مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی باکتری مولد ریبوفلاوین ازخاک مناطق مختلف ایران

الهام سیاسی *، فرزانه حسینی، حلیمه بابایی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران ، ایران.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

چکیده

سابقه و هدف: ریبوفلاوین یا ویتامین B2 برای انسان ضروری است و نقش مهمی در متابولیسم ماکرمولکول‌های بدن دارد. انسان قادر به سنتز این ویتامین نبوده و باید آن را از رژیم غذایی دریافت نمایند. مسیر بیوسنتتیکی ریبوفلاوین در باکتری‌ها مطالعه شده است. هدف این پژوهش جداسازی و شناسایی *باسیلوس سوبتی‌لیس* به‌عنوان باکتری مولد ریبوفلاوین از خاک مناطق مختلف ایران بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شد و کشت پورپلیت انجام شد. سپس ایزوله‌هایی از کشت خالص باکتری‌ها، با آزمایش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی شناسایی شدند. ژنوم نمونه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس* جداسازی شده استخراج شد و برای حضور ژن *ribC*، واکنش PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش PCR نشان داد، از ۱۰۰ نمونه خاک بررسی شده، ۱۹ جدایه باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* دارای ژن *ribC* با توانایی رشد در محیط فاقد ریبوفلاوین جداسازی شدند.

نتیجه‌گیری: *باسیلوس سوبتی‌لیس* از خاک به‌راحتی جداسازی می‌گردد و ژن *ribC* در *باسیلوس سوبتی‌لیس* می‌تواند کد کننده ریبوفلاوین باشد. با توجه به این‌که تنظیم بیوسنتز ریبوفلاوین در *باسیلوس سوبتی‌لیس* توسط ناحیه تنظیمی که در بالا دست اپران ژن *ribC* است صورت می‌پذیرد، می‌توان از این باکتری در تهیه ریبوفلاوین مقرون به صرفه که از نظر مسائل محیط زیستی نیز مناسب‌تر است، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ریبوفلاوین، *باسیلوس سوبتی‌لیس*، ژن *ribC*، باکتری‌های خاک.

مقدمه

ویتامین‌ها نقش حیاتی برای سلامت انسان داشته و وجود آن‌ها در بدن برای ادامه بقا لازم و ضروری است. ویتامین‌های گروه Bاهمیت بالایی در حفظ انرژی بدن دارند اما این ویتامین در بدن ذخیره نمی‌شود و تأمین آن از طریق موادغذایی ضروری است. ریبوفلاوین یا ویتامین B_2 یک ضرورت در رژیم غذایی برای انسان است که، بر خلاف بسیاری از گیاهان، قارچها و باکتری‌ها، قادر به سنتز ویتامین نیستند (۱۹،۱۷). دو منبع برای انسان در دسترس است: یک منبع غذایی و دیگری تولید توسط فلور میکروبی روده بزرگ. مصرف روزانه توصیه شده ۱/۳ میلی‌گرم در روز برای مردان و۱/۱ میلی‌گرم در روز برای زنان است. در رژیم‌های غذایی غربی مصرف شیر و فرآورده‌های لبنی به‌طور عمده به جذب روزانه ریبوفلاوین کمک می‌کند. سایر منابع خوب این ویتامین شامل مخمر، غلات، حبوبات، گوشت، روغن ماهی و سبزیجات برگ‌دار سبز است (۱۷ ، ۱۹). فرآورده‌های غله‌ای فقط شامل مقادیر کمی از ریبوفلاوین است به‌همان اندازه از ویتامین به‌علت پردازش از دست می‌رود. به هرحال، روش‌های غنی سازی، نان‌ها و فرآورده‌های غله ای را به عنوان منابع خوبی از ریبوفلاوین تبدیل می‌کند. این ویتامین

نویسنده مسئول :

