مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره سوم (پیاپی ۳۲) پاییز ۱۳۹۶
صفحات ۲۴۲-۲۳۱

Original Article

شناسایی مولکولی و بهینه سازی شرایط تولید کراتیناز باکتری های تجزیه کننده کراتین جدا شده از خاک مزارع پرورش مرغ مرودشت

سمیه خدایاری[۱]، فرشید کفیل زاده*[۲]

[۱] کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، [۲] استاد، گروه میکروب شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پَر یکی از عوامل آلوده کننده محیط زیست است که حدود ۹۰ درصد وزن آن را صفحات بسیار محکم کراتین تشکیل می دهد. تعدادی از باکتری ها، در حضور سوبسترای کراتین دار، توانایی تولید آنزیم کراتیناز را دارند. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های تجزیه کننده کراتین از خاک مزارع اطراف مرغداری‌های شهرستان مرودشت به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیمی در سویه های برتر تجزیه کننده کراتین انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۵ نمونه خاک از مزارع اطراف مرغداری‌های شهرستان مرودشت جمع آوری گردید. ۷ جدایه باکتریایی بر روی محیط اختصاصی پَر رشد داده شدند. ۵ جدایه که تجزیه واضحی را نشان دادند انتخاب و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و روش مولکولی شناسایی شدند. باکتری‌های مورد نظر تعیین توالی شدند و شماره خاصی در بانک ژنی به هر کدام از آنها با عنوان سویه‌ای جدید اختصاص داده شد. سپس هر ۵ باکتری از نظر میزان تولید آنزیم کراتیناز نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تمامی جدایه ها متعلق به گونه های مختلف *باسیلوس* بودند. هر ۵ جدایه قادر به تجزیه کامل پَر یا کراتین بودند. بیشترین فعالیت آنزیمی، ۱۷/۱۲ (واحد بر میلی لیتر بر دقیقه) متعلق به باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 گزارش شد.

نتیجه‌گیری: گونه‌های مختلف *باسیلوس* در این پژوهش توانایی تولید آنزیم کراتیناز در حضور سوبسترای کراتینی را نشان دادند. ارزیابی میزان تولید آنزیم کراتیناز، جدایه های باکتریایی نشان داد که همگی توانایی بالقوه در تیمار زباله‌های پَر را دارند.

واژگان کلیدی: آنزیم کراتیناز، باکتری تجزیه کننده کراتین، *باسیلوس سرئوس*.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۵

مقدمه

کراتین یک ماکرو مولکول غیر قابل حل با پایداری فراوان و سرعت تجزیه پایین است و در مو، پَر، ناخن، پشم، منقار و شاخ وجود دارد (۱ و ۲). کراتین‌ها به دو گروه α-کراتین و β-کراتین تقسیم‌بندی می‌شوند (۳). فیبریل‌های کراتین در هر دو شکل به صورت موازی دور هم پیچیده شده‌اند تا ساختار دایمر میکرو و ماکرو فیبریل را تشکیل دهند که سبب پایداری مکانیکی و ساختمانی آن می‌گردد (٤ و ٥). پَر، پروتئین خالصی از کراتین است که بسیار نامحلول و سخت تجزیه است (٦). در جهان سالانه میلیاردها عدد مرغ مصرف می‌شود و حدود ۸/۵ میلیارد تن، پَر مرغ تولید می‌گردد (۷). حدود ۵ تا ۷ درصد وزن مرغ را پَر و حدود ۹۰ درصد از پَر را کراتین تشکیل می‌دهد (۸ و ۹). پَرها برای پُر کردن زمین، سوزاندن یا دفن کردن استفاده می‌شوند که این خود مشکلاتی را در ذخیره سازی، حمل و نقل، تولید گازهای گلخانه‌ای و دفع خاکستر به وجود می‌آورد (٦ و ١٠).

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۷۱۱٤۰۷۹۹ پست الکترونیک: f.kafilzadeh@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین پَر به عنوان محصول جانبی، باعث بیماری های مختلفی در انسان از جمله کلروزیس و مایکوپلاسموزیس می‌گردد (۱۰). محتوای بالای پروتئین در زباله‌های حاوی کراتین می‌تواند به یک منبع خوب پروتئینی و آمینو اسیدی با استفاه از سیستم چرخه بازیافت شود (۲).

بازیافت پَر می‌تواند ماده غذایی پروتئینی متناوب و ارزانی را فراهم آورد که این ماده غذایی می‌تواند به عنوان خوراک دام و بسیاری فرایندهای دیگر استفاده شود. اگر چه هضم ضعیف کراتین یک مشکل بزرگ در چرخه بازیافت پَر است، از گذشته تا کنون استفاده از دمای بالا و فشار زیاد توسط تیمار حرارتی و شیمیایی، کراتین را به راحتی قابل متابولیزه می‌کند و این هم زمان است با از دست دادن چند اسید آمینه ضروری از قبیل متیونین، لیزین و تریپتوفان که ارزش غذایی کراتین را پایین می‌آورد. بنابراین تیمار حرارتی و شیمیایی به اندازه کافی محتوای تغذیه‌ای پودر پَر را نگه نمی‌دارد (۱۱ و ۱۲). از این رو میکروارگانیسم‌هایی که فعالیت کراتینولایتیکی و همچنین آنزیم کراتیناز را دارا هستند، می توانند اهمیت داشته باشند (۲).

تجزیه میکروبی پَر به نظر بیشتر دانشمندان و محققین یک جایگزین مناسب برای به دست آوردن پودر پَر است که از نظر حفظ مواد مغذی و اسید آمینه‌های ضروری، مورد توجه است. کراتینازها دسته‌ای خاص از پروتئازها هستند که قادر به شکستن پلی پپتید بسیار سخت و محکم کراتین می‌باشند (٤).

تعدادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید کراتیناز در حضور سوبسترای کراتین را دارند که با تولید این آنزیم، کراتین موجود در پَر، مو، ناخن و پشم را تجزیه می کنند (۸). این آنزیم به وسیله تعدادی از قارچ ها و باکتری ها تولید می‌شود که پژوهش های متعدد، سویه‌های متفاوتی از باکتری *باسیلوس (Bacillus)* را جداسازی نموده است (۹).

از آنجائی که کراتیناز تولیدی توسط قارچ ها با طبیعت بیماری زایی در بین همگان شناخته شده است، استفاده از کراتیناز با منبع باکتریایی اهمیت پیدا می کند (۱۳). از کراتین هیدرولیز شده توسط باکتری ها در صنعت خوراک دام و طیور، کود نیتروژنی، چسب، فیلم و همچنین به عنوان منبعی غنی از اسیدآمینه های سرین، سیستئین و پرولین استفاده می گردد (١٤ و ١٥). به علاوه از آنزیم کراتیناز در صنایعی از قبیل صنعت مواد شوینده، پزشکی، آرایشی و صنعت چرم استفاده می گردد (١٦ و ١٧). آگراهاری (Agrahari) و وادوا (Wadhwa) در سال ۲۰۱۰، سه سویه از باکتری تجزیه کننده کراتین، *باسیلوس مگاتریوم* (*Bacillus megaterium*) سویه SN2، *باسیلوس تورینجینسیس* (*Bacillus thuringiensis*) سویه SN1 و *باسیلوس پومیلیس* (*Bacillus pumilus*) سویه SN3 را از خاک منطقه قاضی پور کشور هند جدا کردند. هر سه جدایه توانست پَر مرغ و پَر پنگوئن را در مدت زمان مشخصی به طور کامل تجزیه کند (٦). در سال ۲۰۰٤، زردانی (Zerdani) و همکاران در مراکش، تعداد ۸ سویه از *باسیلوس* را از خاک جدا کردند. که پَرهای موجود در محیط کشت توسط همه سویه‌ها کاملاً تجزیه گردید (۵).

هدف از این مطالعه جداسازی باکتری های تجزیه کننده کراتین موجود در خاک مناطق مختلف شهرستان مرودشت و اندازه گیری فعالیت کراتینازی جدایه ها بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه های خاک: در این مطالعه مقطعی توصیفی، نمونه های خاک از مناطق مختلف مزارع پرورش مرغ در شهرستان مرودشت، استان فارس، از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری زمین در ظروف استریل جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها در یک روز گردآوری شدند.

ب) جداسازی و غربالگری باکتری های تولید کننده کراتیناز: برای هر نمونه خاک، ۳ مرحله غنی سازی ۲۰ تا ۲۵ روزه انجام شد. برای غنی سازی مرحله اول، ۵ گرم از هر نمونه خاک به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط پایه نمکی مایع در ارلن های ۱۵۰ میلی لیتری حاوی (گرم بر لیتر): کلرید سدیم ۵، دی پتاسیم فسفات ۱، منو پتاسیم فسفات ۱، سولفات منیزیم ۰/۲، سولفات آمونیوم ۱ و پَر سفید مرغ ۱۰، به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، تلقیح گردید و به مدت ۷ روز در دمای اتاق بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پَرهای سفید مرغ با شوینده خانگی

Archive of SID

www.SID.ir

کاملاً شسته شدند. سپس در آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا مواد زاید پَر در اثر گرما جدا شود (۸). برای از بین بردن چربی‌های رویی پَر، آن‌ها در مخلوط مساوی از کلروفرم: آب (۱:۱) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند (۱۹). سپس پَرها چندین بار با آب مقطر شستشو شدند و در دستگاه آون با دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند تا پَرها کاملاً خشک گردند. برای غنی سازی مرحله دوم، ۱۰ میلی لیتر از محلول رویی غنی سازی مرحله اول برداشته شد و در شرایط استریل به ۹۰ میلی لیتر محیط پایه نمکی مایع تازه همراه با ۱ درصد پَر منتقل گردید. تمامی محیط کشت ها در دمای اتاق بر روی شیکر ۱۵۰ دور بر دقیقه نگهداری شدند. پس از ۷ روز از هر کدام از ارلن‌های حاوی نمونه‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. این کار تا به دست آمدن کلنی های خالص چندین بار تکرار گردید. غنی سازی مرحله سوم بر روی محیط کشت اختصاصی انجام گرفت و تنها باکتری‌های تجزیه کننده کراتین جداسازی و شناسایی گردیدند. این غنی سازی بر روی محیط پایه پَر جامد (Agar Based Mineral Salt Medium) به همراه پَر خیلی ریز شده (۱ تا ۳ میلی متری) به عنوان منبع کربن و نیتروژن انجام شد. این محیط حاوی تمامی ترکیبات محیط پایه نمکی مایع به اضافه ۱۵ گرم آگار است. از کلنی‌های خالص شده محیط نوترینت آگار، بر روی محیط اختصاصی جامد کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱ تا ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند. از این میان، ۵ جدایه که بر روی محیط اختصاصی پَر در مدت زمان کمتری قادر به تجزیه پَر بودند و هاله تجزیه بزرگ تری داشتند، برای شناسایی انتخاب شدند (۸).

