نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۹، ص. ۸۳-۷۳

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 1, March-April 2020, p. 73-83

ردیابی ژن اندوگلوکاناز در باکتری‌های تجزیه کننده سلولز غربال شده از خاک‌های جنگلی مازندران، ایران

الناز قدیری[۱]- نفیسه سادات نقوی[۲*]- کامران قائدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۷

چکیده

هدف این پژوهش، غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده سلولز از خاک مناطق جنگلی مازندران و ردیابی ژن رمز کننده آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه واجد بالاترین فعالیت سلولازی بوده است. جدایه‌های مولد سلولاز با استفاده از رنگ کنگورد در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز انتخاب شدند و میزان فعالیت اندوگلوکانازی آنها با روش سنجش میزان قند احیای آزاد شده با معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شد. شناسایی گونه باکتری‌ها از طریق تکثیر و توالی یابی 16S rDNA انجام شد. همچنین، تولید آنزیم در جدایه منتخب در شرایط رشدی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس در بانک ژنی توالی‌های ژن اندوگلوکاناز در سویه های مختلف گونه باکتریایی که واجد بالاترین فعالیت اندوگلوکانازی بود جستجو شد و بر اساس اطلاعات به دست آمده اقدام به طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن گردید. توالی قطعه تکثیر شده در بانک ژنی با توالی‌های موجود مقایسه شد. سنجش فعالیت آنزیم نشان داد که بالاترین فعالیت اندوگلوکانازی به ترتیب متعلق به جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* A2 (۱/۹۲ U/min.ml)، *باسیلوس سوبتیلیس* B2 (۱/۶۵ U/min.ml) و *باسیلوس سرئوس*H3 (۱/۵۱ U/min.ml) بود. ارزیابی مولکولی ژن اندوگلوکاناز در *باسیلوس سوبتیلیس* B2 مشابهت ۷۷ درصدی با ژن اندوگلوکاناز (*elgS*) *باسیلوس سوبتیلیس* زیر گونه سوبتیلیس را نشان داد. همچنین بیشترین تولید اندوگلوکاناز جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* B2 در غلظت ۸ گرم در لیتر کربوکسی متیل سلولز، pH برابر با ۷ و فقدان نمک کلرید سدیم بود. توالی ژن اندوگلوکاناز این جدایه توانمند به عنوان یک توالی جدید در این مطالعه تکثیر و خالص شد و می‌تواند به منظور اهداف کلونینگ مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اندوگلوکاناز، *باسیلوس سوبتیلیس*، باکتری‌های خاک، *elgS*

مقدمه

سلولازها کمپلکس‌های آنزیمی با ۳ جزء اندو ۱ و ۴ بتا دی گلوکاناز (اندوسلوبیوهیدرولاز)، اگزو ۱و ۴ بتا دی گلوکاناز (اگزوسلوبیوهیدرولاز) و بتا گلوکوزیداز می‌باشد. تمامی این سه جزء به صورت هم‌افزایی عمل می‌کنند تا پلیمر سلولز را به طور کامل به مونومرهای گلوکز تبدیل کنند. اندو ۱ و ۴ بتا دی گلوکاناز به صورت تصادفی بین فیبرهای سلولزی عمل کرده، انتهاهای احیاء کننده یا غیر احیاء کننده ایجاد می‌کند که توسط اگزوسلوبیوهیدرولاز مورد حمله قرار می‌گیرد و سلوبیوز آزاد می‌شود. سلوبیوز در نهایت توسط بتاگلوکوزیداز به مونومرهای گلوکز هیدرولیز می‌شود (۱۶).

سلولازها دومین آنزیم از آنزیم‌های صنعتی بزرگ مورد استفاده در تجارت هستند که کاربردهای صنعتی مختلفی مانند صنعت نساجی، تولید دترجنت‌ها، تولید غذای حیوانات و انسان، صنعت کاغذ و صنعت سوخت زیستی دارند. پتانسیل تجاری سلولاز در کارایی تبدیل سلولز به مونومرهای آن نهفته است. شهرت سلولازها به علت فعالیت در مسیر تولید اتانول از لیگنوسلولز می‌باشد. اتانول زیستی به عنوان جایگزین برای سوخت فسیلی در نظر گرفته می‌شود. با اینکه روش های مختلفی برای تبدیل توده سلولزی به اتانول وجود دارد، روش آنزیمی به علت سازگاری با محیط زیست و پایداری از معروف‌ترین روش‌ها می‌باشد. بزرگترین مشکل در راه کاربرد صنعتی سلولازها قیمت بالا و راندمان کم تولید آن‌ها می‌باشد. بنابراین هنوز مطالعات و تحقیقات بر روی سلولاز و یافتن سویه هایی با تولید سلولاز بالاتر ادامه دارد. هم‌چنین با ترکیب دانش مهندسی ژنتیک انتظار می‌رود که

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی و استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: naghavi@iaufala.ac.ir)
۳- استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروب‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
DOI: 10.22067/jsw.v34i1.77293

www.SID.ir

Archive of SID

سلولازها در مقدار فراوان تولید شوند و در بسترهای ارزان قیمت در زیست پالایی به کار روند (۵ و ۱۶).

