کشتارگاه و پساب مکانیکی به‌ترتیب در بازه بین ۲/۹۹ تا ۲۲/۶۵ و ۳/۷۳ تا۳۹/۲ واحد بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: باکتری‌های آئروموناس ورونی و کوپریاویدوس متالیدورانس به دلیل فعالیت لیپازی بسیار بالا نسبت به سویه‌های معرفی‌شده در سایر تحقیقات، به‌عنوان سویه‌های بسیارمناسب و کارآمد جهت تصفیه زیستی پساب‌ها پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها:
پساب صنعتی، باکتری‌ها، تجزیه لیپید، شناسایی مولکولی.

۱. مقدمه

با توجه به افزایش آلاینده‌های زیست‌محیطی، بحران آب موجود و به خطر افتادن سلامتی بشر و محیط زیست، اهمیت تصفیه فاضلاب‌ها و پساب‌های صنعتی و غیرصنعتی روزبه‌روز بیشتر احساس می‌شود. همچنین شیرابه‌های خطرناک که در نتیجه صنعتی‌شدن جامعه است، یکی از مشکلات جامعه امروزی به‌شمار می‌رود که نباید بدون تصفیه در محیط رها شوند [۱].

پساب‌های حاوی امولسیون‌های روغن در آب، در بسیاری از صنایع همچون فلزکاری، پالایش نفت، صنایع پتروشیمی، صنایع غذایی، صنایع چرم و صیقل فلزات تولید می‌گردند. منشأ این پساب‌ها شامل سیالات خنک‌سازی در فرایندهای فلزکاری (نورد فلز، برش فلز و سیم‌سازی)، حمام‌های شستشو برای تمیزکاری قطعات فلزی و پساب‌های کارواش‌ها می‌باشد. روغن‌های موجود در این پساب‌ها به‌عنوان آلودگی‌های خطرناک طبقه‌بندی می-شوند و پیش از استفاده مجدد از آب یا تخلیه به سیستم فاضلاب

Copyright © 2024 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

و آب‌های سطحی، باید جدا شوند. این پساب‌های روغنی عمدتاً به شکل امولسیون‌های روغن در آب می‌باشند که مشکلات زیادی را برای صنایعی که ملزم به رعایت استانداردهای زیست محیطی می‌باشند، ایجاد می‌کند [۲].

روش‌های مرسوم حذف آلودگی و تجزیه برخی ترکیبات از پساب شامل حذف شیمیایی مانند اکسیداسیون، استفاده از کاتالیست‌ها و حذف فیزیکی می‌باشند. روش‌های مذکور معایب متعددی همچون برجاگذاشتن تأثیرات جانبی، هزینه بالا و کاهش راندمان تجزیه را دربر دارند که روش‌های نوین می‌توانند جایگزین آنها شوند. پاکسازی و تجزیه زیستی توسط ارگانیسم‌های طبیعی، مزیت‌های بیشتری نسبت به سایر روش‌ها دارد که از آن میان می‌توان به‌سرعت بالای رشد و فعالیت متابولیک گسترده اشاره شد [۳].

امروزه گونه‌های متعددی از میکروارگانیسم‌ها در طبیعت شناخته شده‌اند یا در حال جداسازی هستند که به پاکسازی محیط‌زیست کمک می‌کنند [۴]. باکتری‌های لیپولیتیک با تولید آنزیم لیپاز باعث تجزیه ترکیبات لیپیدی می‌شوند. میکروارگانیسم‌های مختلفی ازجمله قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها می‌توانند آنزیم لیپاز را تولید کنند و توانایی فعالیت لیپازی داشته باشند. مکان‌های مختلفی مانند فاضلاب‌ها و خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و روغنی، کود کمپوست و چشمه‌های آب گرم نیز ازجمله محل‌هایی است که می‌توان این میکروارگانیسم‌ها را برای تولید آنزیم لیپاز جداسازی کرد [۵].

پساب‌های روغنی از جمله پساب‌هایی می‌باشند که دارای مواد آلی زیادی بوده و COD این پساب‌ها بین ۳۰ تا ۱۰۰ گرم در لیتر گزارش شده است. تخلیه این پساب‌ها به محیط‌زیست و آب‌های سطحی باعث کاهش شدید اکسیژن و آسیب به حیات آبزیان خواهد شد. مقدار چربی و روغن نیز در این پساب‌ها حدود ۱/۵ تا ۱۵ گرم در لیتر می‌باشد که می‌تواند در سیستم‌های تصفیه فاضلاب باعث مشکلات جدی ازجمله خروج یک‌باره لجن از سیستم تصفیه، کاهش اکسیژن‌رسانی به میکروارگانیسم‌ها، تجمع و ایجاد بوی شدید شود [۶]. در حال حاضر تصفیه آنزیمی این گونه فاضلاب‌ها موضوع تحقیقاتی مختلفی است که محققان مختلف انجام داده‌اند. برای انجام این کار نیاز به آنزیم لیپاز می‌باشد که باعث شکسته‌شدن ترکیب روغن به اسید چرب و گلیسرول می‌شود. این ترکیبات در مقایسه با ترکیب روغنی با زنجیره جانبی بلندتر، به‌صورت راحت‌تری مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد [۷].