ج) آزمون های بیوشیمیایی: شناسایی باکتری‌ها به وسیله آزمون های بیوشیمیایی مانند رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسپور، تست حرکت، کاتالاز، اکسیداز، سیترات و هیدرولیز نشاسته انجام شد (۲۱ و ۲۲).

د) استخراج ژنوم: به منظور استخراج DNA باکتریایی از روش جوشاندن استفاده شد. به طور خلاصه مقدار ۱ سی سی از محیط کشت Brain Heart Infusion (مرک، آلمان) حاوی باکتری خالص با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه، سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر الکل استریل اضافه گردید. محلول تکان داده شد و مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی به عنوان DNA الگو استفاده شد (۹).

ه) واکنش زنجیره پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* باکتریایی از پرایمر های F: 5'- AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3' و R: 5'-GGT TAC CTT GTTACG ACTT-3' استفاده گردید (۲۱). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ٤ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/٦ میکرولیتر از هر پرایمر، ۸/۲ میکرولیتر Master mix (Taq DNA Polymerase Master Mix Red, Denmark)، ۳٦/٦ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Techne (انگلستان) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۰). محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور (انگلستان) مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی صورت گرفت. توالی های ژن *16S rRNA* توسط ابزار http://ncbi.nlm.nih.gov/blast آنالیز شدند. به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی و نیز ارزیابی بیشترین رابطه خویشاوندی (Maximum likelyhood) از نسخه پنجم نرم افزار MEGA، استفاده گردید. توالی ها در بانک ژنی (GenBank) با شماره خاص (Accession number) ثبت شدند.

و) اندازه گیری فعالیت آنزیم کراتیناز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم، به محلول کراتین–DMSO

Archive of SID

www.SID.ir

(DMSO-Solublized Keratin) و آنزیم خالص (Seed culture) نیاز است.

۱- آماده سازی محلول کراتین-DMSO: پَرهای شسته و چربی زدایی شده به وسیله قیچی به صورت پودر درآورده شدند. مقدار ۱۰ گرم از این پودر با ۵۰۰ میلی لیتر از محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) مخلوط گردید و در آون با دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۱۰۰۰ میلی لیتر استن سرد به محلول یاد شده اضافه گردید و در دمای ٢٤- درجه سلیسیوس به مدت ۵ ساعت قرار داده شد. این محلول در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاوی پَر جدا گردید. سپس با آب مقطر سه بار شستشو داده شد و در آون با دمای ٤٠ درجه سلیسیوس به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا رسوب پَر کاملاً خشک گردد. مقدار ۱ گرم از این رسوب در ۲۰ میلی لیتر NaOH 0.05N حل گردید. سپس pH محلول با استفاده از Tris-HCl ۰/۱ مول بر لیتر بر روی عدد ۸ تنظیم شد. محلول حاصل به عنوان محلول کراتین-DMSO مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

۲- آماده سازی آنزیم خالص: تعدادی از باکتری‌های تجزیه کننده پَر که هاله تجزیه مناسبی را بر روی محیط اختصاصی پَر جامد نشان دادند و برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کراتیناز انتخاب شده بودند، بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. پس از ٢٤ ساعت از هر کدام از نمونه‌ها به طور جداگانه چندین کلنی برداشته شد و به محیط MSM مایع همراه با ۱ درصد پَر به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن تلقیح گردید. نمونه‌ها در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت نگهداری شدند. یک میلی لیتر از روماند این محیط کشت‌ها به عنوان آنزیم خالص مورد استفاده قرار گرفت (۸).

۳- اندازه گیری کراتیناز: ۱ میلی لیتر از آنزیم خالص با ۱ میلی لیتر از محلول کراتین مخلوط گردید و در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. این واکنش پس از مدت زمان یاد شده با اضافه کردن حجم مساوی یعنی ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد متوقف گردید. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری روماند در طول موج ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cary50, Australia) در مقابل کنترل اندازه گیری شد و به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید:

$$U= 4\times n\times A280/(0.01\times 10)$$

۰/۰۱: عدد جذبی است که کنترل نشان می‌دهد، n: عدد رقیق سازی، ٤: حجم نهایی بر حسب میلی لیتر، ۱۰: مدت زمان انکوبه کردن در بن ماری بر حسب دقیقه می باشد. براساس تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقدار آنزیمی‌که سبب افزایش جذب نوری ۰/۰۱ بین کنترل و نمونه در شرایط یکسان می‌گردد. واحد فعالیت آنزیم کراتینازی Units/ml/min گزارش می‌شود. از محیط کشت با باکتری بدون سوبسترا (پَر) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۸).

ز) بررسی شرایط مختلف بر فعالیت آنزیم کراتیناز برای سویه برتر و بهینه سازی شرایط رشد:

۱- بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز در دماهای مختلف: به منظور بررسی فعالیت آنزیمی برای به دست آوردن دمای بهینه، سنجش فعالیت آنزیم در دماهای ٤٥-۲۵ درجه سلیسیوس در ۵ روز متوالی برای سویه برتر انجام شد (۸).

۲- بررسی فعالیت آنزیم در pH های مختلف: برای به دست آوردن pH بهینه فعالیت آنزیمی، pH محیط کشت‌ها بین ٦ تا ۱۰ تنظیم شد. سپس فعالیت آنزیمی در ۵ روز متوالی اندازه گیری گردید (۸). تمامی آزمون های یاد شده، به صورت جداگانه ۳ مرتبه در شرایط یکسان تکرار گردید.

ح) تجزیه و تحلیل اطلاعات: متغیرها با استفاده از نسخه هجدهم نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA در سطح ۰/۰۱ ($p<0.01$) آنالیز شدند.

