مجله پیاورد سلامت
دوره ۱۸، شماره ۳، مرداد ۱۴۰۳، ۲۶۳-۲۵۳
مقاله پژوهشی

جداسازی مولکولی ژن *srf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به‌منظور استفاده در صنعت

مریم پورمهدی[۱]، نوشین خندان‌دزفولی[۲*]، کیومرث امینی[۳]

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۴/۱۶
پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۲۰

* نویسنده مسئول:
نوشین خندان‌دزفولی؛
واحد سیرجان دانشگاه آزاد اسلامی

Email:
khandan22@iau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: باسیلوس‌های ترموفیل، حامل ژن‌های مختلف و بیوسورفکتانت‌ها می‌باشد. سورفکتانت‌های میکروبی مولکول‌های فعال سطحی هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها قادر به کاهش انرژی سطحی بین فازها و ایجاد موانع الکترواستاتیکی هستند و در نتیجه از ادغام ذرات جلوگیری می‌کنند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، جداسازی مولکولی ژن *srf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به‌منظور استفاده درصنعت است.

روش بررسی: ۱۵ نمونه خاک مناطق مختلف کرمان جمع‌آوری و به‌منظور جداسازی سویه‌های *باسیلوس* غربال شدند. مطالعات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جهت شناسایی سویه‌ها انجام شد. پس از بررسی بیوشیمیایی جدایه‌های میکروبی جداسازی شده و تأیید سویه‌های باسیلوس، استخراج DNA صورت گرفت. سپس با روش PCR ژن *srf* از این جدایه‌ها شناسایی گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به داخل وکتور pTG19 وارد شد. سپس وکتور نوترکیب به باکتری *E.coli* سویه اوریگامی ترانسفورم و با استفاده از روش‌های رایج تأیید کلونینگ صورت گرفت. ژن خانگی 16S rRNA به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. بررسی میزان بیان ژن با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری *E.coli* فاقد ژن *srf* بود، انجام شد.

یافته‌ها: درمجموع، ۱۲ جدایه باسیلوس‌های *ترموفیل* از نمونه‌های خاک به دست آمد. در نتیجه‌ی واکنش PCR برای ژن *srf* با پرایمرهای طراحی شده ۱ جدایه(۸/۳٪) مثبت رویت شد. حضور ژن *srf* و بیان این ژن توسط آزمون Real time PCR بررسی شد. بررسی کلنی‌های سفید و آبی، پرایمر M13، محل اتصال و تعیین توالی ژن 16S rRNA تأییدکننده‌ی صحت کلونینگ ژن مذکور در باکتری میزبان بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر، موفق به شناسایی *باسیلوس* گرمادوست بومی حامل ژن *srf* بود که جهت دستیابی گسترده، راحت و مقرون به‌صرفه به آنزیم بیوسورفکتانت، جهت استفاده در مصارف صنعتی، کشاورزی، حذف آلاینده‌های نفتی و کاهش کشش سطحی محیطی می‌باشد که می‌توان از آن در صنایع مذکور بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، باسیلوس‌های ترموفیل، کلونینگ، *اشریشیاکلی*

۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲ استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۳ استاد گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

مقدمه

جنس *باسیلوس* باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و میله‌ای شکل هستند و بیش از ۳۰۰ گونه را شامل می‌شود که بسیاری از آن‌ها از نظر صنعتی مهم هستند(۱). اعضای جنس *باسیلوس* شامل باکتری‌های گرم مثبت، اسپورساز، میله‌ای شکل و هوازی است. گونه‌های *باسیلوس* از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی ناهمگن هستند. بسیاری از گونه‌های *باسیلوس* تولیدکنندگان معروفی برای ترکیبات ضدمیکروبی مختلف مانند باکتریوسین‌ها و لیپوپپتیدها به‌شمار می‌روند. ترکیبات ضدمیکروبی معروف سنتز شده توسط گونه‌های *باسیلوس* باکتریوسین‌ها یا مواد شبه باکتریوسین هستند(۲)

باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا پروتئین‌هایی با فعالیت ضدمیکروبی در برابر گونه‌های نزدیک تولیدکننده هستند. اما باکتریوسین‌ها از نظر خواصی مانند وزن مولکولی، اصلاح پس از تولید، خواص بیوشیمیایی، طیف ضدمیکروبی و نحوه‌ی عملکرد متفاوتند(۳). بیوسورفکتانت‌ها یا سورفکتانت‌های میکروبی مولکول‌های فعال سطحی هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. به‌دلیل ماهیت آمفی‌پاتیک، این بیومولکول‌ها کشش سطحی بین فاز آبی و مولکول‌های آب‌گریز را کاهش داده و در نتیجه حلالیت و فراهمی زیستی ترکیبات آلی آب‌گریز را افزایش می‌دهند(٤). در مقایسه با سورفکتانت‌های شیمیایی مصنوعی، بیوسورفکتانت‌ها به‌دلیل سطح بالای فعالیت، فعالیت خاص در دماهای شدید، pH و شوری، توانایی تولید از مواد اولیه تجدیدپذیر و درجه بالای تجزیه‌پذیری زیستی مورد توجه هستند(۵)