منابع اصلی تولید کننده سلولاز، قارچها و باکتری‌ها می‌باشند. میکروارگانیسم‌های زیادی قادر به تولید سلولاز هستند اما تنها تعداد کمی از آنها مقادیر قابل توجهی از این آنزیم را تولید می‌کنند. در میان باکتری‌های هوازی تجزیه کننده سلولز، بیشترین مطالعه روی *سلولوموناس* و *کلستریدیوم* انجام شده است (۷). این در حالی است که *باسیلوس سوبتیلیس* از مهمترین باکتری‌هایی است که برای تولید سلولاز به کار گرفته شده‌اند. همچنین بیان سلولاز در برخی از گونه های باکتریایی از قبیل گونه‌های *باسیلوس*، *سودوموناس فلئورسنس*، *رالستونیا آتروپا* و *زیموموناس موبیلیس* و همچنین برخی از گونه‌های مخمر از قبیل *ساکارومایسس سرویسیه* و *پیشیا پاستوریس* و برخی از گونه‌های قارچی از قبیل *آسپرژیلوس* و *تریکودرما* گزارش شده است (۹). خاک‌های جنگلی به دلیل غنی بودن از نظر مواد آلی سلولزی محیط مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های هتروتروف مولد سلولاز بوده‌اند. به عنوان مثال در ایران در برخی مطالعات قبلی به غربال‌گری سویه‌های میکروبی در میان جمعیت‌های هتروتروفی جداسازی شده از خاک‌های جنگلی پرداخته شده است و جدایه‌های توانمندی به دست آمده‌اند (۱ و ۱۲) لذا هدف پژوهش حاضر غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده سلولز از خاک‌های جنگلی استان مازندران که بیش‌ترین جمعیت هتروتروفی را دارا بودند و ردیابی و تکثیر ژن اندوگلوکاناز در جدایه‌هایی با بیشترین فعالیت آنزیمی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: به منظور جمع‌آوری باکتری‌های تولید کننده سلولاز از خاک‌های جنگل‌های مناطق مختلف استان مازندران نمونه‌گیری به عمل آمد. پس از کنار زدن سطح رویی خاک، از عمق ۳-۲ سانتی‌متری خاک از ایستگاه‌های مختلف نمونه تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت شمارش باکتری‌های هتروتروف ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید تا سوسپانسیونی با رقت یک دهم به دست آید. از سوسپانسیون حاصل رقت‌های مختلف در سرم فیزیولوژی تهیه شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت به طور جداگانه در سطح محیط آگار غذایی پخش گردید. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس کلنی‌های باکتریایی حاصل شمارش شد و میانگین واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر گرم (Cfu/g) از هر نمونه خاک با احتساب رقت و حجم مایه‌زنی شده محاسبه گردید. سپس از خاک‌هایی که بیش‌ترین جمعیت هتروتروفی را دارا بودند برای جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم سلولاز استفاده شد.

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سلولز: برای جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم سلولاز، نمونه‌ها به محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) براث با ترکیب ۶ گرم کربوکسی میتل سلولز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم آمونیوم سولفات و ۰/۲ گرم کلسیم کلرید در ۱۰۰۰ میلی لیترآب مقطر (۱) انتقال یافت. محیط‌های کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت تکان ۱۶۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس کشت‌های مایع به محیط کشت جامد کربوکسی متیل سلولز حاوی ۱٪ آگار و ۰/۰۱٪ کنگورد (CMC+CR) جهت خالص‌سازی انتقال یافت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون، کلنی‌هایی که در اطراف آنها هاله بی‌رنگ ایجاد شده بود برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (۱۴). جدایه‌های غربال شده از نظر خصوصیات میکروسکوپی، واکنش گرم و آزمون های بیوشیمیایی اولیه مورد ارزیابی قرار گرفتند (۴).

سنجش فعالیت اندوگلوکاناز: باکتری‌های تولید کننده سلولاز که قبلاً انتخاب شده بودند، در محیط کربوکسی متیل سلولز براث کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با تکان ۱۶۰ دور در دقیقه رشد یافتند. سپس محیط‌های کشت با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی آنها جهت سنجش فعالیت آنزیم جمع‌آوری شد. سنجش فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز بر اساس اندازه‌گیری میزان تولید قند احیاء از سوبسترای کربوکسی متیل سلولز صورت گرفت (۱۰). به این ترتیب که ۱ میلی لیتر از مایع رویی با ۱ میلی لیتر محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد و ۱ میلی‌لیتر از محلول بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۴/۵ مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول دی نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS)، با ترکیب ۱۰ گرم سود، ۳/۵ گرم DNS، ۲ میلی‌لیتر فنل و ۰/۵ گرم سولفیت سدیم در یک لیتر آب مقطر، برای توقف فعالیت آنزیم به هریک از لوله‌ها اضافه شد و به منظور ایجاد رنگ مناسب در بن ماری جوش به مدت ۵ دقیقه قرارگرفت. پس از آن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به هر مخلوط اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت با مراجعه به منحنی استاندارد جذب نوری غلظت‌های مختلف گلوکز سنجش شده با روش بالا، میزان قند آزاد شده در هر مخلوط اندازه گیری شد. هر میکرومول گلوکز آزاد شده در واحد دقیقه به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در هر میلی‌لیتر محلول آنزیمی (U/min.ml) در نظر گرفته شد (۸). جدایه با بالاترین فعالیت اندوگلوکانازی برای ردیابی ژن رمزکننده آنزیم انتخاب شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکننده سلولاز: برای شناسایی دقیق گونه باکتری‌های مولد اندوگلوکاناز از تکثیر و توالی یابی ژن رمزکننده 16SrRNA استفاده شد. استخراج DNA با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از کیت شرکت پیشگامان انتقال ژن (ایران) با شماره کاتالوگ DV01100 انجام شد. ژن 16SrDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F (5′-AGAGTTTCCTGGCTCAG-3′) و 1492R (5′-ACGGCTACCTTGTTACGATT-3′) در واکنش زنجیره پلی‌مراز با برنامه حرارتی شامل یک دوره دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۰ دوره با مراحل حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۳ ثانیه، ۵۹/۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. این برنامه بر اساس دمای ذوب آغازگرها بهینه‌سازی گردید. قطعه تکثیر شده در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و باند تشکیل شده پس از استخراج از ژل با استفاده از کیت شرکت کیاژن (آمریکا) با شماره کاتالوگ ۲۸۷۰۴، جهت توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. تعیین توالی به صورت یک طرفه انجام شد. توالی ژن در بانک جهانی داده بیوتکنولوژی (NCBI) با توالی‌های موجود مقایسه شد و گونه باکتری جداسازی شده مشخص گردید.