یافته ها

از مجموع نمونه‌های خاک مورد بررسی ۳۰ باکتری مختلف بر روی محیط نوترینت آگار جداسازی گردید که گونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

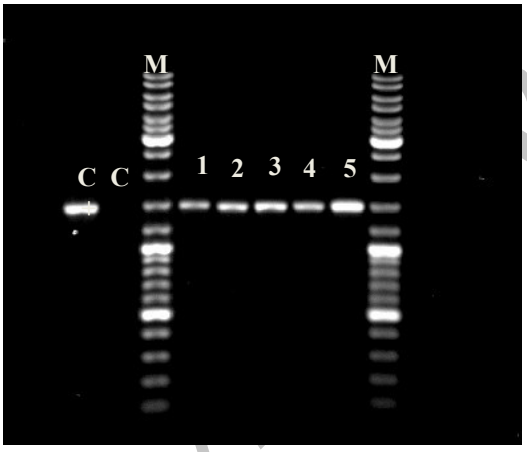
جدول ۱: خصوصیات ریخت شناسی و میکروسکوپی ۵ باکتری انتخابی.

مشخصات	SKH1	SKH2	SKH3	SKH4	SKH5
واکنش گرم	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
فرم اسپور	میانی	انتهایی	میانی	نزدیک به انتهایی	انتهایی
مورفولوژی-میکروسکوپی	میله ای (تکی یا به صورت زنجیره)	میله‌ای	میله‌ای کوتاه	میله‌ای	میله‌ای
نیاز به اکسیژن	اختیاری-هوازی	هوازی	اختیاری-هوای	هوازی	هوازی
رنگ کلنی	کرمی متمایل به زرد	سفید	کرمی	سفید متمایل به کرمی	کرمی
شکل کلنی	محدب-صاف-کوچک	صاف-خشک-بزرگ	محدب-صاف-بزرگ	صاف-خشک-بزرگ	صاف-خشک-بزرگ

جدول ۲: برخی از خصوصیات بیوشیمیایی ۵ باکتری انتخابی.

آزمون ها	SKH1	SKH2	SKH3	SKH4	SKH5
کاتالاز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
اکسیداز	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
سیترات	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی
هیدرولیز نشاسته	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
تست V-P	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی
تست متیل رد	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
احیای نیترات	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
تخمیر قندها	A/-	-/-	A/-	-/-	-/-
باکتری تشخیصی	*باسیلوس سرئوس*	*باسیلوس فلکسوس*	*باسیلوس تورنجینسیس*	*باسیلوس فلکسوس*	*باسیلوس فلکسوس*

-/- : بدون اسید/ بدون گاز؛ A/- اسید/ بدون تولید گاز.



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* باکتریایی. +C) کنترل مثبت (*Bacillus subtilis* subsp. PTCC1023)، -C) کنترل منفی (آب مقطر)، M) مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۱) *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1، ستون های ۲، ٤ و ٥) *باسیلوس فلکسوس* سویه های SKH2, 4, 5، ستون ۳) *باسیلوس تورینجنسیس* سویه SKH3.

جدول ۳: جدایه های باکتریایی ثبت شده در بانک ژنی.

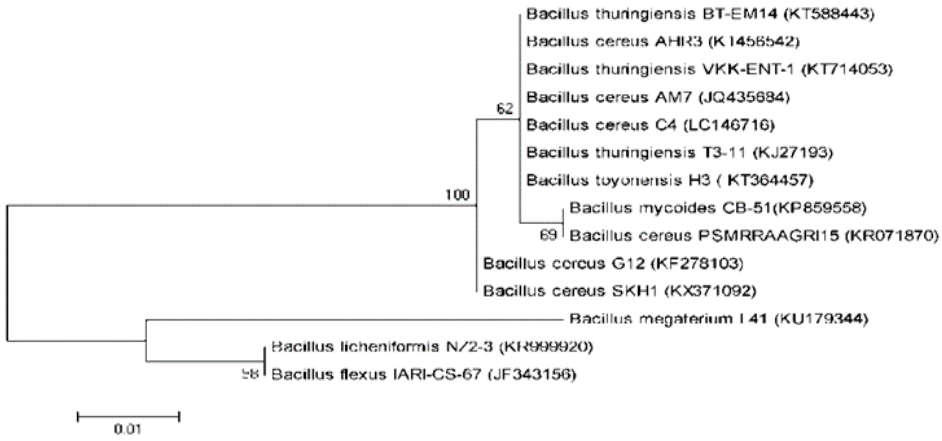
نام باکتری	سویه	شماره خاص
باسیلوس سرئوس	SKH1	KX371092
باسیلوس فلکسوس	SKH2	KX343199
باسیلوس تورینجنسیس	SKH3	KX371093
باسیلوس فلکسوس	SKH4	KX371094
باسیلوس فلکسوس	SKH5	KX371095

مختلف باکتریایی را شامل می‌شدند. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده کراتین، ۳۰ جدایه باکتری به محیط پایه پَر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شدند. ۱۵ جدایه از پَر موجود در محیط کشت به عنوان تنها منبع کربن استفاده کردند و پَر را تجزیه نمودند. ۵ جدایه که تجزیه مناسبی را نشان دادند برای شناسایی انتخاب گردیدند. شناسایی ۵ جدایه باکتریایی از طریق مطالعه میکروسکوپی و آزمون های بیوشیمیایی انجام شد. نتایج در جدول های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس رنگ آمیزی گرم و چندین آزمون بیوشیمیایی، مشخص گردید که یک جدایه، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، یک جدایه *باسیلوس تورنجینسیس* (*Bacillus thuringienesis*) و سه جدایه *باسیلوس فلکسوس* (*Bacillus flexus*) هستند.