با این حال، بیوسورفکتانت‌ها به‌دلیل بازده تولید پایین و هزینه‌های بالای تصفیه هنوز به‌طور گسترده تجاری نشده‌اند. به‌منظور حل این مشکلات، مطالعات زیادی با استفاده از مواد اولیه کم‌هزینه یا محصولات جانبی کشاورزی به‌عنوان بستر تولید بیوسورفکتانت انجام شده است. منابع کربن کم‌هزینه که برای تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده شده‌اند، عبارتند از: لجن روغن پالم، فاضلاب کاساوا، ضایعات پالایشگاه روغن نباتی، ملاس و گلیسرول خام. استفاده از گلیسرول خام به‌عنوان ماده اولیه برای تولید مواد شیمیایی می‌تواند برای صنعت بیودیزل یک خروجی ارزش افزوده برای مقادیر زیادی محصول جانبی گلیسرول خام فراهم کند(٦).

یکی از کاربردهای احتمالی گلیسرول خام، استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیوسورفکتانت توسط باسیلوس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌هاست(۷). خانواده‌ی لیپوپپتیدهایی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، سورفاکتین‌ها هستند که ممکن است قوی‌ترین بیوسورفکتانت‌های شناخته بوده و حاوی هپتاپپتیدهای متصل به اسید چرب β- هیدروکسی با تعداد کربن در محدوده ۱۳ تا ۱۵ باشند(۷). علاوه بر این، با توجه به تولید بیوسورفکتانت، سویه‌های خاصی از گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس موجاوونسیس*، *باسیلوس سونورنسیس*، و *باسیلوس لیکنیفورمیس*، بیوسورفکتانت‌های لیپوپپتیدی حلقوی، سورفاکتین و لیکنیزین را تولید می‌کنند

از *باسیلوس سوبتیلیس* یک بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی شناخته شده به‌نام سورفاکتین تولید می‌شود که توسط چهار ناحیه چارچوب خواندن باز (ORFs) به‌نام‌های *srfA*، *srfB*، *srfC* و *srfD* کدگذاری می‌شود(۸). میکروارگانیسم‌های *ترموفیل* به‌دلیل اهمیت فراوان در صنعت و به‌دلیل توانایی آن‌ها برای عملکرد در شرایط محیطی سخت و شدید شناخته شده‌اند. هدف از مطالعه‌ی حاضر جداسازی مولکولی ژن *srf* از *باسیلوس*‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول باکتری مستعد(اوریگامی) به‌منظور استفاده در صنعت است.

روش بررسی

• نمونه‌برداری

در این تحقیق ۱۵ نمونه خاک از مناطق کویری در اطراف کرمان واقع در ایران جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری با رعایت شرایط آسپتیک از عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری لایه فوقانی خاک و از پنج مکان تصادفی در ظروف استریل ذخیره شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها برای انجام بررسی‌های بعدی در دمای ٤°C نگهداری شده و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی پاسارگاد تهران منتقل شدند. مشخصات، محل نمونه‌برداری و تاریخ آن بر روی ظروف حاوی نمونه‌ها یادداشت شد. برای آماده‌سازی ظروف مخصوص نمونه‌برداری به حجم ۰/۵ تا ۱ لیتر پس از اسیدشویی چندین‌بار با آب مقطر شسته و جهت استریل کامل در ۱۲۱°C اتوکلاو شدند.

• جداسازی جنس *باسیلوس ترموفیل*

جهت جداسازی باسیلوس‌های *ترموفیل* از تکنیک Heat enrichment culture یا پاستوریزاسیون استفاده شد(۹) و در ادامه برای خالص‌سازی آن‌ها از کشت به روش پورپلیت یا کخ استفاده شد(۱۰). نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به وسیله الکاستریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. یک گرم خاک الک شده به داخل لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ریخته و به آن ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس نمونه‌های سوسپانسیون خاک در بن ماری با درجه حرارت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

۸۰°C به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. به این ترتیب تنها باکتری‌های اسپوردار خاک باقی ماندند(شامل باسیلوس‌ها و *کلستریدیوم*ها). سپس ۹ رقت پشت سر هم(سریالی) تهیه شد و یک میلی‌لیتر از ۳ رقت آخر برداشته و در پلیت کانت آگار(محیط نوترینت آگار) به روش پورپلیت کشت داده شد، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند(۱۱)

• تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به جنس *باسیلوس* ترموفیل

جدول ۱: تست‌های بیوشیمیایی تفریقی مورد استفاده برای تشخیص جنس *باسیلوس* ترموفیل

ردیف	آزمایش	عملکرد باکتری باسیلوس
۱	رنگ‌آمیزی گرم	**Pos**
۲	متیل رد	**Pos**
۳	وگس پرسکوئر	**Pos**
٤	سیمون سیترات	**Pos**
٥	اکسیداز	**Neg**
٦	کاتالاز	**Pos**
۷	اندول	**Neg**
۸	اوره آز	**Neg**
۹	تریپل شوگر آیرون اگار	**Pos**
۱۰	احیای نیترات	**Neg**

تست‌های تکمیلی مطالعات بیوشیمیایی از جمله تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم و نیز تست‌های نیترات، هیدرولیز نشاسته و تأثیر صفرا بر باکتری جهت شناسایی جنس *باسیلوس ترموفیل* استفاده شد(جدول ۱). تست‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی *باسیلوس ترموفیل* در جدول یک، قابل مشاهده است.