مطالعات آنزیم‌شناسی: با توجه به این که منبع کربن، pH و نمک از جمله تأثیرگذارترین عوامل بر روی بیان سلولازهای باکتریایی معرفی شده‌اند (۲ و ۱۳)، تأثیر این عوامل بر روی میزان تولید آنزیم در باکتری منتخب مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی اثر منبع کربن، pH و نمک کلرید سدیم بر تولید اندوگلوکاناز توسط جدایه منتخب، از محیط‌های کشت کربوکسی متیل سلولز مایع به ترتیب با غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ گرم در لیتر کربوکسی متیل سلولز به عنوان منبع کربن، مقادیر pH ۴، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵ و ۱۰ و غلظت‌های ۰، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر کلرید سدیم در ارلن‌های جداگانه استفاده گردید. به هر محیط کشت تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری مایه‌زنی شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت تکان ۱۶۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. در پایان آزمایش میزان فعالیت آنزیم در عصاره‌های سلولی پس از سانتریفوژ اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد و برای بررسی اختلاف میانگین‌ها آزمون ناپارامتری کروسکال- والیس مورد استفاده قرار گرفت. در تمام آزمون‌ها سطح خطای ۵ درصد در نظر گرفته شد.

تکثیر ژن اندوگلوکاناز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی: پس از شناسایی گونه باکتریایی که واجد بالاترین فعالیت سلولازی بود، توالی ژن اندوگلوکاناز در سویه‌های مختلف آن در بانک جهانی داده بیوتکنولوژی (NCBI) جستجو شد و توالی ژن‌ها با درصد بالای تشابه به دست آمد. سپس بر اساس اطلاعات به دست آمده، آغازگرها در برنامه Oligo7 همراه با جایگاه برشی *Bam*HI و *Hind*III روی اداپتورهای پلاسمیدی طراحی شدند تا بتوان در تحقیقات بعدی از قطعه تکثیر شده برای همسانه‌سازی نیز استفاده نمود. این آغازگرهای اختصاصی شامل F-endoG (5′-GGATCCGAAACGTTCTATCTCTATC-3′) و R-endoG (5′-AAGCTTGTTCGGTTCGGTAC-3′) در واکنش زنجیره پلی‌مراز با برنامه حرارتی شامل یک دوره دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ دوره با مراحل حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک دوره دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. این برنامه بر اساس دمای ذوب آغازگرها بهینه‌سازی گردید.

نتایج و بحث

شمارش و جداسازی باکتری‌ها: نتایج شمارش باکتری‌های هتروتروف نشان‌دهنده وجود بیشترین تعداد باکتری‌های هتروتروف در ایستگاه B جنگل سیاکلا بود (جدول ۱). پس از آن ایستگاه A جنگل نانواکلا و ایستگاه G جنگل سی‌سنگان به ترتیب بیشترین تعداد باکتری‌های هتروتروف را دارا بودند.

از ۸ ایستگاه جنگلی منتخب که در جدول ۱ مشاهده شد، تعداد ۸ جدایه برتر تولید کننده سلولاز در محیط کشت CMC+CR انتخاب شدند که محل جداسازی، مشخصات و میزان فعالیت اندوگلوکانازی آنها در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان دهنده بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکانازی به ترتیب در جدایه‌های B2، A2 و H3 بود.

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب: تکثیر ژن 16SrRNA منجر به تشکیل باند ۱۵۰۰ جفت بازی پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز گردید (شکل ۱). نتایج توالی یابی محصولات PCR خالص سازی شده از ژل و جستجوی توالی‌ها در بانک جهانی داده بیوتکنولوژی (NCBI) نشان داد جدایه‌های B2 و A2 با ۹۹٪ مشابهت متعلق به گونه *باسیلوس سوبتیلیس* بودند. همچنین جدایه H3 با ۹۹٪ مشابهت متعلق به گونه *باسیلوس سرئوس* بود. قرابت جدایه‌ها در نرم افزار MEGA-6 به صورت درخت فیلوژنی به دست آمد (شکل ۲).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب: تکثیر ژن 16SrRNA منجر به تشکیل باند ۱۵۰۰ جفت بازی پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز گردید (شکل ۱ الف). نتایج توالی یابی محصولات PCR خالص سازی شده از ژل و جستجوی توالی‌ها در بانک جهانی داده بیوتکنولوژی (NCBI) نشان داد جدایه‌های B2 و A2 با ۹۹٪ مشابهت متعلق به گونه *باسیلوس سوبتیلیس* بودند. همچنین جدایه H3 با ۹۹٪ مشابهت متعلق به گونه *باسیلوس سرئوس* بود. قرابت جدایه‌ها در نرم‌افزار MEGA-6 به صورت درخت فیلوژنی به دست آمد (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- شمارش کل باکتری‌های هتروتروف در ایستگاه های جنگلی مورد مطالعه

Table 1- The results of total heterotrophic bacterial count in the studied forest stations with maximum heterotrophic population

نام ایستگاه جنگلی The name of forest station	نانواکلا Nanocla (A)	سیاکلا Siakla (B)	سومعه سرا Someesara (C)	نمک آبرود Namakabroud (D)	نور Noor (E)	ایزدشهر Izadshahr (F)	سی سنگان Sisangan (G)	سه هزار Sehezar (H)
میانگین شمارش The mean count (Cfu/g)	2.53×10^{6}	1.77×10^{8}	1.95×10^{6}	1.41×10^{6}	1.01×10^{8}	1.21×10^{6}	2.34×10^{6}	1.07×10^{6}