گزارش‌های تحقیقاتی و اختراعاتی وجود دارد که استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا آنزیم‌های موجود در آزمایشگاه را برای تصفیه بیولوژیکی پساب‌هایی با غلظت‌های بالای چربی و روغن گزارش کرده‌اند. برای مثال، شرکت ژاپنی Meito Sangyo Co لیپاز را از گونه Candida rugosa (Lipase-MY) برای حذف چربی از پساب‌ها، تولید کرده است. علاوه بر این، شرکت Neozyme International Inc فرمولاسیون‌های کاتالیزوری زیست‌شناختی از بین برنده چربی، روغن و گریس (FOG) را با موفقیت تولید کرده و این محصولات را در معرض فروش قرار داده است [۸].

تلاش برای جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که لیپاز تولید می‌کنند، همیشه مورد توجه بوده است زیرا این آنزیم در صنایع بیوتکنولوژی، پروتئین، صنایع نساجی، صنایع لبنی، پردازش نفت، تولید سورفکتانت‌ها و سنتز داروهای شیمیایی استفاده می‌شود. از آن‌جایی که هر کاربرد صنعتی ممکن است خاصیتی از آنزیم داشته باشد، علاقه به پیداکردن لیپازهای جدید نیز وجود دارد که می‌تواند برنامه‌های کاربردی جدیدی را ایجاد کند [۹]. این مسئله، نوآوری تحقیق را مشخص می‌سازد.

بر همین اساس در مطالعه حاضر تلاش شد تا سویه‌های باکتریایی تولیدکننده لیپاز از پساب‌ها و فاضلاب‌های مکان‌هایی همچون کشتارگاه و مکانیکی جداسازی شوند و پس از تعیین فعالیت لیپازی آن‌ها، شناسایی مولکولی سویه‌ها انجام شود.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها: ده نمونه مورداستفاده در تحقیق حاضر که از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود، شامل سه نمونه از رستوران‌هایی در مناطق مختلف تهران (شرق، شمال‌شرقی و مرکز)، دو نمونه از کارخانه مواد غذایی واقع در شهرک صنعتی پایتخت (نمونه‌های A و B)، یک نمونه از چربی غذای خانگی که چند روز در ظرف مانده بود و حالت مایع داشت، یک نمونه از چربی سوخته و خشک‌شده سینی فست فود (نمونه‌های C و D)، دو نمونه از پساب کشتارگاه طیور در شمال کشور (نمونه‌های E و F) و یک نمونه از پساب تعمیرگاه مکانیکی و روغن گریس (نمونه G) بودند.

ارزیابی آنزیم لیپاز: به‌منظور ارزیابی آنزیم لیپاز، از محیط کشت اختصاصی آزمون هیدرولیز توین ۸۰ استفاده شد. پس از کشت‌دادن، پلیت‌ها در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند [۱۰]. ۲۴ تا ۷۰ ساعت بعد، تشکیل کلونی در آن‌ها بررسی شد. همراه با پلیت‌های موردآزمایش، یک پلیت که در آن یک سویه اکتینومیست تولیدکننده لیپاز کشت داده شده بود، به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد [۱۰].

از پلیت‌هایی که در آن‌ها باکتری رشد کرده بود، از هر کلونی به‌صورت نقطه‌ای در پلیت حاوی لیپید برای بررسی تولید آنزیم

لیپاز و تشکیل هاله، کشت داده شد و در انکوباتور قرار گرفت. از کلونی‌های تک به‌دست‌آمده برای شناسایی مورفولوژیک و مولکولی گونه‌ها استفاده شد. از بین نمونه‌های به‌دست‌آمده، از نمونه‌های پساب کشتارگاه طیور نمونه دو کلونی یک و از نمونه پساب مکانیکی کلونی دو، از نظر تشکیل هاله و قطر آن و هم‌چنین نوع محیط که از پساب‌های صنعتی به‌دست آمده بود، برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شد.

شناسایی مورفولوژیک

کلونی‌های جداسازی‌شده، ابتدا با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم، رنگ شد و سپس سلول‌ها در زیر میکروسکوپ و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی گردید.