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۷

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

هم‌چنین نقش مهمی در متابولیسم انرژی سلول بازی می‌کند و در سال‌های اخیر، نشان داده شده که ریبوفلاوین بیماری‌های مختلف مانند عفونت استافیلوکوکی و آپوپتوزیس سلول اپیتلیال روده‌ای القاء شده با کیسپلاتین را بهبود می‌بخشد (۹). از نظر متابولیکی، ریبوفلاوین پیش ماده فلاوین نوکلیوتید (FMN) و فلاوین آدنین نوکلیوتید (FAD) است، که هردو به‌عنوان ناقل الکترون در واکنش‌های اکسیداسیون-احیا،و کوآنزیم صدها آنزیم وابسته به FMN یا FAD که فلاووپروتئین نامیده می‌شوند عمل می‌کنند. اغلب برهم‌کنش های فلاوین آنزیم زنجیره جانبی ریبیتول را درگیر می‌کند، که موقعیتی را نشان می‌دهد که FMN و FAD در آن متفاوت هستند، که بحث اختصاصی بودن این آنزیم‌ها برای هر دو کوفاکتور ذکر شده پیش می‌آید. از میان عملکردهای فلاوپرووتئین‌ها می‌توان به ضروری بودن در متابولیسم آمینواسیدها، تولید انرژی و فعال‌سازی فولات دراشکال کوآنزیمی اشاره کرد. انسان‌ها نمی‌توانند این ویتامین را ذخیره کنند و جذب اضافی در ادرار دفع می‌شود (۱۱، ۱۶). کمبود ریبوفلاوین در بسیاری از نقاط جهان شامل هم کشورهای در حال توسعه و هم کشورهای توسعه یافته، فراوان است. کمبود شدید B_2 می‌تواند بر سطوح مخاطی پوستی دهان تأثیر بگذارد.کمبود ریبوفلاوین هم‌چنین موجب تضعیف دید، کاهش نرخ رشد، افزایش سطوح هوموسیستئین ریسک قلبی بعدی، عوارض بارداری و آنمی می‌شود (۲۰). توانایی‌های بیوسنتتیکی برای انواع ویتامین‌های B در میان میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. این ظرفیت طبیعی برای تولید ویتامین B توسط میکروارگانیسم‌های خاص پتانسیل بهره‌برداری را داراست، که می‌تواند جایگزین مناسبی برای سنتز شیمیایی پر هزینه ویتامین‌ها برای غنی‌سازی غذا و افزایش آن برای غنی‌سازی غذاهای تخمیری باشد. کارهای بسیاری در سال‌های اخیر جهت نشان دادن مسیرهای بیوسنتتیکی این ویتامین‌ها در تعدادی از میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. دانش به‌دست آمده نیز اجازه استراتژی‌های مختلف به‌کار گرفته شده به‌منظور افزایش تولید ویتامین را می‌دهد. ریبوفلاوین توسط بسیاری از باکتری‌ها سنتز می‌گردد و مسیر بیوسنتتیکی آن به‌طور جامعی در *باسیلوس سوبتی‌لیس* و *E.coli* مطالعه شده است (۳). بیوسنتز ریبوفلاوین به پیش‌ماده‌های گوانوزین ۵'- تری فسفات (GTP) و ریبولوز ۵ فسفات نیاز دارد. مسیر بیوسنتتیکی توسط *ribA* در *E.coli* کد می‌شود. در *باسیلوس سوبتی‌لیس* نیز توسط *ribA* کد می‌شود، اما در این مورد *ribA* یک آنزیم دوکاره است که تشکیل ۳و۴-دی هیدروکسی -۲- بوتانون ۴- فسفاتاز ریبولوز ۵- فسفات را کاتالیز می‌کند (۱). بیان زیاد ژن *ribA* در *سوبتی‌لیس* تولید ریبوفلاوین را به بیش از ۲۵ درصد افزایش می‌دهد. با این حال، بیان بیش از حد ژن *ribA* در *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به‌تنهایی به افزایش تولید ریبوفلاوین منجر نخواهد شد (۱). برای فعال بودن از نظر بیولوژیکی، ریبوفلاوین باید به اشکال کوآنزیمی‌اش یعنی FAD و FAM تبدیل گردد. این واکنش توسط فلاوکیناز / FAD سنتاز، که در *باسیلوس سوبتی‌لیس* توسط ژن *ribc* یا *ribF* در *E.Coli* کد می‌شود انجام می‌پذیرد. موتاسیون‌های خاص در *باسیلوس سوبتی‌لیس* هم‌چنین ژن کد کننده ریبوفلاوین کیناز تک عملکردی *ribR* را کد می‌کنند که می‌تواند اثر موتاسیون *ribC* را مهار کند و محصول‌های ریبوفلاوین بازیابی نماید (۱). تنظیم بیوسنتز ریبوفلاوین و انتقال در *باسیلوس سوبتی‌لیس* توسط ناحیه تنظیمی حفاظت شده به نام عنصر RFN که هم در ناحیه بالا دست ایران ژن *rib* که ژن‌های بیوسنتز ریبوفلاوین هستند و هم ژن ناقل ریبوفلاوین *ypaA/ribU* صورت می پذیرد. جهش‌ها در این ناحیه تنظیمی باعث افزایش تولید ریبوفلاوین می‌گردد (۱). در سال‌های اخیر فرآیندهای بیولوژیکی بسیاری برای جایگزینی سنتز شیمیایی ویتامین‌ها که هزینه بر هستند صورت پذیرفته است. در کنار مزایای اقتصادی، مزایای روش‌های بیوتکنولوژیکی شامل استفاده از منابع تجدیدپذیر دوست‌دار محیط زیست بوده و تولید محصول‌هایی با کیفیت برابر و یا بهتر را سبب می‌شوند (۴). بعضی باکتری‌ها و قارچ‌ها قابلیت بسیاری در تولید ریبوفلاوین را دارا هستند و این توانایی جهت تولیدات صنعتی به خدمت گرفته شده است، مانند محصول‌های تجاری شامل اسکومیست‌ها. با این حال، از طریق تخمیرهای مخمر و باکتریایی می‌توان از میزان رشد بالای آن‌ها از محیط کشت نه چندان پیچیده و پرهزینه بهره جست. در سال‌های اخیر، سه میکروارگانیسمی که برای تولید ریبوفلاوین مورد استفاده قرار گرفته‌اند، *آسپرژیلوس گوسپی*، *کاندیدا فاماتو* و *باسیلوس سوبتی‌لیس* هستند که سطوح تولید ریبوفلاوین در آن‌ها به‌ترتیب ۲۰،۱۵ و ۱۴ گرم بر لیتر است (۱۰، ۱۲). در *آسپرژیلوس گوسپی* تولید ریبوفلاوین توسط مهندسی متابولیسم تا ۱۰ برابر افزایش یافته است (۱۰، ۱۲). هم‌چنین *آسپرژیلوس گوسپی* از میکروارگانیسم‌هایی است که تولید ریبوفلاوین را از ضایعات نفتی انجام می‌دهد (۱۰). در مورد *باسیلوس سوبتی‌لیس* سطوح بالای تولید ریبوفلاوین در حالی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

صورت می‌پذیرد که در معرض شبه پورین‌ها و آنالوگ سمی ریبوفلاوین (روزئوفلاوین) قرار گرفته یا از طریق مهندسی ژنتیک انجام می‌گیرد (۱۰). در *لاکتوباسیلوس لاکتیس* از هر دو روش ذکر شده تولید ریبوفلاوین با موفقیت انجام شده است و چنین گزارش شده که ریبوفلاوین تولید شده توسط این سویه‌ها می‌تواند کمبود القا شده ریبوفلاوین در موش‌ها را برطرف سازد (۴)

خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اکوسیستم‌های میکروبی محل رشد و تکثیر انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها است. وسیع‌ترین تعداد میکروارگانیسم‌های شناخته شده، در خاک یافت می‌شوند (۷، ۱۸). انواع میکرو ارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، گلسنگ‌ها و پروتوزوآها در خاک یافت می‌شوند و باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک هستند. باکتری‌های خاک شامل آرتروباکتری-ها، سودوموناس‌ها، باسیل‌های اسپورزا به‌خصوص باسیلوس‌ها، باکتری‌های میله‌ای غیر اسپورز، اکتینومیست‌ها و سیانوباکتری‌ها هستند (۱۳). بنابراین در این تحقیق به‌منظور جداسازی باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* از خاک مناطق مختلف ایران به‌عنوان جدایه مؤثر در تولید ویتامین ریبوفلاوین و بررسی حضور ژن *ribC* در این جدایه‌های جداسازی شده که با تولید ریبوفلاوین مرتبط هستند پرداخته شده است تا روشی برای تولید بهینه و مقرون به صرفه برای این ویتامین که ضروری و مورد نیاز انسان‌ها است، را ارائه نماید.

مواد و روش‌ها

۱-نمونه‌برداری و جداسازی خاک- به‌منظور جداسازی جنس باسیلوس‌ها از خاک مناطق مختلف، ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف ایران برداشت شد. نمونه برداری تحت شرایط استریل انجام شد. به این ترتیب که ابتدا از خاک نواحی مختلف مانند محدوده‌های متراکم پوشش گیاهی و درختان پر برگ که تحت تابش نور مستقیم خورشید نبودند از سطح تا عمق ۵ سانتی‌متری از خاک به‌وسیله بیلچه استریل نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های خاک را درون ظروف استریل مخصوص که از قبل آماده شده بودند ریخته و به-سرعت در دمای ۴ °C جهت آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. مشخصات، محل نمونه‌برداری و تاریخ آن بر روی ظروف حاوی نمونه‌ها یادداشت شد. ظروف مخصوص نمونه‌برداری به حجم ۰/۵ الی ۱ لیتر پس از اسیدشویی چندین بار با آب مقطر شسته و جهت استریل کامل در ۱۲۱°C اتوکلاو شدند.

۲-کشت و جداسازی *باسیلوس‌ها*- جهت جداسازی جنس *باسیلوس*‌ها از تکنیک Heat enrichment culture یا پاستوریزاسیون استفاده شد و در ادامه برای خالص‌سازی آن‌ها از روش پورپلیت یا کخ استفاده شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به‌وسیله الک استریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. ۱ گرم خاک الک شده را به داخل لوله‌های آزمایش درپیچ‌دار ریخته و به آن ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس نمونه‌های سوسپانسیون خاک را در بن ماری (حمام آب گرم) در درجه حرارت ºC ۸۰ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا به این ترتیب تنها باکتری‌های اسپوردار خاک باقی ماندند (شامل باسیلوس‌ها و کلستریدیوم‌ها). سپس ۹ رقت پشت سر هم تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر از ۳ رقت آخر برداشته و در پلیت کانت آگار (پلیت نوترین آگار) به روش پور پلیت کشت داده شد، سپس پلیت‌ها در دمایºC ۳۷ به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند (تمام مراحل ۲ بار جداگانه انجام شدند).

۳-تأیید حضور باکتری‌های ایزوله شده به‌عنوان باسیل گرم مثبت اسپور دار هوازی- هر کلنی خالص جداسازی شده، از لحاظ خصوصیات مورفولوژیک و به-طورکلی رنگ، شکل ظاهری کلنی و قوام آن مورد بررسی قرار گرفت. از هر کلنی باکتریایی خالص شده رنگ‌آمیزی گرم و اسپور (مالاشیت گرین) تهیه شد و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی و مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

۴-جداسازی جدایه باکتریایی- ایزوله‌هایی که به‌طور تصادفی انتخاب شده‌اند در زمان‌های مختلف از پلیت‌ها و کشت دوم میکروب با آزمایش مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، نظیر آزمون همولیز در محیط بلاد آگار، آزمایش نشاسته در محیط Starch Aagar، آزمایش کاتالاز با معرف H_2O_2، آزمون ژلاتین در محیط ژلاتیناز، آزمون تریپل‌شوگر ایرون آگار در محیط TSI، آزمون IMViC در محیط‌های SIM و MRVP و سیمون سیترات، آزمون احیای نیترات در محیط نیترات براث، آزمون هیدرولیز لیپید در محیط تری بوترین آگار، آزمون اوره از در محیط اوره، آزمون کازِیین در محیط Skim Milk Agar، آزمون لیستیناز در محیط لیسیتین، بررسی شدند. شناسایی به‌طور عمده بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، آزمون کاتالاز، مشخصات مورفولوژی روی محیط‌های کشت و تخمیر منابع کربن به‌خصوص کشت در محیط ساکاروز و در سایر محیط‌های قندی گلوکز، گزیلوز، آرابینوز و مانیتول انجام گرفت.