• پرایمرها و انجام واکنش PCR

استخراج DNA از کلنی *باسیلوس* با استفاده از کیت تجاری شرکت پیشگامان(ایران) انجام شد. روی پرایمرها جایگاه شناسایی آنزیم‌های BamHI و EcoRI تعبیه شد. ژن *srf*، از طریق واکنش زنجیرهای پلیمراز PCR افزایش یافت.

جدول ۲: پرایمر استفاده شده(۱۲) جهت تشخیص ژن *srf*

ژن	توالی (5'→3')	اندازه نوکلئوتید bp
srf	Forward:5'- AGGCAAGCAAGCCTCTGGCG -3' Reverse:5'- CTTGTCCGCACAGGCACCGT -3'	۵۸۰

جهت ژن *srf*، براساس انتهای 5́ و 3́ توالی آن یک جفت پرایمر: Forward: 5' -AGGCAAGCAAGCCTCTGGCG -3' و Reverse: 5' -CTTGTCCGCACAGGCACCGT -3' طراحی و سنتز شد(جدول ۲).

جدول ۳: پرایمرهای 16S rRNA مورد استفاده در این پژوهش

پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	اندازه باند(bp)
16s-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	متغیر
16s-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	متغیر

به‌منظور انجام واکنش PCR حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بوده که شامل: ۱ میکرولیتر DNA باکتری(به‌عنوان الگو)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، بافر 1x PCR، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت Thermo Fisher Scientific- آمریکا)،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

مقدار مصرف آب دیونیزه به میزان نصف حجم هر واکنش بود. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب با ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه تنظیم شد. سپس محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و به‌عنوان جایگزین اتیدیوم بروماید از رنگ سایبرگرین برای رنگ‌آمیزی استفاده شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت محصول PCR با توالی یابی و کنترل مثبت در تست تأیید گردید.

- **کلون کردن ژن *srf***

به‌منظور کلونینگ سریع‌تر و مؤثرتر محصول PCR با استفاده از آنزیم 4TLigase DNA از روش TA-Cloning استفاده شد. در این روش از یک وکتور خطی به‌نام T-PTG19 که در انتهای ´3 آن باز تیمین قرار دارد، استفاده شد. محتوای واکنش به سلول پذیرای باکتری E.coli XL1blue انتقال یافت. برای کلون کردن محصول PCR، از کیت شرکت سیناکلون PCR TA-Cloning استفاده شد. وکتور T-PTG19 به‌عنوان ناقل، BamH1 به‌عنوان آنزیم محدودگر و سویه E.coli XL1blue به‌عنوان میزبان استفاده شد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی‌سیلین و شناسایی باکتری‌های نوترکیب توسط غربالگری سفید–آبی در محیط IPTG-XGAL انجام شد. تأیید حضور ژن *srf* درون کلونی‌های سفید توسط انجام PCR مشاهده شد و با پرایمرهای M13 که داخل باکتری بوده ردیابی شد و سپس تعیین توالی ناحیه مذکور(محل حضور ژن *srf*) و همچنین مقایسه‌ی طول محصولات PCR قبل و بعد از انجام فرایند کلونینگ انجام شد.

- **تعیین میزان بیان ژن *srf* در باکتری‌های نوترکیب حاصل با روش Real Time PCR**

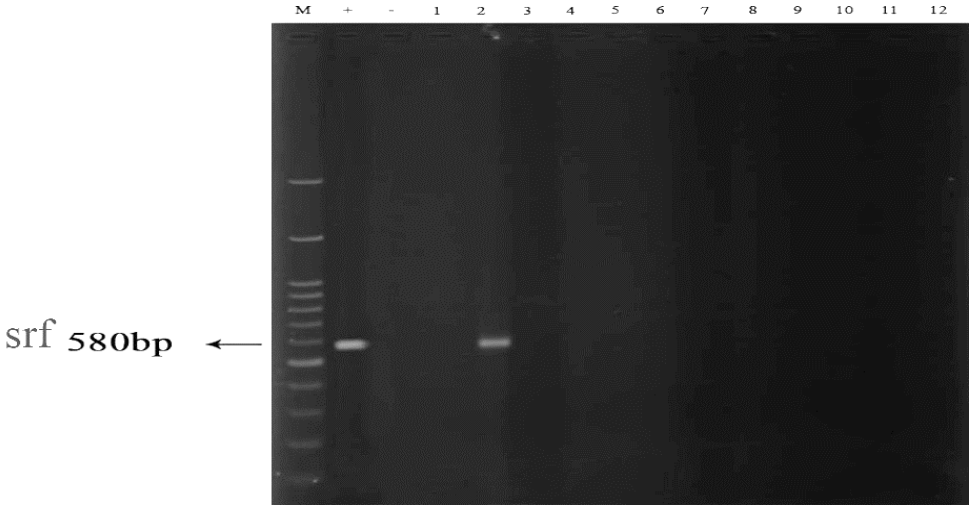
به‌منظور تأیید کارایی فرایند کلونینگ، لازم است که بیان ژن کلون‌شده در کلونی‌های حاصل ارزیابی گردد. بدین منظور استخراج RNA توسط میکروکیت RNeasy (خریداری‌شده از شرکت سیناکلون) از سوسپانسیون باکتریایی کلونی‌های سفید در فاز نمایی رشد انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase و واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره‌جنوبی به انجام رسید. ژن خانگی *16sr* به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری *E.coli* فاقد ژن *srf* بود، انجام شد.