در این مطالعه الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*، باندهای مشخصی را در محدوده ۱۵۰۰ جفت بازی ایجاد کردند (شکل ۱). نتایج حاصل از توالی یابی در بانک ژنی، تحت عنوان سویه‌ای جدید با شماره خاص به ثبت رسید (جدول ۳). توالی *16S rRNA* و درخت فیلوژنتیکی

Archive of SID

www.SID.ir



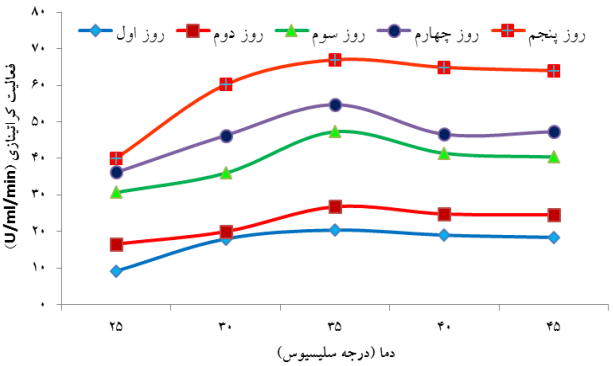
شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 با سایر *باسیلوس* ها.

(شکل ۲)، نشان داد که *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 بیشترین قرابت را با باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه G12 دارا می باشد. فعالیت کراتینازی ۵ سویه باکتریایی بر اساس روش یاد شده، در مقایسه با نمونه کنترل مثبت (*باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) PTCC1023) بر حسب واحد بر میلی لیتر بر دقیقه (U/ml/min) به دست آمد. مقادیر، حاصل تنها یک بار اندازه گیری شدند. بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 و کمترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به باکتری *باسیلوس فلکسوس* سویه SKH4 بود (جدول ٤). از آن جایی که باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 بیشترین تجزیه در مدت زمان کمتری با بهترین فعالیت آنزیمی را نشان داد، برای بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز در شرایط مختلف انتخاب گردید. آنالیز توسط آزمون ANOVA در ۳ دوره اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با شرایط متغیر دما و pH اولیه و سنجش در شرایط یکسان در مدت ۵ روز نتایج زیر را نشان داد:

الف) مقایسه اثر دما بر تولید آنزیم کراتیناز: مقایسه اثر دماهای مختلف در روزهای مختلف بر تولید آنزیم کراتیناز توسط باکتری باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 نشان می‌دهد که تولید آنزیم به جز در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس در روزهای اول و دوم که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند، تمامی دماها (۲۵، ۳۰، ۳۵، ٤٠ و ٤٥) در تمامی روزهای سنجش فعالیت آنزیم، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ آزمون LSD نشان دادند (نمودار ۱) ($P < 0.01$). نتیجه کلی حاصل از بررسی فعالیت این آنزیم در روزهای مختلف در محدوده دمایی ۲۵ تا ٤٠ درجه سلیسیوس توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 نشان می‌دهد که این باکتری در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ٤٠ و ٤٥ درجه سلیسیوس قادر به رشد و تولید آنزیم می‌باشد. دمای بهینه برای حداکثر تولید آنزیم دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به دست آمد. باکتری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس کمترین تولید آنزیم و در دماهای ٤٠ و ٤٥ درجه سلیسیوس به ترتیب پس از دمای بهینه، فعالیت آنزیمی متوسطی را نشان داد

جدول ٤: میزان فعالیت آنزیمی مربوط به سویه های مختلف باکتریایی.

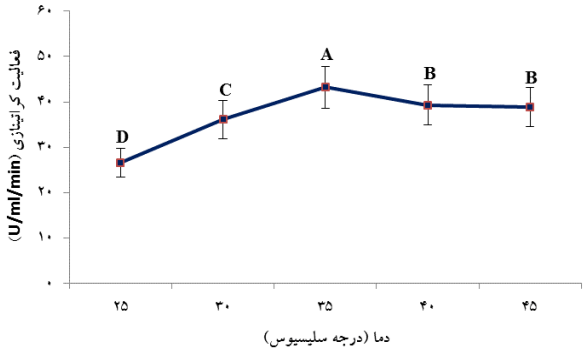
نام باکتری	فعالیت آنزیمی (U/ml/m)
باسیلوس سرئوس سویه **SKH1**	۱۷/۱۲
باسیلوس فلکسوس سویه **SKH2**	۱۳/۲٦
باسیلوس تورینجنسیس سویه **SKH3**	۱۵/۵٦
باسیلوس فلکسوس سویه **SKH4**	۱۰/۸۱
باسیلوس فلکسوس سویه **SKH5**	۱۱/۹۵



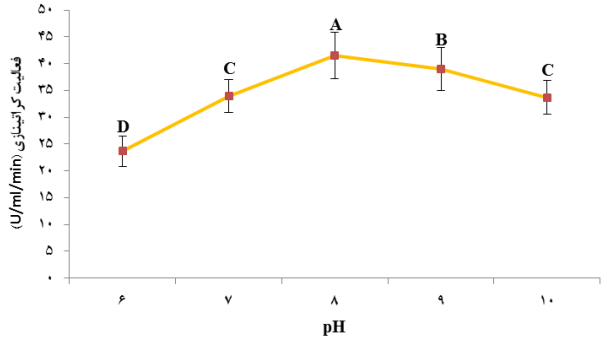
نمودار ۱: تغییرات تولید آنزیم کراتیناز در دماهای مختلف

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲: مقایسه اثر دماهای مختلف بر تولید آنزیم کراتیناز. حروف مشترک، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ آزمون LSD است.