۵- جداسازی *باسیلوس سوبتی‌لیس* مولد ریبوفلاوین با کشت نمونه‌ها در محیط کشت ریبوفلاوین ۲٪- نمونه‌هایی که دارای نتایج مثبت در آزمون‌های هیدرولز نشاسته در محیط Starch Aagar، هیدرولیز ژلاتین در محیط ژلاتیناز و هیدرولیز چربی در محیط تری بوترین آگار و احیای نیترات در محیط نیترات براث هستند جداسازی شدند. سپس این جدایه‌ها تفکیک شده و پس از شستشو در محیط کشت ریبوفلاوین ۲٪ کشت داده شده و در ۳۷°C برای ۱۸ ساعت انکوبه شدند. ایزوله‌های تفکیک شده در محیط BHI broth کشت داده شدند. سپس محیط کشت BHI broth حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت محیط BHI broth حاوی باکتری با دور ۸۰۰۰ به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته ورسوب حاصل ۲ بار با محلول نرمال سالین ۸/۵ ٪ شستشو داده شد. به این صورت‌که ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر سرم نرمال سالین را در لوله حاوی رسوب ریخته، سپس با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفوژ گردید. دو بار این مرحله تکرار شد. پس از شستشو، ایزوله‌ها در محیط کشت حاوی ریبوفلاوین ۲٪ کشت داده شدند. برای این منظور از محیط MRS Agar استفاده گردید و ۲٪ ویتامین ریبوفلاوین به محیط اضافه گردید. پس از خنک شدن محیط کشت ایزوله‌های تفکیک شده را در محیط حاوی ریبوفلاوین ۲٪ کشت داده شدند و در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. بعد از رشد این باکتری‌ها شستشوی سوسپانسیون انجام گرفت. این بار باکتری‌ها در محیط حاوی MRS Agar بدون ریبوفلاوین کشت داده شدند. جدایه‌هایی که در محیط فاقد ریبو فلاوین رشد نکردند از سایرین جداسازی شدند. از جدایه‌هایی از *باسیلوس سوبتی‌لیس* که در محیط دارای ریبوفلاوین رشد داشتند، کشت خالص تهیه نموده و روی نوترین آگار در ۳۷ °C در شرایط هوازی کشت داده شدند (این سویه‌ها به‌عنوان کاندید برای دارا بودن توانایی سنتز ریبوفلاوین انتخاب شدند). سپس این جدایه‌های خالص شده، برای شناسایی ژن دخیل در سنتز ریبوفلاوین (حضور ژن *rib C*) با واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز بررسی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

۶-استخراج ژنوم- برای استخراج ژنوم از *باسیلوس سوبتی‌لیس*های خالص‌سازی شده در محیط ریبوفلاوین، از کیت استخراج DNA باکتری گرم مثبت استفاده شد.

۷-واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)- با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای حضور ژن *ribC* در نمونه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس*، واکنش PCR انجام شد. مشخصات پرایمرها، مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه PCR به‌ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است.

جدول۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمر برای تکثیر ژن *rib C* .

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر'3-'5	اندازه محصول
rib C	F- GACGGCGTTCATCTCGGGCATC R- GAAACCCGATGGTCCGCCCTC	543bp

جدول۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

مواد مورد استفاده در واکنش PCR	حجم مواد (میکرولیتر)
آب	۱۷
بافر PCR	۲/۵
dNTP	۱
پرایمر چپ	۱
پرایمر راست	۱
DNA ژنومی	۱
آنزیم Taq پلیمراز	۰/۵
حجم نهایی	۲۵ میکرولیتر

جدول۳- برنامه دستگاه PCR برای تکثیر ژن *rib C*.

نام ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	طویل شدن	طویل شدن نهایی	تعداد چرخه	طول محصول PCR
rib C	۹۵ °C بەمدت ۵ دقیقه	۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه	۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه	۷۲°C بەمدت ۵۰ ثانیه	۷۲°C بەمدت ۵ دقیقه	۲۷	543bp

۸- الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪- نمونه‌های ژنوم استخراج شده و نمونه‌های PCR شده با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز ۱٪ درون بافر TAE 1X در ۷۰ ولت، الکتروفورز گردید تا از حضور ژنوم و صحت استخراج و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اطمینان حاصل شود.

نتایج

۱-نمونه‌برداری از خاک- در این پژوهش ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف محیطی مانند پارک‌های جنگلی، باغ-های مختلف و جنگل جمع‌آوری گردید. از این نمونه‌ها ۱۹ جدایه *باسیلوس سوبتی‌لیس* مولد ریبوفلاوین جداسازی شد.

۲-جداسازی جدایه‌های باسیلوس از خاک- مراحل جداسازی باسیلوس‌ها طی تکنیک غنی‌سازی حرارتی (پاستوریزاسیون) و پورپلیت (روش کخ) انجام شد. مراحل خالص‌سازی هریک از کلنی‌های رشد یافته حاصل از پورپلیت طی کشت ۴ مرحله‌ای روی محیط Plate Count Agar انجام شد و کشت خالص از هر کلنی به‌طور مجزا به‌دست آمد.

۳-نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم- با مشاهده لام-های رنگ‌آمیزی شده زیر عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری وجود اشکال باسیلی شکل بنفش رنگ (گرم مثبت) تأیید شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

۴-نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی اسپور به‌روش مالاشیت گرین