رسم منحنی فعالیت لیپاز

ابتدا ۰/۰۴۵ گرم سوبسترا (پارانیتروفنل پالمیتات) با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول در میکروتیوب ریخته و کمی در بن‌ماری قرار داده شد تا حل شود. در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۶ میکرولیتر تریتون ریخته شد و سپس سوبسترا که در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول حل شده بود، به آن اضافه شد. پس از افزودن سوبسترا، حالت ابری‌مانندی ایجاد شد که تا یک ساعت پایدار است. آزمایش باید در این یک ساعت انجام می‌شد. در ۶ لوله ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش (بافر+سوبسترا و اتانول+تریتون100x) ریخته شد. سپس در هرکدام با استفاده از سمپلر، مقدار مشخص‌شده آنزیم و PBS1x ریخته شد. لوله‌ها کمی تکان داده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس از درون بن‌ماری خارج و ۲۰۰ میکرولیتر متوقف‌کننده به هرکدام اضافه شد تا واکنش آنزیمی متوقف شود (متوقف‌کننده شامل ۵ میلی‌لیتر استون و ۵ میلی‌لیتر اتانول بود). سپس محتویات هر لوله در دو میکروتیوب ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm قرار گرفتند. یک لوله هم به‌عنوان محلول بلانک آماده شد که حاوی تنها ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (بدون آنزیم و PBS 1x) بود. لوله بلانک نیز به مدت ۱۰ دقیقه در همان دور، سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفوژ، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر بررسی شد. از مایع رویی به‌دست‌آمده از سانتریفوژ محلول بلانک، برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پیش از اینکه مایع رویی دو میکروتیوب مربوط به هر لوله، در ویال اسپکتروفتومتر برای خواندن جذب نوری خالی شود، هرکدام به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند. با استفاده از جذب نوری به‌دست‌آمده و غلظت‌های مربوط به هر نمونه، منحنی استاندارد آنزیم لیپاز رسم و فعالیت آنزیمی آن محاسبه شد [۱۱].

تعیین فعالیت آنزیمی ایزوله‌ها

از هر نمونه حاوی رقت نیم مک فارلند باکتری‌های منتخب، ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و هرکدام در یک ارلن حاوی محیط کشت نوترینت براث ریخته شد. در ارلن‌ها با پنبه و فویل بسته و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت، جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ nm سنجیده شد؛ به این صورت که پس از گذشت ۴۸ ساعت، در دو لوله آزمایش تمیز، در هرکدام ۲/۵ میلی‌لیتر بافر و از هر نمونه به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر ریخته شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفتند. پس از ۱۰ دقیقه، از بن‌ماری درآورده شد و ۲۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده در هرکدام ریخته شد. نمونه‌ها به میکروتیوب‌های استریل، منتقل و با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی میکروتیوب‌ها به نسبت ۱ به ۲ رقیق شد و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۱۰ nm خوانده شد. این مراحل پس از ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت نیز انجام شدند. تمام مراحل چهار بار تکرار شدند. در نهایت با استفاده از فرمولی که از طریق منحنی استاندارد به‌دست آمد و جذب‌های نوری هر دو نمونه، فعالیت آنزیمی نمونه‌ها محاسبه شد.

شناسایی مولکولی

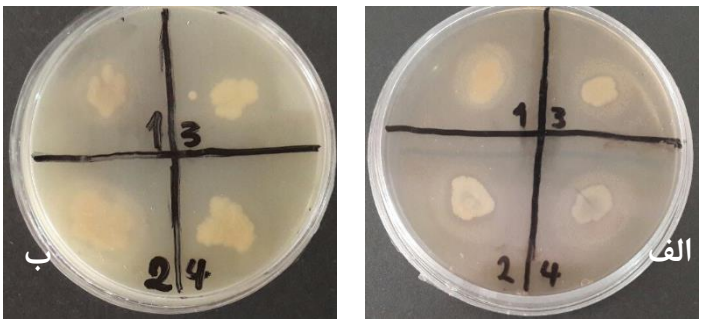
برای استخراج DNA از باکتری، از کیت Gene Transfer Pioneer ساخت ایران استفاده شد. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده، به‌ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز انجام شد. به‌منظور شناسایی مولکولی باکتری‌هایی که بیشترین فعالیت لیپازی را نشان داده و انتخاب شده بودند، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید. برای این منظور از توالی ژن 16S rRNA، AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG به‌عنوان پرایمر Forward و از توالی TACGGYTACCTTGTTACGACTT به‌عنوان پرایمر Reverse استفاده شد. واکنش PCR با یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه آغاز شد و با ۲۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ادامه پیدا کرد. این واکنش با یک مرحله گسترش نهایی به مدت

۵ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد. به‌منظور بررسی محصول PCR از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نظر انجام تعیین سکانس به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. خالص‌سازی محصول PCR توسط شرکت ماکروژن کره صورت گرفت. پس از تعیین سکانس، سکانس با استفاده از برنامه BLAST در بانک ژنی NCBI، بررسی شد و نوع سویه‌های موردمطالعه مشخص گردید.

۳. یافته‌ها

جداسازی سویه‌های تولیدکننده لیپاز: پس از کشت نمونه‌ها در محیط اختصاصی باکتری‌های تولیدکننده لیپاز، پلیت‌ها ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد بررسی شدند. سپس از کلونی‌های تک برداشته شد و برای بررسی و اندازه‌گیری هاله، مجدداً کشت داده شد که نتایج حاصل در تصویر ۱ نشان داده شده است.