نمودار ۳: مقایسه اثر گستره pH های بر تولید آنزیم کراتیناز. حروف مشترک، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ آزمون LSD است.

(نمودار ۲).

ب) مقایسه اثر pH اولیه بر تولید آنزیم کراتیناز: مقایسه اثر محدوده‌های مختلف pH در ۵ روز بر تولید آنزیم کراتیناز توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 نشان داد که تولید آنزیم فقط در محدوده pH خنثی ٦ در روزهای دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. اما تمامی محدوده‌های pH در روزهای اول تا پنجم با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ آزمون LSD نشان دادند (جدول ۵).

نتیجه حاصل از بررسی‌های فعالیت کراتیناز در این باکتری نشان داد که این باکتری در محدوده pH های ٦، ۷، ۸ ، ۹ و ۱۰ توانایی رشد و همچنین تولید آنزیم کراتیناز را دارد. pH بهینه برای بیشترین تولید آنزیم، در pH قلیایی ۸ به دست آمد. این باکتری در pH خنثی ٦ کمترین میزان تولید آنزیم و در pH قلیایی ۹ فعالیت آنزیمی متوسطی را نشان داد (نمودار ۳).

جدول ۵: اثر گستره pH در طول زمان بر تولید آنزیم کراتیناز توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1.

pH	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	میانگین pH
۶	۸/۹^{l}	۱۹/۰^{k}	۲۰/٦^{k}	۳۰/۲^{i}	۳۹/۷^{g}	۲۳/۷^{D}
۷	۱۸/۵^{k}	۲٤/٤^{j}	۳۳/٤^{h}	٤٤/٦^{e}	٤۹/۱^{cd}	۳٤/۰^{C}
۸	۱۸/۲^{k}	۲۹/۱^{i}	٤٤/٦^{e}	٤۹/۰^{cd}	٦٥/٦^{a}	٤۱/٥^{A}
۹	۱۸/۸^{k}	۲٦/۲^{j}	٤۱/۹^{fg}	٤۸/۰^{d}	٦۰/۲^{b}	۳۹/۰^{B}
۱۰	۱۸/٥^{k}	۲٤/۳^{j}	۳۳/۱^{h}	٤۲/۲^{f}	٥۰/٤^{c}	۳۳/۷^{C}
میانگین زمان	۱٦/۸^{E}	۲٤/٦^{D}	۳٤/۷^{C}	٤۲/۸^{B}	٥۳/۰^{A}	

*میانگین های دارای حروف بزرگ (موجود در ستون سمت چپ و ردیف پایین) و نیز میانگین های دارای حروف کوچک (موجود در قسمت میانی جدول) که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ آزمون LSD ندارند.

بحث

گونه های *باسیلوس* یکی از بهترین تولید کنندگان کراتیناز هستند که ظرفیت بالای تولید این آنزیم را در میان سایر منابع تولید کراتیناز (حدود ۲۰ تا ۲۵ گرم بر لیتر) دارا هستند (۹).

تعدادی از محققین در سال های متمادی مانند، فمی اولا (Femi-Ola) و همکاران در سال ۲۰۱۵، دیفاسیگامانی (Deivasigamani) و همکاران در سال ۲۰۰۸، مهتا (Mehta) و همکاران در سال ۲۰۱۳، در مطالعات خود توانستند گونه های مختلف *باسیلوس* را از نمونه های خاک و یا پسماند های مرغ و مرغداری ها جداسازی کنند. این جدایه ها توانایی تولید آنزیم کراتیناز را داشتند (۱۸، ۲۱ و ۲۲). در پژوهش حاضر، از خاک شهرستان مرودشت، شیراز، تعداد ۱۵ باکتری با توانایی تولید آنزیم کراتیناز، جداسازی گردید. ۵ جدایه که قدرت کراتینازی بیشتری داشتند برای مطالعه بیشتر انتخاب شدند. پس از شناسایی از طریق خصوصیات مورفولوژی، آزمون های بیوشیمیایی و آنالیز توالی یابی قطعه *16S rRNA*، سه گونه متفاوت از جنس *باسیلوس* به نام های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورینجنسیس* و *باسیلوس فلکسوس* شناسایی گردید. برای هر کدام از این ۵ باکتری در بانک ژنی شماره خاصی تحت عنوان سویه‌ای جدید تعیین شد. فمی اولا (Femi-Ola) و همکاران در سال ۲۰۱۵، مازوتو (Mazotto) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز مشابه با این پژوهش، توانستند *با سیلوس سرئوس* را با خاصیت تجزیه کنندگی کراتین از خاک جداسازی نمایند (۲۱ و ۲۳). سیواکومار (Sivakumar) و همکاران در سال

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰۱۲، آگراهاری (Agrahari) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز مشابه با این پژوهش، موفق به جداسازی *باسیلوس تورنجینسیس* از خاک گردیدند (٦ و٢٤).

تا کنون در ایران پژوهشی مشابه با این تحقیق که *باسیلوس فلکسوس* با خاصیت کراتینازی را از خاک جداسازی کرده باشد، انجام نشده است. فعالیت آنزیمی ۵ نمونه باکتریایی در یک مرحله مورد بررسی قرار گرفت تا قویترین سویه از لحاظ آنزیمی‌بررسی شود. تمامی سویه‌ها فعالیت آنزیمی خوبی نشان دادند و قوی ترین سویه از لحاظ تولید کراتیناز، *با سیلوس سرئوس* سویه SKH1 تعیین گردید.