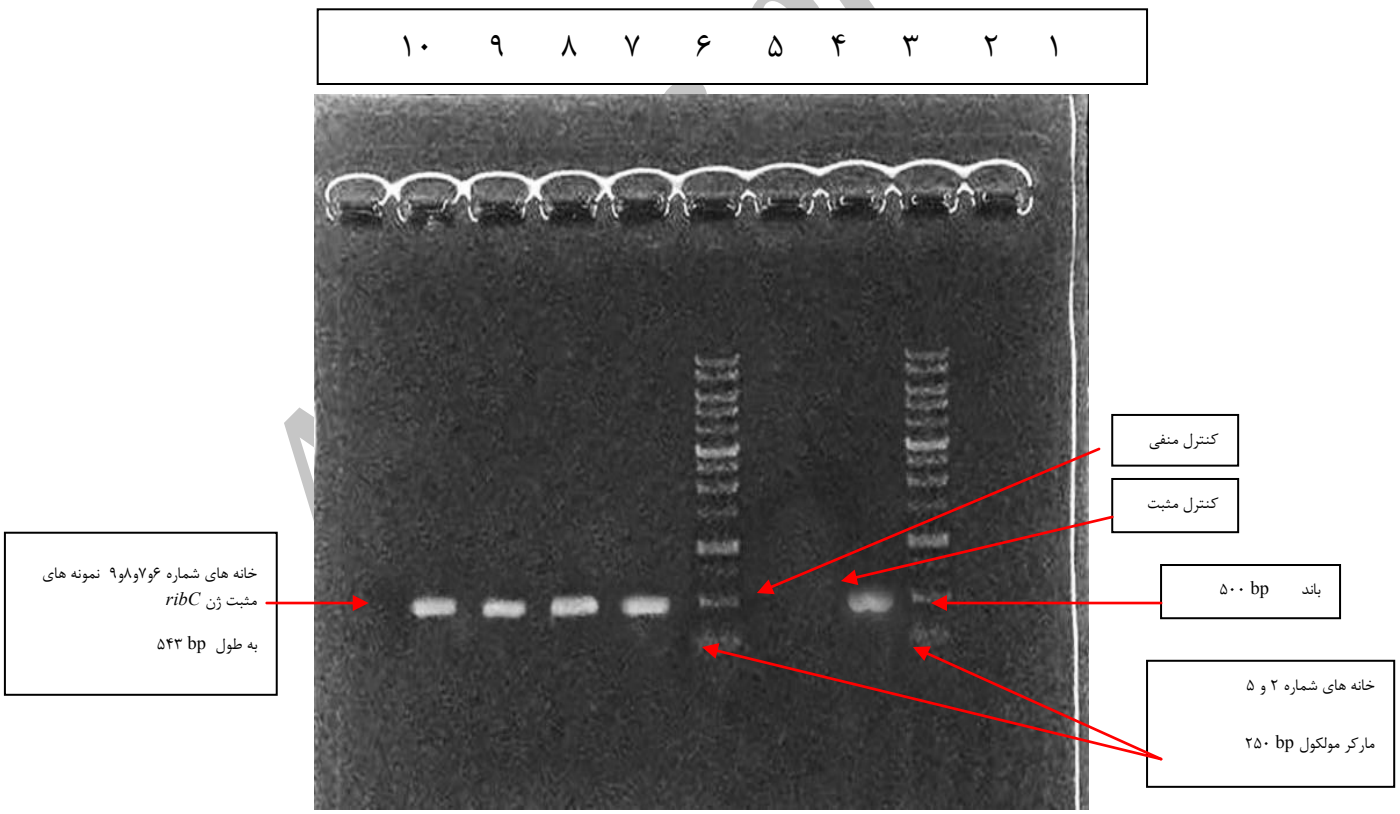
- با این روش رنگ آمیزی وجود اسپورهای سبز درون سلول‌های رویشی با رنگ قرمز- صورتی مشاهده شد.

۵-نتایج رشد جدایه‌های *باسیلوس* در محیط‌های افتراقی

- جهت تأیید شناسایی جدایه‌های *باسیلوس سوبتی-لیس* جداسازی شده، از آزمون‌های افتراقی استفاده شد. نتایج آزمون‌های افتراقی در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای تشخیص *باسیلوس سوبتی‌لیس*.

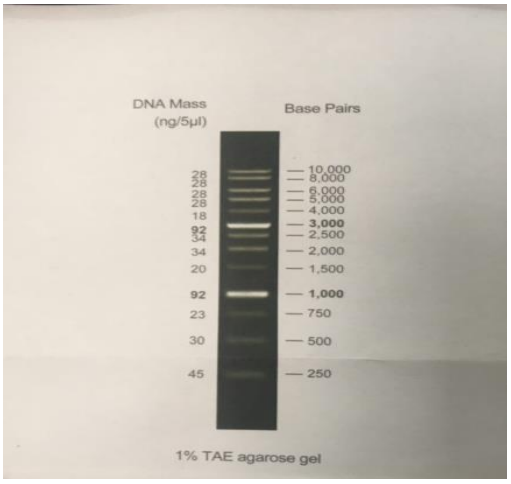
باکتری	آزمون کاتالاز	آزمون هیدرولیز	هیدرولیز لیپید	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز ژلاتین	آزمون اوره از	آزمون سیترات	آزمون MR	آزمون VP
محیط کشت	معرف H_2O_2	بلاد آگار	تری بوترین آگار	Starch Agar	ژلاتیناز	اوره	سیمون سیترات	MRVP	MRVP
باسیلوس سوبتی لیس	+	همولیز الفا	+	+	+	–	+	+	–
باکتری	آزمون اندول	تخمیر گلوکز	تخمیر مانیتول	تخمیر ارابینوز	تخمیر گزیلوز	آزمون لیستیناز	احیای نیترات	آزمون تریپل ایرون اگار	هضم کازئین
محیط کشت	STM	دارای قند گلوکز	دارای قند مانیتول	دارای قند آرابینوز	دارای قند گزیلوز	لیسیتین	نیترات براث	TSI	Skim Milk Agar
باسیلوس سوبتی لیس	+––	+	+	+	+	+	+	Alk/A g	+



شکل ۱- محصول *PCR* حاصل از تکثیر ژن *ribC* در باسیلوس *سوبتی‌لیس*- از سمت راست به چپ، خانه شماره ۲ و ۵: مارکر مولکولی *bp* ۲۵۰ (شکل ۲)، خانه شماره ۳: نمونه کنترل مثبت، خانه شماره ۴: نمونه کنترل منفی ، خانه شماره ۶ تا ۹: نمونه‌های دارای ژن *ribC* با طول bp ۵۴۳.

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019



شکل۲ - مارکر مولکولی DNA Ladder(8201) – 250 bp (مارک متابیون تهیه شده از شرکت روبین طب گستر)

۶- بررسی کشت در محیط کشت فاقد ریبوفلاوین ۲٪- جدایه های *باسیلوس سوبتی‌لیس* که پس از شستشو در محیط کشت فاقد ریبوفلاوین ۲٪ رشد داشتند خالص‌سازی شدند و سپس رشد آن‌ها روی نوترین آگار در ۳۷°C در شرایط هوازی مثبت گزارش شد و برای حضور ژن *rib C* در آن نمونه‌ها، واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز انجام گرفت. زیرا توانایی این جدایه‌ها در رشد روی محیط فاقد ریبوفلاوین ۲٪ می‌تواند به‌دلیل حضور ژن *rib C* در آن‌ها بوده که امکان تولید ریبوفلاوین را برای آن جدایه مستقل از محیط کشت فراهم نموده باشد و با تغییر فنوتیپی همراه بوده است. بنابراین به‌منظور تایید حضور ژن *rib C* در جدایه‌هایی که توانایی تولید ریبوفلاوین را در محیط فاقد ریبوفلاوین امکان‌پذیر ساخته و سبب گردیده است تا این جدایه‌ها در این محیط کشت رشد کنند، از واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز استفاده شد.