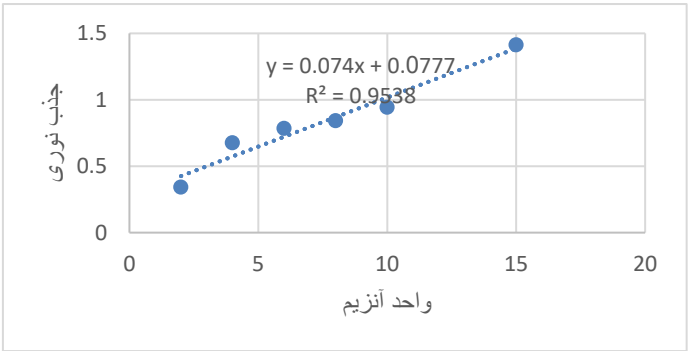


تصویر ۱. بررسی هاله ایجادشده توسط ایزوله‌ها در محیط کشت اختصاصی. الف) ۱: نمونه مکانیکی کلونی ۱، ۲: نمونه رستوران ۳، ۳: نمونه کشتارگاه ۲ کلونی ۱، ۴: نمونه مکانیکی کلونی ۲. ب) ۱: نمونه چربی مایع خانگی، ۲: نمونه کشتارگاه ۱ کلونی ۲، ۳: نمونه چربی خشک براق، ۴: نمونه کشتارگاه ۱ کلونی ۱

از میان نمونه‌های بالا، دو نمونه کشتارگاه ۲ کلونی ۱ و نمونه مکانیکی کلونی ۲ از نظر تشکیل هاله و اندازه آن و هم‌چنین نوع محیط که از پساب‌های صنعتی به‌دست‌آمده و به موضوع تحقیق حاضر نزدیک بوده، برای ادامه کار و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده لیپید استفاده شد.

شناسایی مورفولوژیک

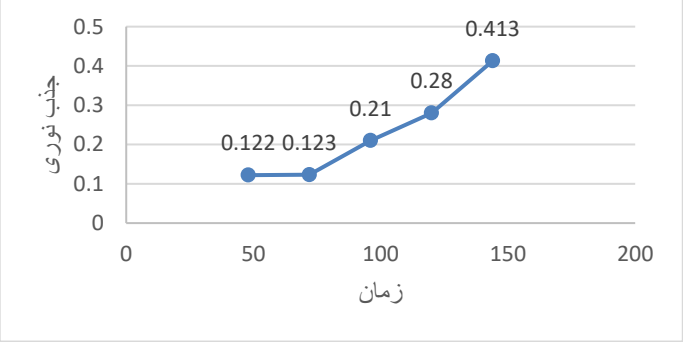
ایزوله‌ها با استفاده از روش گرم، رنگ‌آمیزی شدند که اغلب آنها باسیل‌های گرم منفی بودند. در این میان دو باسیل گرم مثبت و یک کوکوباسیل نیز مشاهده شد. منحنی استاندارد فعالیت لیپازی: منحنی استاندارد لیپاز رسم شد (شکل ۲).



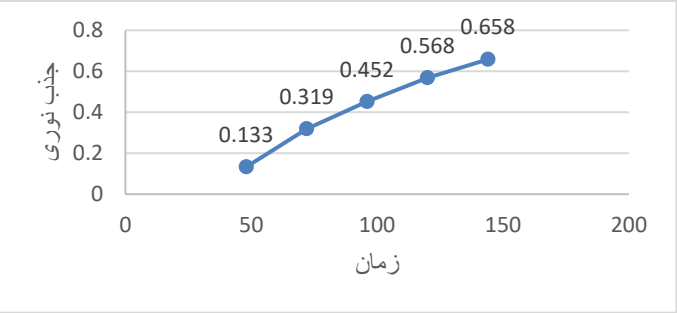
شکل ۲. منحنی استاندارد فعالیت آنزیمی لیپاز

فعالیت آنزیمی ایزوله‌ها

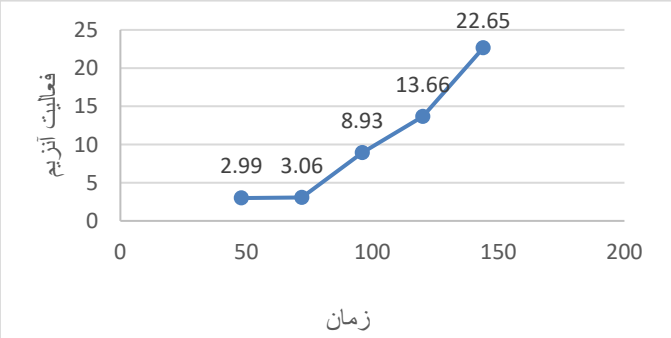
به‌منظور بررسی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ایزوله‌ها، ابتدا جذب نوری آنها سنجیده شد و بر اساس آنها منحنی‌های جذب نوری (شکل ۳ و ۴) و فعالیت آنزیمی (شکل ۵ و ۶) ایزوله‌ها رسم شد.