مهتا (Mehta) و همکاران در سال ۲۰۱۳ فعالیت آنزیمی *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*B. licheniformis*) را معادل ١٤/٣٤٤واحد بر میلی لیتر بر دقیقه گزارش کردند (۱۸). همچنین آگراوال (Agrawal) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز فعالیت آنزیمی سویه‌ای از جنس *باسیلوس* را ۱۳/٦۰ واحد بر میلی لیتر بر دقیقه به دست آوردند (۱۰). این یافته ها نزدیکترین شباهت را با نتایج مطالعه حاضر دارند. هدف از بهینه سازی، پیدا کردن شرایط متغیر و مؤثری است که باکتری بتواند میزان آنزیم کراتیناز بیشتری را تولید نماید. pH اولیه محیط کشت، قویاً تعدادی از فرآیندهای آنزیمی و عبور مواد غذایی مختلف از دیواره سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آنزیم‌ها در محدوده pH معینی فعال می‌شوند. فعالیت آنزیمی‌دیواره سلول، مجموعه‌ای از عملکردهای pH اولیه محیط کشت است (۱۸). در این مطالعه، pH بهینه برای تولید بیشترین مقدار کراتیناز توسط این باکتری، pH قلیایی ۸ به دست آمد.

این یافته با گزارش های قبلی ارائه شده توسط طالبی (Talebi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۵) و دیواسیگامانی (Deivasigamani) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۲۲) مطابقت دارد. ریفل (Riffel) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند (٢٦). به طوری که بیشترین فعالیت کراتینازی در pH ۷/۵ گزارش گردید.

همچنین پارک (Park) و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای سویه ای از *باسیلوس*، بهترین pH را در محدوده ۷/٤ تعیین نمودند که به پژوهش حاضر نزدیک است (۲۷).

در برخی از مطالعات انجام شده توسط محققان در سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۳، pH مناسب برای بهترین فعالیت آنزیم کراتینازی ۷ ، ۱۰ و ۱۱ گزارش گردید (۹، ۱۸، ٢٤ و ۲۸). نکته شایان توجه این است که تمامی این گزارش ها نشان دهنده فعالیت کراتینازی باکتری های کراتینولایتیک در شرایط و محدوده pH قلیایی می باشد.

دما یکی دیگر از پارامترهای فیزیکی است که در تولید آنزیم نقش دارد و متابولیسم انرژی را کنترل می‌کند (۱۸). باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه SKH1 مقادیر مختلفی از رهاسازی آنزیم کراتیناز را در محدوده دمایی ۲۵ تا ٤۵ درجه سلیسیوس نشان داد. فعالیت بهینه برای تولید آنزیم در این باکتری، ۳۵ درجه سلیسیوس تعیین گردید. می توان نتیجه گرفت که این باکتری ترموفیل است و در دمای بالا به خوبی رشد می‌کند.

این امر برتری مهمی‌در تجزیه پَر است. به طوری که می تواند قابلیت تجزیه پَر را در مدت زمان کمتری داشته باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه از نظر دمای بهینه در تولید کراتیناز با یافته های آگراوال (Agrawal) و همکاران در سال ۲۰۱۵ و مهتا (Mehta) و همکاران در سال ۲۰۱۳ هم خوانی دارد (۸ و ۱۰).

گونه‌های *باسیلوس* در محدوده دمایی ۳۰ تا ۵۵ درجه سلیسیوس قادر به رشد هستند. اگر چه تعدادی از باکتری های کراتینولایتیک در دماهای بالاتر نیز قادر به فعالیت بهینه برای تولید آنزیم می باشند (۱۸). گزارش هایی وجود دارد که محدوده دمایی ٤۰ تا ٦۰ درجه سلیسیوس را در این مورد بیان می‌کند (۲۰). ویگنش واران (Vigneshwaran) و همکاران در سال ۲۰۱۰، دمای بهینه رشد باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* را ٦۰ درجه سلیسیوس گزارش کردند (۲۰).

در این مطالعه برای اولین بار در ایران باکتری *باسیلوس فلکسوس* با خاصیت کراتینازی از خاک جداسازی گردید. پیشنهاد می گردد که مطالعات دیگری بر روی خاک تمامی مناطق مرغداری‌ها و همچنین زمین های کشاورزی فارس و بقیه مناطق ایران انجام شود. همچنین توصیه می گردد که باکتری های مختلف تولید کننده آنزیم کراتیناز به منظور استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

در صنایع تولید کننده شوینده، تجزیه پَرهای تولیدی توسط مزارع پرورش مرغ و پاکسازی محیط زیست، جداسازی و شناسایی گردند.

ای دارد و می‌تواند باندهای دی سولفیدی کراتین را بشکند. اندازه گیری فعالیت آنزیمی ۵ سویه جدا شده نشان می دهد که این سویه کاندید مناسبی در صنایع مختلف آنزیمی می باشد.

نتیجه گیری

تجزیه پَر به وسیله باکتری *با سیلوس سرئوس* سویه SKH1 تاییدی است بر اینکه این باکتری قدرت پروتئازی قابل ملاحظه

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت های پژوهشی و علمی کمال امتنان را دارند.