جدول ۲- باکتری‌های تولید کننده سلولاز غربال شده در محیط کشت CMC+CR

Table 2- Cellulase producing bacteria screened by congo red screening and their characteristics

نام جدایه Isolate number	شکل و واکنش گرم The shape and Gram reaction	اکسیداز Oxidase	کاتالاز Catalase	حرکت Motility	تولید اسید از گلوکز Acid production from glucose	فعالیت اندوگلوکانازی Endoglucanase activity (U/min.ml)
A2	باسیل گرم مثبت Gram-positive rod	+	+	+	+	1.65
A4	کوکسی گرم مثبت Gram-positive cocci	-	+	-	-	1.16
B1	کوکسی گرم مثبت Gram-positive cocci	-	+	+	-	1.40
B2	باسیل گرم مثبت Gram-positive rod	+	+	+	+	1.92
E1	کوکسی گرم منفی Gram-negative cocci	-	+	+	-	1.12
F1	باسیل گرم منفی Gram-negative rod	-	+	+	+	0.98
H4	باسیل گرم منفی Gram-negative rod	-	+	+	+	1.21
H3	باسیل گرم مثبت Gram-positive rod	+	+	+	+	1.51

در مطالعات دیگر در خاک‌های جنگلی ایران برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده سلولاز، جنس *باسیلوس* از جمله باکتری‌هایی با بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز بوده است. در پژوهشی که توسط پاست و همکاران (۱۲) بر روی ۴۰ باکتری جدا شده از خاک نواحی مازندران انجام شد، تعداد ۲۴ باکتری جدا شده در جنس *باسیلوس* شناسایی شدند که در محیط کربوکسی متیل سلولز قادر به تولید آنزیم سلولاز بودند. همچنین، آساره و همکاران (۱) باکتری‌های ترموفیل و مزوفیل تولید کننده سلولاز را از خاک جنگلی چیتگر واقع در شهر تهران در حضور سلولز میکروکریستالی به عنوان تنها منبع کربن، با استفاده از تکنیک زایموگرام در پلیت جداسازی و خالص‌سازی کردند و جدایه‌های دارای بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز را از طریق توالی یابی ژن 16SrRNA شناسایی نمودند. این جدایه‌ها به جنس‌های *جئوباسیلوس*، *باسیلوس* و *کریسئوباکتر* تعلق داشتند. فعالیت اندوگلوکانازی *باسیلوس سوبتیلیس* جدایه B2 در بررسی حاضر در حدود ۱/۹۲ واحد در یتر در دقیقه بود که نسبت به بیشتر مطالعات قبلی بالا می باشد. ستی و همکاران (۱۵) باکتری‌های مختلف تولید کننده سلولاز از جمله *باسیلوس سوبتیلیس* را از خاک جداسازی کردند و بیشترین فعالیت سلولازی آنها را در حدود ۰/۹ واحد در میلی‌لیتر در دقیقه گزارش کردند. لیانگ و همکاران (۶) باکتری‌های مختلف مولد سلولاز را از خاک جداسازی کردند. برترین جدایه مولد سلولاز متعلق به جنس *بورخولدریا* با بیشترین فعالیت سلولازی ۰/۲ واحد در میلی لیتر در دقیقه بود. پندی و همکاران (۱۱) فعالیت اندوگلوکانازی

www.SID.ir

Archive of SID

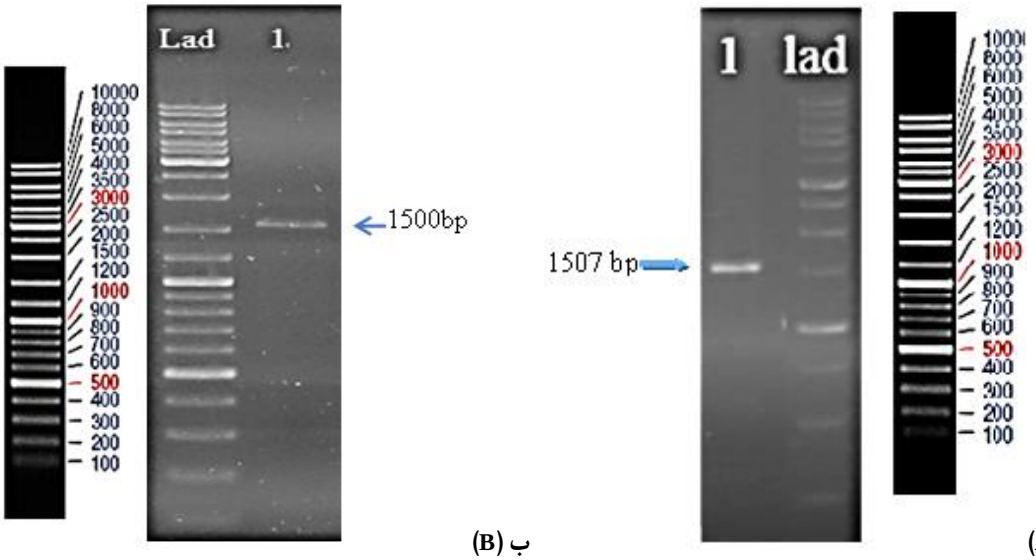
باسیلوس سوبتیلیس جداسازی شده از خاک را برابر با ۲/۸ واحد در میلی‌لیتر در دقیقه گزارش کرده‌اند. مطالعه ما نشان داد جنگل‌های نور از جمله بهترین مکان ها برای جداسازی سویه‌های توانمند باکتریایی مولد سلولاز می‌باشند.

ردیابی ژن کد کننده اندوگلوکاناز در جدایه منتخب: با توجه به این که باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* جدایه B2 بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی را نشان داد، ژن سلولاز در این باکتری ردیابی شد و برای تکثیر آن جفت پرایمرهای F-endoG (GGATCCATGAAACGTTCTATCTCTATC) و R-endoG (AAGCTTCTAGTTCGGTTCGGTAC) طراحی گردید.