۷- نتایج واکنش PCR برای بررسی حضور ژن *ribC* در جدایه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس*- پس از استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس* جهت تکثیر ژن *ribC* که کد کننده ریبوفلاوین است از روش PCR استفاده شد. نتایج حاصل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تمام جدایه‌های استخراج شده پس از انجام الکتروفورز و رنگ‌آمیزی بررسی شد و چنین گزارش شد که از ۱۰۰ نمونه باکتری ایزوله شده ۱۹ جدایه (۱۹ درصد) دارای ژن *ribC* بودند. برای کنترل مثبت از ژنوم باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* که حاوی ژن *rib C* بود استفاده شد و برای نمونه کنترل منفی ویال بدون DNA ژنومی به‌کار رفت. باندهای حاصل از تکثیر ژن *ribC* با واکنش PCR در شکل ۱ آورده شده است.

بحث

ریبوفلاوین یا ویتامین B_2 برای انسان ضروری است و باید از رژیم غذایی دریافت گردد. ریبوفلاوین نقش قابل ملاحظه ای در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب و آمینو اسیدها دارد. انسان‌ها برخلاف بسیاری از گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها ، قادر به سنتز این ویتامین نیستند (۱۷، ۱۹). دو منبع برای انسان در دسترس است: یکی منبع غذایی و دیگری ریبوفلاوین تولید شده توسط فلور میکروبی روده بزرگ است. باکتری‌های مولد ریبوفلاوین یکی از منابع تولید این ویتامین است. ازجمله این میکروارگانیسم‌ها *باسیلوس سوبتی‌لیس* است که در خاک‌های مناطق مختلف یافت می‌شوند و توانایی تولید ویتامین ریبوفلاوین را دارند که به این ترتیب از باکتری‌های مولد ریبوفلاوین برای غنی‌سازی نان‌ها و فرآورده‌های غله‌ای به‌عنوان منابع خوبی از ریبوفلاوین استفاده می‌شوند (۱۲،۱۱).

در این مطالعه با استفاده از منابع مختلف خاک ایران، از ۱۰۰ نمونه خاک، ۱۰۰ کلنی خالص‌سازی شد و طی غربال‌گری

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

اولیه ۱۹ نمونه *باسیلوس سوبتی‌لیس* مولد ریبوفلاوین از انواع خاک‌های مناطق مختلف به‌دست آمد که نشان دهنده پتانسیل بالای باکتری‌های خاک مناطق مختلف در تولید ریبوفلاوین است. نمونه‌برداری از گستره وسیعی از خاک‌های مناطق مختلف انجام گرفت و در طی مراحل کار آزمایشگاهی موفق به جداسازی جدایه‌های مولد ریبوفلاوین از آن‌ها گردید. با نمونه-گیری از خاک چندین جدایه مولد ریبوفلاوین به‌دست آمد که بسیار ارزشمند هستند. در مورد انتخاب گونه باسیلوس‌ها چنین است که این گونه به‌دلیل خصوصیات برتر فراوانی که نسبت به دیگر میکرواورگانیسم‌ها داشت انتخاب شد. در میان میکروارگانیسم‌های تولید کننده ریبوفلاوین *باسیلوس سوبتی-لیس* قدرت بالایی در تولید این ویتامین دارند و هم‌اکنون در سطح جهان با شناخت فواید استفاده از آن، حجم کارهای تحقیقاتی و مطالعه بر روی آن‌ها بیش‌تر شده است. هم‌چنین به جهت دارا بودن اسپور، خاصیت ماندگاری و جداسازی بهتری داشته و رشد و نمو خوب و به نسبت سریعی بر روی محیط‌های کشت دارند. باسیلوس‌ها توانایی صنعتی شدن بالایی دارند و در دستگاه‌های فرمانتور می‌توانند به‌خوبی فعالیت داشته باشند (۱۲). این میکروارگانیسم توانایی بهینه شدن را به‌خوبی داراست و با بهینه سازی دقیق می‌توان رشد و تولید ویتامین آن‌ها را چندین برابر بالا برد. گام بعدی استفاده از مهندسی ژنتیک است که با ایجاد جدایه‌های جهش یافته و حذف ژنتیکی اپران‌های مهار کاتابولیکی تولید این ویتامین می‌تواند آن‌ها را به یک تولید کننده فوق‌العاده تبدیل سازد. به-طورکلی، می‌توان منابع باکتریایی کشور را به‌عنوان منابعی با پتانسیل بالا و بسیار ارزشمند در نظر گرفت.