References

1. Onifade AA, A1-Sane NA, Al-Musallam AA, Al-Zarban S. Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Biores Technol. 1998; 66(1): 1-11.
2. Pandian S, Sundaram J, Panchatcharam P. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. Eur J Exp Biol. 2012; 2(1): 274-282.
3. Ramani P, Gupta R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. Biotechnol Appl Biochem. 2004; 40(2):191-196.
4. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 70(1): 21-33.
5. Zerandi I, Faid M, Malkil A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. Afr J Biotechnol. 2004; 3(1): 67-70.
6. Agrahari S, Wadhwa N. Degradation of Chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant. Int J Poultry Sci. 2010; 9(5): 482-489.
7. Sah N, Goel A, Omre PK. Characterization of chicken feather fibre as novel protein fiber for commercial applications. National Academy Agr Sci. 2015; 33(4): 3373-3377.
8. Mehta R, Jholapara R, Sawant C. Optimization of cultural condition for extracellular keratinase production by *Bacillus* species isolated from poultry from soil. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 4(2): 454-463.
9. Mousavi S, SaloutiM, Shapoury R, Heidari Z. Optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(8): e7160.
10. Agrawal B, Dalal M. Screening and characterization of keratinase enzyme obtained from keratin degrading microorganism isolated from Sanjan poultry waste dumping soil. Eur Academic Res. 2015; 2(11): 13986-13994.
11. Wang X, Parsons C.M. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and

Archive of SID

www.SID.ir

hog hair meals. Poultry Sci. 1997; 76: 491-496.

12. Papadopoulos MC, El Boushy AR, Roodbeen AE, Ketelaars EH. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Animal Feed Sci Technol. 1986; 14: 279-290.

13. Lin X, Inglis GD, Yanke LJ, Cheng KJ. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. J Ind Microbiol Biotechnol. 1999; 23(2): 149-153.

14. Cao ZJ, Zhang Q, Wei DK, Chen L, Wang J, Zhang XQ, Zhou MH. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36: 181-188.

15. Cai C, Zheng X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36: 875-883.

16. Farag AM, Hassan MA. Purification, characterization and aimmobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. Enzyme Microb Technol. 2004; 34: 85-93.

17. Mazotto AM, Coelho RR, Cedrola SM, de Lima MF, Couri S, Paraguai de Souza E, Vermelho AB. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. Enzyme Res. 2011(2011): 523780-7.

18. Mehta R, Jholapara R, Sawant C. Isolation of a novel feather-degarding bacterium and optimization of its cultural conditions for enzyme production. Int J Pharm Pharma Sci. 2013; 6 (1): 194-201.

19. Sahoo DK, Das A, Thatoi H, Mondal KC, Das Mohapatra PK. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 2012; 167: 1040-1051.

20. Vigneshwaran C, Shanmugam S, Sathish Kumar T. Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from Namakkal poultry farm. Researcher. 2010; 2(4): 89-96.

21. Femi-Ola TO, Akinbobola OS, Oluwaniyi TT. Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry soil. Agric Biol J N Am. 2015; 6(5): 146-154.

22. Deivasigamani B, Alagappan KM. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. J Environ Biol. 2008; 29(6): 933-936.

23. Mazotto A, de Melo AN, Macrae A, Rosado A, Peixoto R, Cedrola S, Couri S, Zingali R, Villa A, Rabinovitch L, Chaves J, Vermelho A. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. World J Microbiol Biotechnol. 2011; 27: 1355-1365.

24. Sivakumar T, Shankar T, Vijayabaskar P, Ramasubramanian V. Optimization for keratinase enzyme production using *Bacillus thuringiensis* TS2. Acad J Plant Sci. 2012; 5(3): 102-109.

25. Talebi M, Emtiazi G, Akhavan Sepahy A, Zaghian S. Zymogram analysis of alkaline keratinase produced by nitrogen fixing *Bacillus pumilus* ZED17 exhibiting multiprotease enzyme activities. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(10): e7974.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Arch Microbiol. 2003; 179: 258-265.

27. Park I, Cho J. Production of an extracellular protease by an Antarctic bacterial isolate (*Bacillus* sp. JSP1) as a potential feed additive. Rev Colomb Cienc Pecu. 2011; 24(1): 3-10.

28. Infante I, Morel M, Ubalde MC, Rosales C, Castro-Sowinski S. Wool-degrading *Bacillus* isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26:1047-1052.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 3, September 2017

Original Article

Molecular identification and optimization of keratinase production in keratin-degrading bacteria isolated from soil poultry of Marvdasht city

Somayeh Khodayari[1], Farshid Kafilzadeh[2]

[1]M.Sc., Young Researchers and Elite Club, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Feather is one of the environmental pollutants that about 90% of its weight is made of highly resistant creatine plates. A number of bacteria are able to produce a keratinase enzyme in the presence of keratin substrate. The purpose of this study was isolation and molecular identification of keratin- degrading bacteria from the soil of poultry farms around Marvdasht city in order to measure keratinase activity in superior creatine-degrading strains.

Material & Methods: In this study, 15 soil samples from poultry farms around Marvdasht city was collected. Seven bacterial isolates were cultured on a feather meal medium. Five isolates that showed clear degradation zone, were chosen for further chemical and molecular identification. The bacteria were sequenced, and a specific accession number in the gene bank was allocated to each of them as a new strain. Then, all five isolates were assessed for the level of keratinase enzyme production.

Result: All isolates belonged to *Bacillus* species. All five isolates were able to completely degrade keratine. The most keratinase activity was reported 17.12 (ml/min) for *Bacillus cereus* SKH1.

Conclusion: Different species of *Bacillus* in this study showed the ability to produce a keratinase enzyme in the presence of keratin substrate. Investigating the level of keratinase activity in bacterial isolates showed that all have the potential treat feather waste.

Keywords: Keratinase enzyme, Feather-degrading bacteria, *Bacillus cereus*.

Correspondence to: Farshid Kafilzadeh

Tel: +98 9171140799

E-mail: f.kafilzadeh@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 10(3): 231-242.

Archive of SID

www.SID.ir