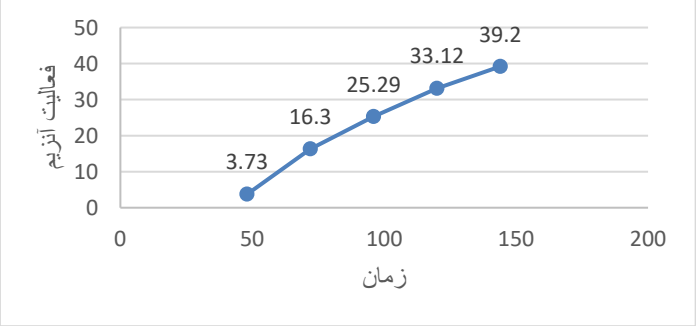
شکل ۳. منحنی جذب نوری سویه جداشده از پساب کشتارگاه طیور



شکل ۴. منحنی جذب نوری سویه جداشده از پساب مکانیکی



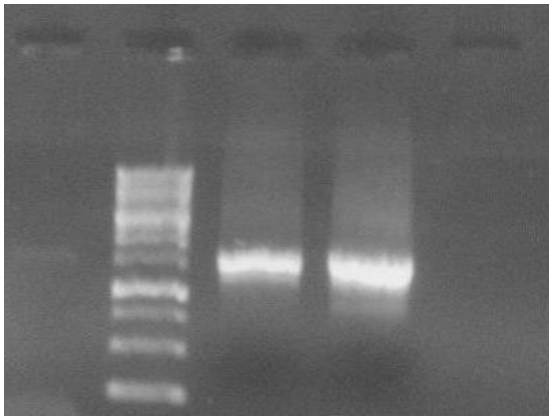
شکل ۵. منحنی فعالیت آنزیمی سویه جداشده از پساب کشتارگاه طیور برحسب یونیت



شکل ۶. منحنی فعالیت آنزیمی سویه جداشده از پساب مکانیکی برحسب یونی

ریبوتایپینگ ایزوله‌ها

به‌منظور انجام ریبوتایپینگ ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مطابق آنچه در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد، انجام گردید. عملکرد PCR در ژل آگارز ران شد. محصول واکنش PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد که نتایج آن در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷. باندهای حاصل از PCR ژنوم دو نمونه جداشده از پساب کشتارگاه و پساب مکانیکی

پس از تعیین توالی ژنومی SrRNA۱۶ هر دو ایزوله، با استفاده از بلاست توالی‌ها در پایگاه داده NCBI، سویه¬ها شناسایی شدند. توالی مربوط به ایزوله جداشده از پساب کشتارگاه طیور در بانک ژنی NCBI بلاست گردید و با ident برابر ۹۸ درصد، و E.value برابر ۰/۰، با باکتری آئروموناس ورونی شباهت نشان داده شد. توالی مربوط به ایزوله جداشده از پساب مکانیکی نیز در بانک ژنی NCBI بلاست گردید و با ident برابر ۹۸ درصد و E.value برابر ۰/۰، از خانواده بورخولدریاسه و گونه کوپریاویدوس متالیدورانس شباهت نشان داده شد. هر دو ایزوله مذکور به‌عنوان سویه‌های جدید، شناسایی و توالی ژن آن‌ها در دو پایگاه داده NCBI و EBI با آدرس اینترنتی https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Khezeli و https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=nucleotideSequences&query=Khezeli&submit1=1&requestFrom=ebi_index تحت شماره‌های Accession: MK241569.1 و Accession: MK240539.1 ثبت شدند.

٤.بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر پس از نمونه‌برداری از فاضلاب و پساب محل‌های مختلف، تولید آنزیم لیپاز در آن‌ها ارزیابی شد. سپس فعالیت آنزیمی ایزوله‌ها بر اساس منحنی استاندارد لیپاز مشخص گردید و در نهایت ایزوله-های باکتریایی، شناسایی شدند. ۱۶ کلونی مختلف از این نمونه‌ها جداسازی شد و سپس برای بررسی هاله شفاف (که ناشی از تولید اسید چرب و ترکیب آن با نمک‌های کلسیم و نشان‌دهنده فعالیت لیپازی است) مجدداً در محیط توبین آگار کشت داده شدند. از این میان، ده کلونی (۶۲/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم لیپاز و در نتیجه ایجاد هاله شفاف بودند. دو نمونه کشتارگاه ۲ کلونی ۱ و نمونه مکانیکی کلونی ۲ از نظر تشکیل هاله و اندازه آن و همچنین نوع محیط که از پساب‌های صنعتی به‌دست‌آمده و به موضوع تحقیق حاضر نزدیک بوده، برای تعیین میزان فعالیت آنزیمی و شناسایی مولکولی استفاده شدند. ایزوله‌های باکتریایی پس از رنگ‌آمیزی گرم، زیر میکروسکوپ بررسی شدند و اغلب آنها باسیل‌های گرم منفی بودند. در این میان دو باسیل گرم مثبت و یک کوکوباسیل نیز مشاهده شد. در مطالعات پیشین نیز اغلب باکتری‌هایی که خاصیت لیپازی داشتند، ظاهر میله‌ای شکل داشتند. برای مثال در مطالعه البسطاوی و همکاران، باکتری‌های لیپولیتیک جداسازی‌شده، گونههای سودوموناس و اشریشیا بودند که باسیل هستند. ارطغرل و همکاران نیز گونه‌های باسیلوس را به‌عنوان باکتری‌های لیپولیتیک جداسازی کردند [۹]. در مطالعه گیتاچاپا و همکاران نیز باکتری لیپولیتیک جداسازی‌شده، سودوموناس میله‌ای‌شکل بود [۹].