- **رسم درخت فیلوژنی**

با استفاده از پرایمرهای ارایه‌شده PCR ژن‌های 16S rRNA انجام و تعیین توالی در شرکت Bioneer کره‌جنوبی انجام شد. توالی‌های حاصل پس از بررسی در نرم‌افزار BioEdit، توسط DNA Baser مکمل‌سازی شد. نتیجه با جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI از طریق N Blast مقایسه و سپس در نرم‌افزار W Clustal هم‌ردیف شد.

یافته‌ها

واکنش PCR برای بررسی فراوانی ژن *srf* با پرایمر اختصاصی انجام و نتایج واکنش PCR برای حضور ژن *srf* (580 bp) مثبت بود(شکل ۱).

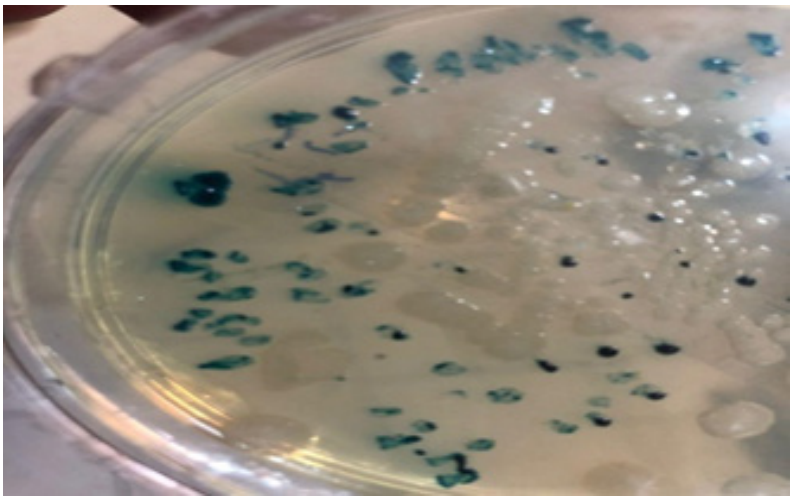


شکل ۱: نتیجه بررسی فراوانی ژن *srf* با آزمون PCR با استفاده از یک جفت پرایمر *srf*، 580 bp

ستون‌ها به‌ترتیب از چپ به راست: M مارکر(با فاصله ۱۰۰ نوکلئوتید)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۱ تا ۱۲.

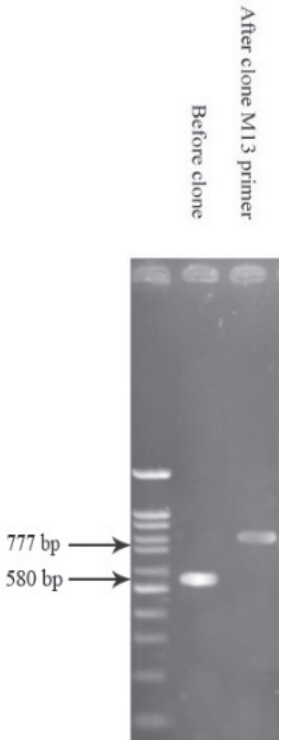
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

پس از کلون کردن سویه حامل ژن *srf* توسط کلنی سلکشن(آبی/ سفید) سویه‌های کلون‌شده جداسازی شدند. حضور کلنی‌های سفید و آبی در شکل ۲، نشان داده شده است که موید وجود کلنی‌های نوترکیب در محیط کشت IPTG-Xgal است.