تکثیر ژن اندوگلوکاناز در *باسیلوس سوبتیلیس* جدایه B2 منجر به حصول قطعه ۱۵۰۷ جفت بازی گردید که تصویر ژل الکتروفورز آن در آگارز ۱٪ در شکل ۱ ب مشاهده می‌شود. توالی‌یابی ژن اندوگلوکاناز تکثیر شده و مقایسه توالی آن در بانک NCBI، مشابهت ۷۷ درصدی با ژن اندوگلوکاناز (*egls*) *باسیلوس سوبتیلیس* زیر گونه سوبتیلیس (با شماره دسترسی NC_000964.3 در NCBI) نشان داد که توسط بلدا و همکاران (۳) در کل ژنوم *باسیلوس سوبتیلیس* زیر گونه سوبتیلیس ثبت شده است. این توالی در بانک جهانی داده بیوتکنولوژی (NCBI) با شماره دسترسی MK158077 ثبت گردید. پندی و همکاران (۱۱) توالی ۳۵ اندوگلوکاناز باکتریایی را در بانک NCBI مورد بررسی قرار دادند و از بین آنها توالی‌های اندوگلوکاناز ثبت شده در سویه‌های *باسیلوس* را برای طراحی پرایمر انتخاب کردند. توالی به دست آمده در مطالعه حاضر با اندوگلوکاناز دیگری از جمله اندوگلوکاناز ثبت شده توسط پندی و همکاران (۱۱) مشابهت نشان نداد.

تأثیر منبع کربن، pH و نمک بر تولید اندوگلوکاناز در جدایه منتخب: به دلیل این که جدایه B2 بیشترین تولید آنزیم اندوگلوکاناز را در میان باکتری‌های جداسازی شده دارا بود، سعی گردید تولید آنزیم توسط این جدایه با تغییر شرایط رشد ارتقاء یابد. نتایج بهینه‌سازی غلظت‌های منبع کربن و نمک کلرید سدیم جهت تولید اندوگلوکاناز در جدایه منتخب B2 در نمودار شکل‌های ۳، ۴ و ۵ مشاهده می‌شود.

جدایه B2 در غلظت‌های مختلف کربوکسی متیل سلولز به عنوان منبع کربن قادر به رشد بود اما بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی در غلظت ۸ گرم در لیتر با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها مشاهده شد که بیشتر از مقدار مورد استفاده در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز براث (۶ گرم در لیتر) می‌باشد (۱).



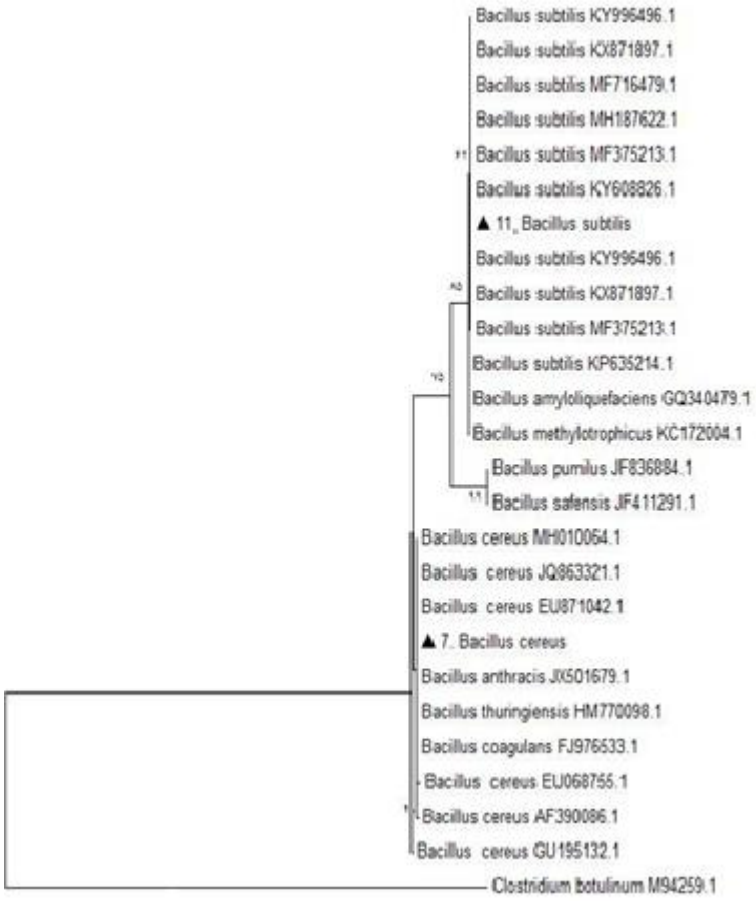
ب (B) الف (A)

شکل ۱- الف: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن 16SrRNA بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک lad: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک (۱): نمونه باند تکثیر شده. ب: نتیجه ژل الکتروفورز جهت بررسی محصول PCR ژن اندوگلوکاناز بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک lad: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک (۱): کنترل منفی، چاهک (۲): باند تکثیر شده با پرایمرهای اختصاصی ژن اندوگلوکاناز

Figure 1- A: Gel electrophoresis of 16SrRNA gene PCR product on agarose 1% gel. Lad well: 100bp marker, well 1: a sample of the amplified band. B: The result of gel electrophoresis for analysis of endoglucanase gene PCR product on agarose 1% gel. Lad well: 100bp marker, well 1: negative control, well 2: the amplified band using specific primers for endoglucanase gene