فعالیت آنزیمی در دو کلونی (نمونه کشتارگاه ۲ کلونی ۱ و نمونه مکانیکی کلونی ۲) و بر اساس نمودار استاندارد لیپاز، به‌صورت کمی بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که به‌مرور زمان، میزان رشد باکتری‌ها و در نتیجه میزان فعالیت آنزیمی آنها افزایش پیدا می‌کند. در این مطالعه فعالیت آنزیمی در ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت باکتری اندازه‌گیری شد که هر دو باکتری، بیشترین رشد و فعالیت را در ۱۴۴ ساعت پس از کشت نشان دادند. مقادیر فعالیت آنزیمی برای باکتری

جداشده از پساب کشتارگاه بین ۲/۹۹ و ۲۲/۶۵ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. این میزان برای باکتری جداشده از پساب مکانیکی، در بازه ۳/۷۳ تا ۳۹/۲ واحد بر میلی‌لیتر قرار داشت.

یافته‌های Bala نشان داد که میکروارگانیسم‌ها در POME به‌خوبی رشد می‌کنند بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی از POME برای تصفیه زیستی مؤثر، تصفیه زیستی و تجزیه زیستی پساب‌های صنعتی ضروری است. جوزف و همکاران میزان فعالیت لیپازی یک‌سویه استافیلوکوکوس را ۳ واحد بر میلی‌لیتر گزارش کرده که از نوعی ماهی دریایی جدا کردند و پس از بهینه‌سازی محیط کشت، این مقدار را به ۸/۱ واحد بر میلی‌لیتر افزایش دادند [۱۲].

در تحقیق Pelikan گونه‌های sychromonas در رسوبات دریایی متنوع شایع هستند و عامل مهمی در پردازش کربن آلی هستند. این مطالعه بینش جدیدی در مورد هویت‌ها، عملکردها و ژنوم باکتری‌هایی ارائه می‌دهد که ماکرومولکول‌های نکروتوده فراوان در بستر دریا را تخریب می‌کنند. مفاخر و همکاران نیز با استفاده از نوعی مخمر، مقدار فعالیت لیپازی را ۱۱-۸ واحد بر میلی‌لیتر ذکر کردند که با استفاده از ترکیبات مختلف به‌عنوان منبع کربن به‌دست آمده بود [۱۳].

برخی از محققان نیز با استفاده از روش‌هایی مانند کلون‌کردن ژن، فعالیت لیپازی میکروارگانیسم‌ها را افزایش داده¬اند مانند وفا و همکاران (۱۳۹۰) که با استفاده از کلون‌کردن ژن باسیلوس توانسته‌اند فعالیت لیپازی ۱۲-۸ واحد بر میلی‌لیتر را به‌دست آوردند [۱۴].

در تحقیق حاضر مقادیر ۲۲/۶۵ واحد بر میلی‌لیتر برای باکتری جداشده از پساب کشتارگاه طیور و ۳۹/۲ واحد بر میلی‌لیتر برای باکتری جداشده از پساب مکانیکی به‌دست آمد که نسبت به تحقیقات پیشین مقدار بسیار قابل‌قبول‌تری است و بدون نیاز به دستکاری‌های ژنتیکی می‌تواند فعالیت لیپازی بالایی داشته باشد. البته با مقادیر به‌دست‌آمده می‌توان گفت نمونه پساب مکانیکی با اختلافی حدود ۱۷ واحد بر میلی‌لیتر، نسبت به نمونه پساب کشتارگاه، فعالیت لیپازی بالاتری دارد که می‌تواند آنزیم لیپاز بیشتری تولید کند. با توجه به فعالیت لیپازی بالای این دو کلونی، شناسایی مولکولی و شناخت دقیق باکتری‌ها با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای عمومی صورت گرفت. بلاست توالی‌ها در پایگاه داده NCBI نشان داد که این ایزوله‌ها آئروموناس ورونی و کوپریاویدوس متالیدورانس می‌باشند و هر دو باکتری به‌عنوان سویه‌های جدید در پایگاه داده NCBI و نیز EBI به نام نگارنده ثبت شدند.

کوپریاویدوس متالیدورانس به‌طور معمول در رسوبات صنعتی یا زباله‌هایی که حاوی غلظت‌های بالایی از فلزات سنگین هستند، یافت می‌شود. این باکتری اولین‌بار از فاضلاب کارخانه روی، در بلژیک جداسازی شد. بعدها این باکتری در محل‌های دیگری نیز یافت شد [۱۵].