شکل ۲: کلونی‌های سفید و آبی حاصل از نتیجه کلون‌سازی ژن *srf*

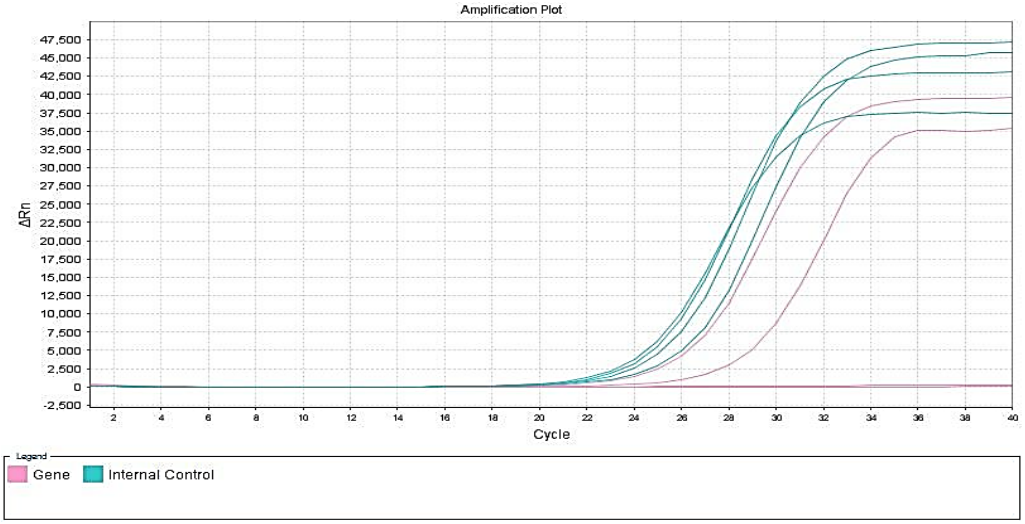
در نتیجه، تشکیل کلنی‌های سفید نشان‌دهنده‌ی این است که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. به‌علاوه چون محیط دارای آمپی‌سیلین می‌باشد، کلنی‌هایی که می‌توانند در محیط رشد کنند نشان‌دهنده‌ی دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است.



شکل ۳: تأیید کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای M13 بر روی کلون‌های نوترکیب و غیرنوترکیب و تأیید وجود قطعه insert درون وکتور نوترکیب(ژل آگاروز ۲٪)

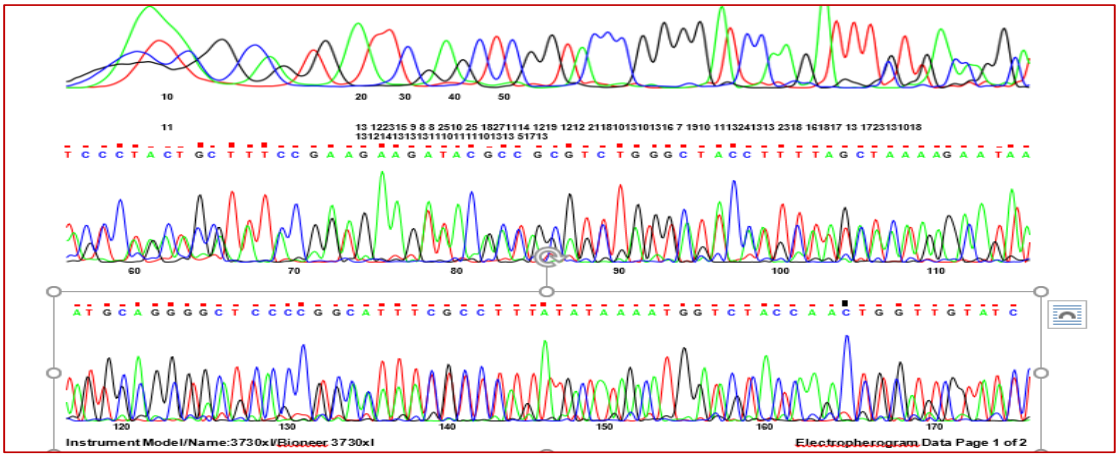
به‌منظور تأیید نتایج کلون، DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج شد و با پرایمر M13 توسط آزمون PCR (شکل ۳) نشان‌دهنده‌ی باند (777 bp) بود. در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن *srf* به باکتری E.coli XL1blue تأیید شد همچنین منحنی سنتز Real Time PCR نیز در(شکل ٤) ارایه شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