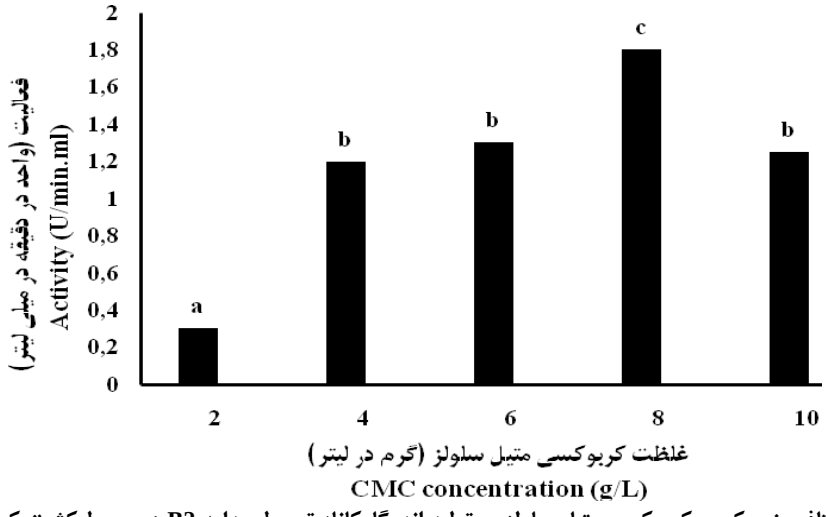
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- درخت فیلوژنی جدایه‌های باکتری مولد سلولاز که شامل گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* می‌باشند

Figure 2- Phylogenic tree of the cellulase producing bacterial isolates including *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف منبع کربن کربوکسی متیل سلولز بر تولید اندوگلوکاناز توسط جدایه B2 در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز براث

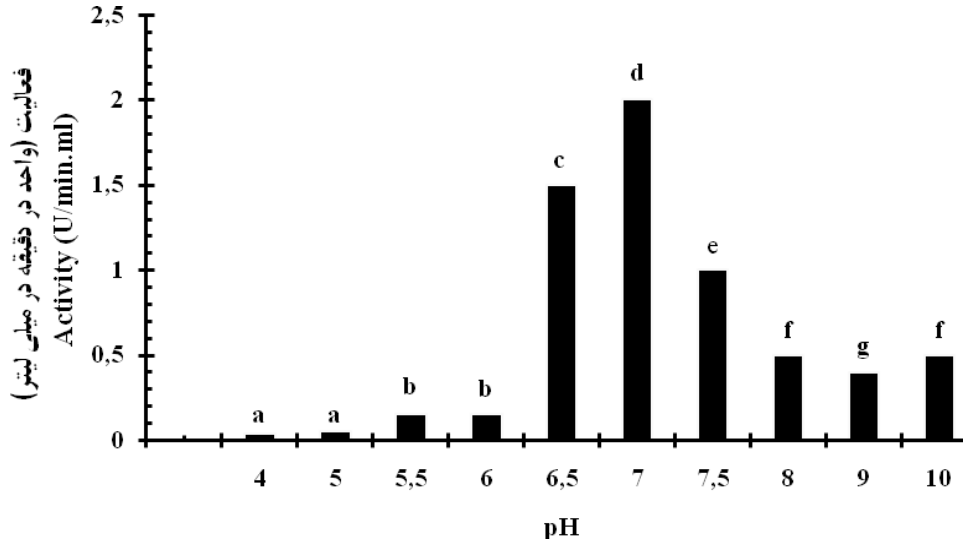
اختلاف میانگین بین گروه‌هایی که حروف آماری مشترک دارند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p<۰/۰۵$).

Figure 3- The effect of different concentrations of carboxymethyl cellulose carbon source on endoglucanase production rate by B2 strain in carboxymethyl cellulose broth medium

No significant differences were seen between the groups showed with the same letters.

www.SID.ir

Archive of SID

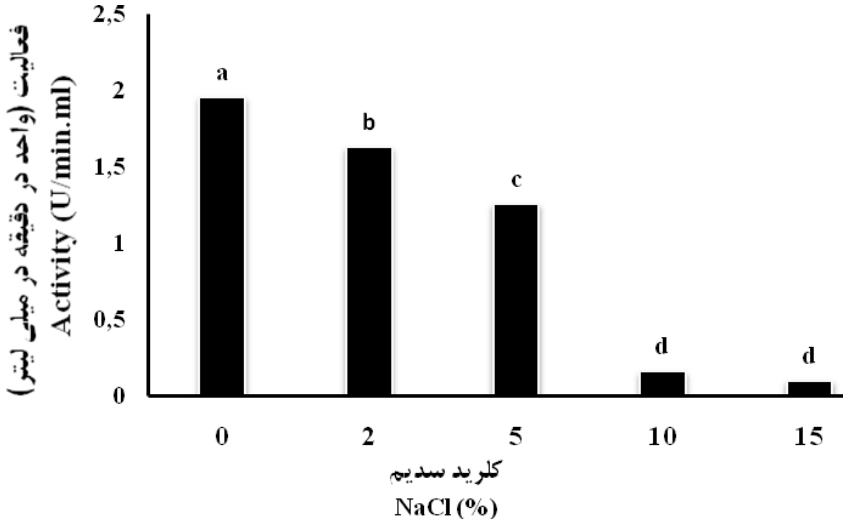


شکل ٤- تأثیر pH محیط کشت بر تولید آنزیم اندوگلوکاناز توسط جدایه B2 در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز براث

اختلاف میانگین بین گروه‌هایی که حروف آماری مشترک دارند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (p<۰/۰۵).

Figure 4- The effect of culture medium pH on endoglucanase production rate by B2 strain in carboxymethyl cellulose broth medium

No significant differences were seen between the groups showed with the same letters.



شکل ٥- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم بر تولید آنزیم اندوگلوکاناز توسط جدایه B2 در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز براث

اختلاف میانگین بین گروه‌هایی که حروف آماری مشترک دارند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (p<۰/۰۵).

Figure 5- The effect of different concentrations of sodium chloride salt on endoglucanase production rate by B2 strain in carboxymethyl cellulose broth medium

No significant differences were seen between the groups showed with the same letters.