کوپریاویدوس متالیدورانس یک بی‌هوازی اختیاری است و می¬تواند در شرایط عادی متحمل فسفریلاسیون اکسیداتیو گردد اما زمانی که اکسیژن محیط کم باشد، این باکتری می¬تواند نیترات را احیا کند. این باکتری همچنین می‌تواند با جذب برخی مشتقات قندی اسیدی، تولید انرژی کند. زمانی که منابع آلی کربن در دسترس باشند، کوپریاویدوس متالیدورانس می‌تواند با تثبیت و احیای CO2 برای سنتز مولکول‌های آلی، فعالیت اتوتروف داشته باشد. همچنین توانایی اکسیدکردن ترکیبات گوگردی غیرآلی و گاز هیدروژن را دارد. ژن‌های تطبیقی بسیاری در ژنوم این باکتری وجود دارد که در شرایطی که منابع ذکرشده در دسترس نباشند، با کدکردن الکل دهیدروژناز و آلدهید دهیدروژناز، موجب می‌شوند کوپریاویدوس متالیدورانس بتواند از ترکیباتی مانند پروپانول، بوتانول و استون انرژی کسب کند [۱۶]. گونه‌هایی از خانواده بورخولدریاسه گزارش شده¬اند که قادر به تولید لیپاز و فعالیت لیپولیتیک هستند [۱۷] اما تا کنون گزارشی مبنی بر توانایی تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری کوپریاویدوس متالیدورانس مشاهده نشده است.

آئروموناس ورونی یک باکتری میله‌ای‌شکل، متحرک، گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری اغلب در زیر میکروسکوپ به‌صورت تکی دیده می‌شود. آئروموناس ورونی بیشتر از خاک و سیستم‌های آبی ویژه جداسازی شده است. این باکتری در محیط‌های مختلفی ازجمله بدن انسان‌ها، حشرات و زالو نیز وجود دارد. آئروموناس ورونی به‌عنوان فلور میکروبی دستگاه گوارش زالو نیز مشاهده شده است و می‌تواند خون را در دستگاه گوارش زالو تجزیه کند [۱۸].

کاسترو-اسکارپولی و همکاران (۲۰۰۳)، چند گونه آئروموناس را از ماهی یخزده استخراج کردند و پس از شناسایی مورفولوژیک و مولکولی آنها، ویژگی‌های مختلفشان ازجمله ویژگی‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک را مطالعه کردند. تست لیپاز برای همه ایزوله‌های آئروموناس ورونی مثبت بود و ۷۵ درصد آنها دارای ژن‌های lip، lip H3، pla و plc بودند که این ژن‌ها در سنتز لیپاز نقش دارند. تولید لیپاز در باکتری نقش بسیار مهمی در تغذیه و همچنین بیماری‌زایی دارد [۱۹].

در مطالعه حاضر باکتری‌های تجزیه‌کننده لیپید از پساب جداسازی و اثبات شد که تولید لیپاز دو باکتری، نسبت به اکثر باکتری‌های تولیدکننده لیپاز در دیگر مطالعات، بسیار بالاتر است. شناسایی مولکولی این دو کلونی نشان داد که آنها دو سویه جدید از آئروموناس ورونی و کوپریاویدوس متالیدورانس هستند. باکتری کوپریاویدوس متالیدورانس به دلیل فعالیت لیپازی بسیار بالا و بیماری‌زانبودن به‌عنوان یک باکتری بسیار مناسب و کارآمد برای تصفیه زیستی پساب‌ها پیشنهاد می‌گردد. سویه جدید آئروموناس ورونی نیز می‌تواند پس از آزمایش‌های بیماری‌زایی یا حذف ژن بیماری‌زای آن از طریق مهندسی ژنتیک، در راستای تصفیه پساب‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد به شماره ۴۹۹۶۱ رشته زیست فناوری میکروبی دانشگاه پیام نور، مستخرج شده است. در این راستا از مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه قدردانی می‌گردد.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان امور مربوط به مقاله و پیگیری‌های آن را بر عهده داشته‌اند.

حمایت مالی

این پژوهش تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور بوده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

[1]. Tzirita M, Papanikolaou S, Chatzifragkou A, Quilty B. Waste fat biodegradation and biomodification by Yarrowia lipolytica and a bacterial consortium composed of Bacillus spp. and Pseudomonas putida. Eng Life Sci. 2018 Aug 6;18(12):932-942. doi: 10.1002/elsc.201800067. PMID: 32624887; PMCID: PMC6999605.

[2]. Numberger D, Ganzert L, Zoccarato L, Mühldorfer K, Sauer S, Grossart HP, et al. Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. Sci Rep. 2019 Jul 4;9(1):9673. doi: 10.1038/s41598-019-46015-z. PMID: 31273307; PMCID: PMC6609626.

[3]. Yin Y, Wu H, Jiang Z, Jiang J, Lu Z. Degradation of Triclosan in the Water Environment by Microorganisms: A Review. Microorganisms. 2022 Aug 25;10(9):1713. doi: 10.3390/microorganisms10091713. PMID: 36144315; PMCID: PMC9505857.