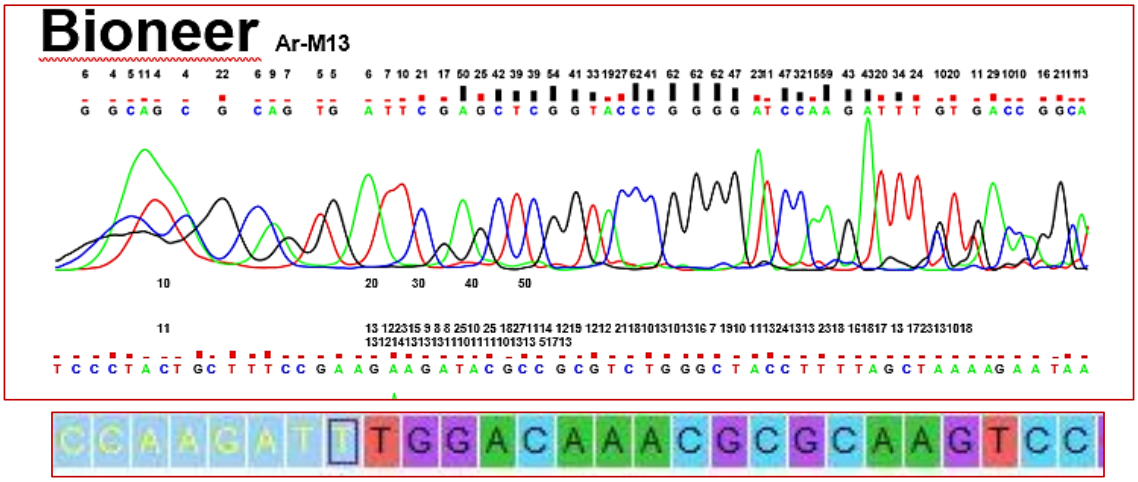


شکل ۴: منحنی تکثیر ژن *srf* توسط Real time PCR

همان‌طورکه در شکل ٤ مشخص است، میزان بیان ژن *srf* در دو منحنی ایجادشده توسط *E.coli* اولیه (آبی) و *E.coli* به‌کاررفته در کلونینگ ژن *srf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری نشان می‌دهد. باتوجه به انتقالی‌بودن ژن و غیربیانی بودن وکتور از روش ریلتایم کیفی استفاده شده و فقط جهت تأیید صحت کلونینگ کاربرد دارد و به پیوست داده‌های ژن موردنظر در ژن نوترکیب گزارش شده است. نتایج ΔCT در صورت تیمار و بیان ژن موردنظر در خصوص پارامتر خاص نشان داده می‌شود.



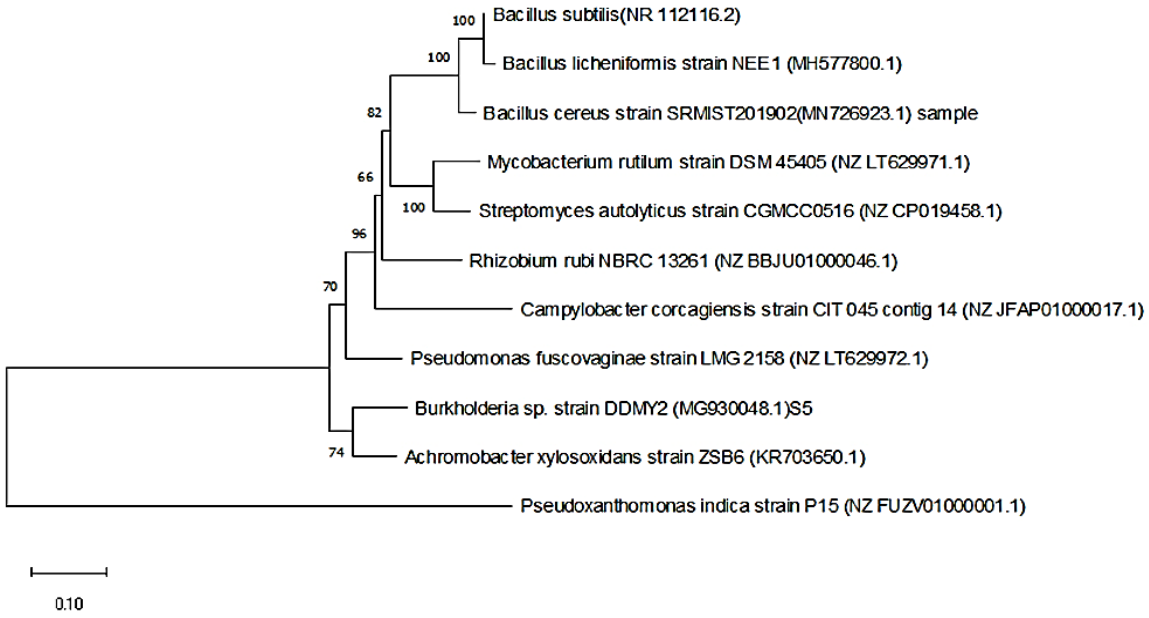
شکل ۵: نتیجه DNA سکانسینگ برای نامیه ژنی 16S rRNA



شکل ۶: ممل ایجاد اتصال و سکانس مربوط به آن

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

به‌طوری‌که در نمودار آبی هیچ بیانی از ژن *srf* قابل مشاهده نیست و در مقابل در نمودار صورتی رنگ باکتری نوترکیب حاصل، میزان چشم‌گیری از پروتئین *srf* را تولید کرده است. نتیجه‌ی تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA با استفاده از تعیین توالی برای شناسایی جنس *باسیلوس ترموفیل* تأیید شد(شکل ۵و٦). با استفاده از برنامه‌ی MEGA5 درخت‌های فیلوژنیک ترسیم شدند(شکل ۵).



شکل ۷: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA

روابط فیلوژنتیکی بین گونه *باسیلوس سرئوس* با استفاده از ژن 16S rRNA بررسی گردید. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می‌دهد که گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* با بوت استرپ ۱۰۰٪ با *باسیلوس سرئوس* در یک کلاد(خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه‌ی خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم بود(شکل ۷).