بهترین pH برای تولید سلولاز، در در محدوده ۷ با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر مقادیر pH بود و تولید آنزیم در محدوده pH برابر با ۶/۵ تا ۷۵ درصد حفظ می‌شد. این در حالی است که جدایه‌های *باسیلوس* جداسازی شده از خاک جنگلی چیتگر در تهران نیز در pH برابر با ۷/۱ بهترین عملکرد را نشان دادند (۱). *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* جداسازی شده توسط یی و همکاران (۱۸) نیز در pH برابر با ۷ بالاترین تولید اندوگلوکاناز را نشان داده است. هم‌چنین در مطالعه حاضر نمک کلرید سدیم در غلظت‌های بیش از ۲ درصد به طور معنی‌دار موجب کاهش دهنده تولید اندوگلوکاناز توسط *باسیلوس سوبتیلیس* جدایه B2 شد. به‌طوری‌که باکتری جداسازی شده قادر به

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه تولید اندوگلوکاناز در غلظت‌های ۲ و ۵ درصد نمک به‌ترتیب به میزان ۷۵ و ۶۵ درصد از تولید در محیط بدون نمک بود. مطالعات مختلفی بر روی تولید سلولازها در محیط‌های نمکی انجام شده است که در میان آن‌ها مطالعه ونگ و همکاران (۱۷) از جمله تحقیقاتی است که در آن بالاترین تولید و فعالیت سلولاز در گونه‌ای از باکتری *سالینوویبریو* در محیط حاوی کلرید سدیم اندازه‌گیری شده است. به طوری که بیشترین تولید و فعالیت در حضور ۵٪ کلرید سدیم مشاهده شده است و این مقدار با افزایش نمک سدیم کلرید تا غلظت ۲۵٪ به ۲۴٪ تولید اولیه کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

بررسی حاضر با هدف غربال گری سویه‌های توانمند تولید کننده اندوگلوکاناز از خاک‌های جنگلی مازندران، بهینه‌سازی فعالیت آنزیم و ردیابی ژن رمز کننده آن در باکتری‌های تجزیه کننده سلولز جداسازی شده از خاک مناطق جنگلی مازندران انجام شد. جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* A2 دارای فعالیت بالای اندوگلوکانازی (U/min.ml ۱/۹۲) در pH خنثی بود و تولید آنزیم در محدوده pH اسیدی ضعیف تا ۷۵ درصد حفظ می‌شد. هم‌چنین باکتری جداسازی شده قادر به ادامه تولید اندوگلوکاناز در غلظت ۵ درصد نمک به میزان ۶۵ درصد از تولید در محیط بدون نمک بود که اهمیت استفاده از این باکتری جهت حذف باقی‌مانده‌های سلولزی در محیط‌های شور را نشان می دهد. ژن اندوگلوکاناز به دست آمده از این باکتری در بررسی حاضر دارای توالی جدیدی می‌باشد و محصول آن دارای فعالیت مناسبی نسبت به سایر اندوگلوکانازهای باکتریایی است. با افزایش بیان این ژن در همین سویه یا سویه‌های باکتریایی دیگر می‌توان از آن برای تولید بالای اندوگلوکاناز در صنعت انرژی زیستی استفاده کرد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به علت در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

منابع

1- Assareh R., Zahiri H.S., and Eshghi S. 2014. Isolation and identification of native cellulose-degrading bacteria from soil. Journal of Cell and Molecular Research 27(1): 99-110. (In Persian)
2- Azizi M., and Hemmat J. 2016. Isolation of thermotolerant *Isoptericola variabilis* IDAH9 and optimization of its exoglucananse activity. Modares Journal of Biotechnology 7(2): 70-80. (In Persian)
3- Belda E., Sekowska A., Le Fèvre F., Morgat A., Mornico D., Ouzounis C., Vallenet D., Médigue C., and Danchin A. 2013. An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome. Microbiology 159(4): 757-70.
4- Brooks G.F., Butel J.S., and Morse S.A. 2010. Jawets Melnick and Adelbergs medical microbiology, McGraw Hill companies, New York.
5- Ho S.H., Li P.J., Liu C.C., and Chang J.S. 2013. Bioprocess development on microalgae-based CO_2 fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresource Technology 145: 142-149.
6- Liang Y.L., Zhang Z., Wu M., Wu Y., and Feng J.X. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. BioMedical Research International 512497.
7- Lynd L.R., Weimer P.J., and VanZyl W.H. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 506-577.
8- Mandel M., and Weber J. 1969. Exoglucanase activity by microorganisms. Advances in Chemistry 95: 391-414.
9- Menendez E., Garcia-Fraile P., and Rivas R. 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases. AIMS Bioengineering 2(3): 163-182.
10- Naghavi N.S., Saffari S., Zia M.A., and Ghalamkari G.R. 2012. Isolation and identification of the fungus *Caecomyces* from sheep rumen and optimization of its cellulolytic activity. Journal of Veterinary Research 12: 27-34. (In Persian)
11- Pandey S., Kushwah J., Tiwari R., Kumar R., Somvanshi V.S. Nain, L., and Saxena A.K. 2014. Cloning and expression of β-1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. Microbiology Research 169(9-10): 693-698.
12- Past S., Nazemi A., Khataminejad M.R., Mirinargesi M.S., Mousavi S., and Salehi A. 2012. Isolation and molecular identification of cellulase producing *Bacillus* strains from Mazandaran forests soil. Microbial Biotechnology 4(12): 1-6. (In Persian)
13- Rastogi G., Aditya B., Adhikari A., Bischoff K., Hughes S., Christopher L., and Sani R. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresource Technology 101: 8798-8806.
14- Rasul F., Afroz A., Rashid U., Mehmood S., Sughra K., and Zeeshan N. 2015. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. International Journal of Bioscience

www.SID.ir

Archive of SID

6(3): 230-236.
15- Sethi S., Datta A., Gupta B.L., and Gupta S. 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. ISRN Biotechnology, 2013:985685.
16- Singhania R.R., Adsul M., Pandey A., and Patel A.K. 2017. Cellulases In: S. Dubey et al. (ed.) Current developments in biotechnology and bioengineering. Elsevier, London.
17- Wang CY., Hsieh YR., Ng CC., Chan H., Lin HT., Tzeng WS., and Shyu YT. 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. Enzyme and Microbial Technology 44: 373-9.
18- Ye M., Sun L., Yang R., Wang Z., and Qi K. 2017. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. Royal Society Open Science 4(10): 171012.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 1, March-April 2020, p. 73-83