[4]. Gu Q, Wu Q, Zhang J, Guo W, Ding Y, Wang J, et al. Isolation and Transcriptome Analysis of Phenol-Degrading Bacterium From Carbon-Sand Filters in a Full-Scale Drinking Water Treatment Plant. Front Microbiol. 2018 Sep 21;9:2162. doi: 10.3389/fmicb.2018.02162. PMID: 30298058; PMCID: PMC6160575.

[5]. Welz P, Swanepoel G, Weels S, Le Roes-Hill M. Wastewater from the Edible Oil Industry as a Potential Source of Lipase- and Surfactant-Producing Actinobacteria. Microorganisms. 2021 Sep 18;9(9):1987. doi: 10.3390/microorganisms9091987. PMID: 34576882; PMCID: PMC8465459 .

[6]. Surkatti R, Al Disi ZA, El-Naas MH, Zouari N, Van Loosdrecht MCM, Onwusogh U. Isolation and Identification of Organics-Degrading Bacteria From Gas-to-Liquid Process Water. Front Bioeng Biotechnol. 2021 Jan 15;8:603305. doi: 10.3389/fbioe.2020.603305. PMID: 33520959; PMCID: PMC7844201.

[7]. Pham VHT, Kim J, Chang S, Chung W. Investigation of Lipolytic-Secreting Bacteria from an Artificially Polluted Soil Using a Modified Culture Method and Optimization of Their Lipase Production. Microorganisms. 2021 Dec 15;9(12):2590. doi: 10.3390/microorganisms9122590. PMID: 34946192; PMCID: PMC8708958.

[8]. Sun M, Shi Z, Zhang C, Zhang Y, Zhang S, Luo G. Novel Long-Chain Fatty Acid (LCFA)-Degrading Bacteria and Pathways in Anaerobic Digestion Promoted by Hydrochar as Revealed by Genome-Centric Metatranscriptomics Analysis. Appl Environ Microbiol. 2022 Aug 23;88(16):e0104222. doi: 10.1128/aem.01042-22. Epub 2022 Aug 8. PMID: 35938788; PMCID: PMC9397102 .

[9]. Martinez-Vaz BM, Dodge AG, Lucero RM, Stockbridge RB, Robinson AA, Tassoulas LJ, Wackett LP. Wastewater bacteria remediating the pharmaceutical metformin: Genomes, plasmids and products. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Dec 16;10:1086261. doi: 10.3389/fbioe.2022.1086261. PMID: 36588930; PMCID: PMC9800807.

[10]. Adami ghamsari F , Hosseini F , Khanaferi A , Isolation of Lipolytic Bacteria from Environmental Resources for Biodegradation Polysorbates in Industrial Wastewater. 2015, 22(4), pp. 685-685.

[11]. Vahidinejad H, Pourbabaei AA, Razovian MH, Optimization of lipase enzyme production in the native salt-loving Halo-archea strain isolated from the soil of southern Iran, Journal of Applied Biology 2013- No. 1.

[12]. Bala J JD, Lalung J, Al-Gheethi AAS, Hossain K, Ismail N. Microbiota of Palm Oil Mill Wastewater in Malaysia. Trop Life Sci Res. 2018 Jul;29(2):131-163. doi: 10.21315/tlsr2018.29.2.10. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30112146; PMCID: PMC6072722.

[13]. Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microb Cell Fact. 2020 Aug 26;19(1):169. doi: 10.1186/s12934-020-01428-8. PMID: 32847584; PMCID: PMC7449042.

[14]. Pelikan C, Wasmund K, Glombitza C, Hausmann B, Herbold CW, Flieder M, et al. Anaerobic bacterial degradation of protein and lipid macromolecules in subarctic marine sediment. ISME J. 2021 Mar;15(3):833-847. doi: 10.1038/s41396-020-

00817-6. Epub 2020 Nov 18. PMID: 33208892; PMCID: PMC8027456.

[15]. Reith F, Fairbrother L, Nolze G, Wilhelmi O, Clode PL, Gregg A, et al. Nanoparticle factories: Biofilms hold the key to gold dispersion and nugget formation. Geology. 2010;38(9):843-6. https://doi.org/10.1130/G31052.1

[16]. Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, et al. The complete genome sequence of Cupriavidus metallidurans strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS One. 2010 May 5;5(5):e10433. doi: 10.1371/journal.pone.0010433. PMID: 20463976; PMCID: PMC2864759.

[17]. Liu C-H, Chen C-Y, Wang Y-W, Chang J-S. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate Burkholderia sp. C20. Biochemical engineering journal. 2011;58:96-102. DOI:10.1016/J.BEJ.2011.09.001Corpus ID: 84459238

[18]. Kikuchi Y, Graf J. Spatial and temporal population dynamics of a naturally occurring two-species microbial community inside the digestive tract of the medicinal leech. Appl Environ Microbiol. 2007 Mar;73(6):1984-91. doi: 10.1128/AEM.01833-06. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17277211; PMCID: PMC1828818.

[19]. Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. Characterisation of Aeromonas spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int J Food Microbiol. 2003 Jul 15;84(1):41-9. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00393-8. PMID: 12781953