بحث

باسیلوس‌های گرم مثبت بسیار مهم با کاربرد بیوتکنولوژیکی ارزشمند است که به‌طور گسترده برای تولید بیش از حد پروتئین‌های مرتبط صنعتی و دارویی استفاده شده است. انواع مختلفی از سیستم‌های بیانی از نظر انواع الگوهای رونویسی وجود دارد که در میان آن‌ها، محرک‌های القایی خودکار و وابسته به فاز رشد به‌دلیل ویژگی مستقل از القا، مورد توجه فزاینده‌ای قرار می‌گیرند و امکان افزایش مقیاس صنعتی را فراهم می‌کنند. برای گسترش کاربرد سیستم بیان خودکار القایی، یک سیستم بیان خودکار تنظیمی جدید همراه با تراکم سلولی در *باسیلوس سوبتیلیس* با استفاده از پروموتور *srfA* مربوط به سنجش حد نصاب (*PsrfA*) ساخته و توسعه داده شد.

در راستای مطالعه‌ی حاضر و همسو با آن، در پژوهش Naeem و همکاران(۲۰۱۷) به جداسازی و خصوصیات مولکولی تنوع باکتریایی تولیدکننده‌ی بیوسورفکتانت میدان نفتی فیمکاسار، پاکستان پرداختند. مکان‌های آلوده به نفت به‌طور بالقوه میزبان میکروارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی بیوسورفکتانت هستند(۱۳).

SrfA و *rhlB* به‌ترتیب مسئول تولید بیوسورفکتانت سورفاکتین و رامنولیپید هستند. در مجموع، ۳۸ جدایه از ۷۹ جدایه مختلف باکتریایی که روی محیط‌های حاوی نفت خام رشد می‌کردند، برای تولید بیوسورفکتانت غربالگری شدند. بدیهی است که ۳٤/۲٪ (n=۱۳) از جدایه‌ها ژن *srfA* را به ارث می‌برند، در حالی‌که ۱۵/۸٪ (n=٦) از جدایه‌ها حاوی ژن *rhlB* بودند. بیشترین تولید از نظر فعالیت‌های بیوسورفکتانت توسط سویه SWW1 *باسیلوس* سوبتیلیس نشان داده شد. ماهیت سورفاکتین بیوسورفکتانت تولید شده توسط کروماتوگرافی لایه نازک و طیف سنجی مادون قرمز تأیید شد(۱۳).

در مطالعه‌ی Richard-Greenblatt و همکاران(۲۰۲۲)، به‌منظور ارزیابی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

تولید سورفکتین از باکتری، شناسایی ژن تولیدکننده‌ی آن (*srf*) و تعیین مقدار سورفکتین تولیدشده به‌ترتیب از روش‌های متلاشی شدن قطره (Drop collapse)، روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(۱۴) و در مطالعه‌ی کشاورزی و همکاران(۲۰۱۸)، آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی نشان داد که گونه *باسیلوس* دارای ژن *srf* بود(۱۵). مطالعه‌ی فوق به ارزیابی تولید *سورفاکتانت* میکروبی پرداخته است که با مطالعه‌ی حاضر همسوست.

در مطالعه‌ی Swaathy و همکاران(۲۰۱۴) به بررسی و ارزیابی تنوع گونه‌های *باسیلوس* دریایی و تولید بیوسورفکتانت پرداختند. از میان ۲۰۰ گونه‌ی غربال‌شده، پنج گونه‌ی باکتریایی بالقوه تولیدکننده‌ی بیوسورفکتانت با مورفولوژی کاملاً متفاوت انتخاب شدند. تجزیه‌وتحلیل توالی ژن بیوشیمیایی و 16S rRNA نشان داد که تمام پنج گونه‌ی مذکور متعلق به جنس *باسیلوس* بودند. بیان ژن *srf* در هر پنج گونه مشاهده شد(۱۶). در نتایج فیلوژنتیکی این پژوهش که به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* با بوت استرپ ۱۰۰٪ با *باسیلوس سرئوس* در یک کلاد(خوشه) قرار دارد و میزان بیان ژن *srf* در دو منحنی ایجادشده توسط *E.coli* اوریگامی به‌کاررفته در کلونینگ ژن *srf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهد. بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های دوگانه دوست منحصر به فردی هستند که کاربرد وسیعی در حذف آلودگی‌های آلی و فلزی محیط زیست دارند. در میان باکتری‌های زیست مهارگر، باکتری *باسیلوس سرئوس* در تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی مطرح می‌باشد که از این میان، بیوسورفکتانت‌ها از جمله سورفکتین از اهمیت ویژه‌ای برخورد است(۱۸و۱۷).