در این تحقیق از جدایه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس* استفاده شده است و ژن *ribC* به‌عنوان ژن مولد ریبوفلاوین جداسازی شده است. در تحقیق مشابه در سال ۱۹۹۳ توسط ریچر و همکاران انجام شد از باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* استفاده شده است و در آن تحقیق روی ژن *ribA* از این باکتری مطالعه صورت گرفته است ودر آن تحقیق مشخص شد که بیان زیاد ژن *ribA* در *باسیلوس سوبتی‌لیس* تولید ریبوفلاوین را به بیش از ۲۵ درصد افزایش می‌دهد و ژن *ribA* به‌عنوان ژن اصلی در تولید ریبوفلاوین معرفی شد ولی در تحقیق حاضر، ژن *ribC* به‌عنوان ژن اصلی تولید کننده ریبوفلاوین معرفی شد چون حضور این ژن باعث تولید ریبوفلاوین در *باسیلوس سوبتی‌لیس* شده بود (۳). در تحقیقی که توسط ریچر و همکارانش درسال ۱۹۹۳ انجام شد از باکتری *E.coli* استفاده شده است و در آن تحقیق روی ژن *ribA* از این باکتری مطالعه انجام شده است. ولی در این تحقیق از جدایه *باسیلوس سوبتی‌لیس* استفاده شده است و ژن *ribC* به‌عنوان ژن مولد ریبوفلاوین جداسازی گردید (۳). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۴ توسط بورگرس و همکاران انجام شده است از باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* استفاده شده بود و در آن تحقیق روی ژن *ribA* از ان باکتری مطالعه صورت گرفته بود و چنین گزارش شده که بیان بیش از حد ژن *ribA* در باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به‌تنهایی به افزایش تولید ریبوفلاوین منجر نخواهد شد و نیازمند دخالت ژن‌های دیگر هم است (۴). در این تحقیق از جدایه *باسیلوس سوبتی‌لیس* به‌عنوان باکتری مولد ریبوفلاوین استفاده شده است و فقط حضور ژن *ribC* به‌عنوان ژن مولد ریبوفلاوین بررسی شد. در تحقیق دیگری که در سال ۱۹۹۹ توسط سالوویوا و همکاران انجام شده است از باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* استفاده شده و روی ژن *ribR* از این باکتری مطالعه صورت گرفته بود و مشخص شد، ژن *ribR* ریبوفلاوین کیناز تک عملکردی را کد می‌کند که می‌تواند اثر موتاسیون ژن *ribC* را مهار کند، و محصولات ریبوفلاوین را بازیابی نماید. هم‌چنین در آن تحقیق مشخص شد موتاسیون ژن *ribC* می تواند تولید ریبوفلاوین را در جدایه‌های *باسیلوس سوبتی‌لیس* مهار کند (۱۵). در تحقیقی که توسط شالمی و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شد باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مولد ریبوفلاوین گزارش شد (۱۲). در حالی‌که در این تحقیق *باسیلوس سوبتی‌لیس* جداسازی شده از خاک به‌عنوان میکروارگانیسم مولد ریبوفلاوین معرفی شد. جداسازی *باسیلوس سوبتی‌لیس* از خاک به‌راحتی انجام می‌شود ولی جداسازی باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به آسانی باسیلوس‌ها انجام نمی‌شود و نیازمند انجام آزمون‌های افتراقی بیش‌تری است. بنابراین استفاده از *باسیلوس سوبتی‌لیس* به-عنوان میکروارگانیسم مولد ریبوفلاوین برای انجام کارهای تحقیقاتی در مورد ویتامین ریبوفلاوین راحت‌تر است. در تحقیقی که توسط بورگرس و همکاران در سال۲۰۰۶ انجام شد حضور ژن‌های دخیل در بیوسنتز ویتامین B_2 مانند *ribA*، *ribC*، *ribG* و *ribH* در *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با روش PCR مشخص شد (۴) در این تحقیق که روی *باسیلوس سوبتی‌لیس* انجام شد ژن *ribC* به‌عنوان مولد ریبوفلاوین به-وسیله PCR تعیین گردید. درتحقیق انجام شده توسط دل وار و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفته باکتری‌های لاکتیک

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

فاکتوری برای غنی‌سازی مواد غذایی از نظر منابع ریبوفلاوین معرفی شده‌اند به‌خصوص در آن تحقیق روی لبنیات و شیر سویا بررسی انجام گرفته است و برای تولید این محصولات غنی از ویتامین B_2 استفاده از باکتری‌ها پیشنهاد شده است (۵). در تحقیق دیگری که توسط گولباچ و همکاران درسال ۲۰۱۴ انجام شده است چنین گزارش شده که ریبوفلاوین فاکتور ضروری در نیازهای غذایی انسان و حیوانات محسوب می‌شود و در سال‌های اخیر تولید اقتصادی آن از طریق میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* و کپک *آشبایا گوسپی* و مخمر *کاندیدا فاماتا* انجام گرفته است (۸). در این تحقیق نیز باکتری *باسیلوس سوبتی‌لیس* استخراج شده از خاک منبع تولید این ویتامین معرفی شده است. *باسیلوس سوبتی‌لیس* به‌میزان زیادی در خاک وجود دارد و استخراج آن‌ها از خاک به‌راحتی انجام می‌شود و از سرعت رشد بالایی برخوردار است. بنابراین می‌توان به‌مقدار زیادی از این باکتری‌ها در زمان اندک دست یافت و استفاده از *باسیلوس سوبتی‌لیس* استخراج شده از خاک به‌عنوان منبع ریبوفلاوین برای انجام کارهای تحقیقاتی و مصارف صنعتی راحت‌تر و مقرون‌به صرفه است.