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۹، ص. ۸۳-۷۳

Detection of Endoglucanase Gene in Cellulose Degrading Bacteria Screened from Forest Soils of Mazandaran, Iran

E. Ghadiri[1]**- N.S. Naghavi**[2*]**- K. Ghaedi**[3]

Received: 02-01-2019
Accepted: 27-01-2020

Introduction: Cellulase enzymes are the second largest group of the enzymes with many industrial applications such as in textile industries, production of detergents, animal and human food processing, paper industries and biofuel production. Many microorganisms are capable for production cellulases, but only a small number of them produce significant amounts of this enzyme. The main sources of cellulases production are microorganisms including fungi and bacteria. Among the cellulose degrading aerobic and anaerobic bacteria, most of the studies have been done on C*ellulomonas* spp. and *Clostridium* spp., respectively. Also *Bacillus* spp. has been used for production of cellulase in a homologous manner. Expression of cellulases in some bacterial genera such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* and *Zymomonas*, as well as some yeast species such as *Saccharomyces cerevisiae* and some fungal genera such as *Aspergillus* and *Trichoderma* has been reported too. Low levels of cellulase production has always been a major concern that leads to researches for finding of highly active microorganisms strains and employing biological technologies for identification of their enzyme coding genes suitable for probable transformation other organisms. The purpose of this study was the screening of the cellulose degrading bacteria in Mazandaran forest soils and detection of the enzyme coding gene in the isolate with the highest cellulase activity.

Materials and Methods: In order to isolate cellulase producing bacteria, soil samples were obtained from different regions of Mazandaran province forests including Nanoacla (A), Siaocla (B), Someesara (C), Namakabroud (D), Noor (E), Izadshahr (F), Sisanghan (G) and Sehezar (H) forests. Cellulase producing isolates were selected on carboxymethyl cellulose agar using congo red dye and the amount of their endoglucanase activities was measured by assessment of released glucose using dinitrosalicylic acid reagent. Each micromole of released glucose in 1 ml of enzyme solution per minute was considered as an enzyme activity unit (U/min.ml). Identification of bacterial species was performed by amplification and sequencing of a 1500 bp length fragment in 16S rDNA by using 1492R and 27F universal primers. Enzyme production by the selected isolates was also detected in different growth conditions. In order to investigate the effect of carbon source concentration, the amounts of 2-10 g/L of carboxymethyl cellulose were added to bacterial growth culture media. The effect of growth pH values in the range of 4 to 10 and sodium chloride at concentrations of 0 to 10 g/L were studied on endoglucanase production by the selected isolates in carboxymethyl cellulose media. Then the endoglucanase coding sequences in different strains of the bacterial sp. with the highest endoglucanase activity were investigated in Gen Bank and the primers were designed based on the obtained data for the gene amplification.

Results and Discussion: The results of heterotrophic bacteria counting showed the highest number at station B (Siakla forest). Subsequently, station A (Nanocla forest) and station G (Sisangan forest) had the highest number of heterotrophic bacteria, respectively. From the eight selected forest stations, eight top cellulase producing isolates were selected in carboxy methyl cellulose broth medium. The highest endoglucanase activities were belonged to the isolates A2 (1.92 U/min.ml), B2 (1.65 U/min.ml), and H3 (1.51 U/min.ml), respectively. The amplification of the 16SrRNA gene resulted in the formation of a 1500 bp band after electrophoresis in agarose gel electrophoresis. Sequencing results of the purified PCR products showed that B2 and A2 isolates belonged to *Bacillus subtilis* with 99% similarity. H3 isolate also belonged to *Bacillus cereus* with 99% similarity. In other studies in the forest soils of Iran for isolation of cellulase producing bacteria, *Bacillus* had been one of the most active cellulase enzyme producers. The present study showed that Noor forests are among the best places to isolate bacterial cellulase-producing strains. PCR amplification protocol was

1 and 2- M.Sc. in Microbiology and Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: naghavi@iaufala.ac.ir)
3- Professor, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
DOI: 10.22067/jsw.v34i1.77293

www.SID.ir

Archive of SID

designed and the total sequence of endoglucanase with 1072 bp length was amplified. Molecular evaluation of endoglucanase gene in *Bacillus subtilis* (B2) showed 77% similarity to the endoglucanase gene (*elgS*) in *Bacillus subtilis* subsp. subtilis. Since the strain B2 had the highest production of endoglucanase among the isolated bacteria, it was attempted to enhance the production of the enzyme using this strain by changing the growth conditions. The isolate B2 was able to grow at different concentrations of carboxymethyl cellulose as a carbon source, but the highest endoglucanase activity was observed at the concentration of 8 g/L with a significant difference compared to other concentrations. The pH equal to 7 and the absence of sodium chloride salt was also led to significant highest endoglucanase production by this isolate.

Conclusion: The *endoglucanase* gene obtained in this study was reported for the first time with a new sequence. The enzyme showed more sustainable activity than other aerobic bacterial endoglucanases which had previously been studied. This sequence can be introduced into high expressional bacterial strains and used to produce high amounts of endoglucanase for bio-energy industries applications.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Endoglucanase* gene, Soil bacteria

www.SID.ir