از مقایسه مطالعه حاضر با سایر تحقیقات، می‌توان به این نکته دست یافت که باکتری‌های ایزوله شده از خاک منابع توانمند و مناسبی برای تولیدات بیولوژیکی هستند (۲، ۶ و ۱۴). هم‌چنین *باسیلوس سوبتی‌لیس* جداسازی شده از خاک مناطق مختلف می‌تواند مولد ریبوفلاوین بوده و ژن *ribC* ژن تولیدکننده این ویتامین بوده و توانایی تولید ریبوفلاوین را داراست و این مهم یک دستاورد کاربردی در روند بهینه‌سازی صنعتی و کاربردهای بیوتکنولوژیکی می‌تواند در نظر گرفته شود. به‌طوری‌که با توجه به وجود انواع تولیدکنندگان ریبوفلاوین در خاک‌های مناطق مختلف می‌توان با در نظر گرفتن خصوصیات ژنتیکی دیگر باکتری‌های مولد ریبوفلاوین از روش‌های مهندسی ژنتیک در تلفیق خصوصیات ژنتیکی متفاوت استفاده شود تا ریبوفلاوینی تولید شود که دارای خصوصیات بارز دلخواه باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با استفاده از منابع مختلف خاک، نمونه‌های خاک خالص‌سازی شدند و طی غربال‌گری اولیه نمونه‌هایی از *باسیلوس سوبتی‌لیس* مولد ریبوفلاوین از انواع خاک‌های مناطق مختلف به‌دست آمد که نشان دهنده پتانسیل بالای باکتری‌های خاک در تولید ریبوفلاوین است. از این نتایج می‌توان در جهت مهندسی ژنتیک و کاربرد جدایه‌های بهینه‌سازی شده در صنعت استفاده نمود به این ترتیب در حالت اول می‌توان به‌طور مستقیم از این باکتری در جهت تولید ریبوفلاوین استفاده نمود و از این جدایه وحشی که قدرت برای تولید ریبوفلاوین از خود نشان می‌دهد بهره گرفت. هم‌چنین با ایجاد جدایه‌های جهش یافته و حذف ژنتیکی اپران‌های مهار کاتابولیکی تولید ریبوفلاوین، می‌توان آن‌ها را به یک تولیدکننده فوق‌العاده تبدیل نمود. در گام بعدی ژن‌های تولیدکننده ریبوفلاوین که از *باسیلوس سوبتی‌لیس*‌های گوناگون به‌دست آمده‌اند را می‌توان در باکتری‌هایی که خود تولیدکننده ریبوفلاوین نیستند اما مناسب برای کلون کردن ژن‌های خارجی هستند قرارداد تا باکتری‌گیرنده به‌عنوان کارخانه تولیدکننده ریبوفلاوین عمل کند و این ویتامین را هرچه بیش‌تر تولید نماید. هم‌چنین می‌توان با ایجاد جهش در تولیدکنندگان ریبوفلاوین تولید آن را افزایش داد که این عمل توسط بسیاری از مواد شیمیایی مانند EMS و نیز پرتوهای X و UV امکان‌پذیر است. علاوه‌بر این به‌منظور افزایش بیش‌تر تولید ریبوفلاوین می‌توان به پروتوپلاست فیوژن سویه‌های مولد ریبوفلاوین اشاره کرد و با تکنیک‌های مدرن جهت ارتقاء کیفیت ریبوفلاوین و نیز افزایش تولید ریبوفلاوین توسط تولیدکنندگان آن به کمک روش‌های پیشرفته پرداخت. در نهایت با خالص‌سازی ریبوفلاوین تولید شده که دارای ارزش کاربردی در صنایع مختلف است از باکتری‌های بومی کشور در جهت تولیدات صنعتی به‌صورت بهینه بهره‌مند شد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی و مدیریت و کارکنان آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری و تشکر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

منابع

1.Abdulkadir M, Waliyu S. Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics. European J. applied sciences. 2012; 4(5): 211-5.
2.Al-Thani RF, Abd-El-Haleem DA, Al-Shammri M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. African Journal of Microbiology Research. 2009; 3(11): 761-6.
3.Bacher A, Eberhardt S, Richter G. Cloning,Sequencing,Mapping and Hyperexpression of the *ribC* Gene Coding for Riboflavin Synthase of Escherichia coli. Journal FEBS. 1996; 224(3): 712-19.
4.Burgess CM, Smid EJ, Rutten G, Sinderen D. A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. Microbial Cell Factories. 2006; 5(1): 24.
5.del Valle MJ, Laiño JE, de Giori GS, LeBlanc JG. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. Food Research International. 2014; 62: 1015-19.
6.Deswal D, Khasa YP, Kuhad RC. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation. Bioresour Technol. 2011; 102(10): 6065–72.
7.Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. Science. 2012; 3(37): 60-98.
8.Golbach JL, Ricke SC, Bryan CA, Crandall PhG. Riboflavin in Nutrition, Food Processing, and Analysis - A Review. Journal of Food Research. 2014; 3(6): 23-35.
9.Maehashi K, Matano M, Saito M, Udaka S. Extracellular production of riboflavin-binding protein a potential bitter inhibitor by *Brevibacillus choshinensis*. Protein expression and purification. 2010; 71(1): 85-90.
10.Park EY, Zhang JH, Tajima S, Dwiarti L. Isolation of Ashbya gossypii mutant for an improved riboflavin production targeting for biorefinery technology. J. Applied Microbiology. 2007; 103(2): 468–76.
11.Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. American Journal of Clinical Nutrition. 2003; 77(6): 1352–60.
12.Schallmey M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canadian journal of microbiology. 2004; 50(1): 1-17.
13.Schimel JP, Holden PA. Identification of soil bacteria susceptible to TiO2 and ZnO nanoparticles. Appl. Environ. Microbiol. 2012; 78(18): 6749-58.
14.Schmidt TM, Breznak JA, Eichorst SA. Isolation and Characterization of Soil Bacteria That Define Terriglobus gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. Appl Environ. Microbiol. 2007; 73(8): 2708-17.
15.Solovieva IM, Kreneva RA, Leak DJ, Perumov DA. The ribR gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the Bacillus subtilis riboflavin operon. Microbiology. 1999; 145(1): 67–73.
16.Wrong OM, Edmonds CJ, Chadwich VS. The Large Intestine; its rolein mammalian nutrition and homeostasis, 1981,p;81-83.
17.Zabala-Dı´az IB, Froelich CA, Ricke SC. Adaptation of amethionine auxotroph Eschericha coli growth assay to microtiter platesfor quantitating methionine. Journal of Rapid Methods and Automationin Microbiology. 2003; 10(4): 217–29.
18.Zhou JP, Zou CS, Zhang KQ. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry. 2007; 39(10): 2562-75.
19.Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. International Journal of Food Microbiology. 2005; 98(2): 211–17.
20.Zyriax BC, Windler E. Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease—Areview. European Journal of Lipid Science and Technology. . 2000; 102(5): 355–65.

Archive of SID

www.SID.ir