همچنین نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی انجام‌شده در مطالعه‌ی حاضر قادر است، تعدادی از خویشاوندان نزدیک باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* را به‌عنوان کاندیدای مطالعات بعدی و نیز منبعی از ژن *srf* مورد بحث، معرفی نماید. با انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر سویه‌های تولیدکننده‌ی سورفکتانت و نیز به‌کار بردن میزبان‌های کلونینگ پرتوان‌تر، می‌توان تحقیق انجام‌شده در مطالعه‌ی حاضر را تکمیل کرد و نقاط ضعف آن را که ممکن است در انتخاب میزبان یا سویه تولیدکننده‌ی سورفکتانت و یا روش کلونینگ به‌کار رفته باشد، جبران کرد. همچنین لازم است که در مطالعات آینده، پروتئین SRF تولیدشده به روش کلونینگ، ارزیابی ساختاری و عملکردی گردد. عوامل محدودیت، مجموعه عواملی هستند که در اختیار پژوهشگر نیستند اما در یافته‌ها و دستاوردهای پژوهشی تأثیرگذار هستند. از عمده‌ترین ارکان تحقیق و پژوهش دسترسی به آمار و اطلاعات است که جزیی از محدودیت‌ها هستند. محدودیت در اثربخشی، یکی دیگر از محدودیت‌های موجود است. از موارد مهم که در محدودیت‌ها می‌تواند مطرح شود، نقاط ضعف و قوت ابزارهای آزمایشگاه در پژوهش است. نوآوری در پژوه ممکن است یکی از محدودیت‌های پژوهش در چنین مواردی باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر جداسازی مولکولی ژن *srf* از باسیلوس‌های خاک‌زی گرمادوست و کلونینگ آن در سلول مستعد به‌منظور استفاده در صنعت بود. در نتایج فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* با بوت استرپ ۱۰۰٪ با *باسیلوس سرئوس* در یک کلاد(خوشه) قرار دارد و میزان بیان ژن *srf* در دو منحنی ایجادشده توسط *E.coli* اوریگامی به‌کاررفته در کلونینگ ژن *srf* (صورتی)، تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

بیوسورفکتانت‌ها، سورفکتانت‌هایی با منشا زیستی هستند که از نظر ساختاری متنوع بوده و بسته به نوع بیوسورفکتانت نقش‌های متفاوتی در طی چرخه زندگی ارگانیسم ایفا می‌کنند. با توجه به سمیت کمتر و همچنین منحصر به فرد بودن این مولکول‌ها نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی ارجحیت دارند. در این پژوهش، ژن *srf* از *باسیلوس ترموفیل* جداسازی شد و با موفقیت به باکتری *E.coli* منتقل شد تا بیوسورفکتانت با توان بالاتر و صرفه‌ی اقتصادی بیشتر در *E.coli* به‌صورت نوترکیب تولید شود که کلونینگ آن به‌وسیله باکتری اشرشیاکلی اوراگامی برای دستیابی به اهداف صنعتی موفقیت‌آمیز بود. همچنین بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه‌های جدید تولیدکننده‌ی ژن *srf* می‌تواند منجر به پیدا کردن منابع بیشتر گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد می‌باشد و نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.IAU.KERMAN.REC.1401.076 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان تقدیر و تشکر نمایند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

References

1. Mikulik K, Melcova M & Zidkova J. Antibacterial peptides from thermophilic bacteria. International Journal of Engineering Research and Science (IJOER) 2017; 3(5): 46-57.

2. Toth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. Candida parapsilosis: From genes to the bedside. Clinical Microbiology Reviews 2019; 32(2): e00111-18.

3. Shivlata L & Satyanarayana T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. Frontiers in Microbiology 2015; 6(1): 1014.

4. Soberon-Chavez G. Biosurfactants: From genes to applications. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2011: 79-83.

5. Gaur VK & Manickam N. Microbial biosurfactants: Production and applications in circular bioeconomy. Biomass, biofuels, biochemicals, circular bioeconomy - current status and future outlook. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2021: 353-78.

6. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology 2010; 87(2): 427-44.

7. Campos JM, Montenegro-Stamford TL, Sarubbo LA, De-Luna JM, Rufino RD & Banat IM. Microbial biosurfactants as additives for food industries. Biotechnology Progress 2013; 29(5): 1097-108.

8. Das P, Mukherjee S & Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2008; 25(1): 165-85.

9. Ovando-Chacon SL, Tacias-Pascacio VG, Ovando-Chacon GE, Rosales-Quintero A, Rodriguez-Leon A, Ruiz-Valdiviezo VM, et al. Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of El Chichon volcano Crater Lake. Water 2020; 12(8): 2172.

10. Eze U, Okonji R, Ibraheem O & Shonukan O. Isolation and characterization of a bacterial thermostable protease from poultry dung. Ife Journal of Science 2011; 13(2): 289-97.

11. Alipour-Asadabadi Z, Malekian M, Soleimani M & Mirdamadian H. Isolation and molecular identification of hydrocarbon-degrading bacteria from soil around Tabriz refinery. Quarterly Scientific-Research Environmental Sciences 2017; 15(2): 129-40[Article in Persian].

12. Plaza G, Chojniak J, Rudnicka K, Paraszkiewicz K & Bernat P. Detection of biosurfactants in Bacillus species: Genes and products identification. Journal of Applied Microbiology 2015; 119(4): 1023-34.

13. Naeem AH, Mumtaz S, Haleem A, Qazi MA, Malik ZA, Dasti JI, et al. Isolation and molecular characterization of biosurfactant-producing bacterial diversity of Fimkassar oil field, Pakistan. Arabian Journal for Science and Engineering 2017; 42(6): 2349-59.

14. Richard-Greenblatt M, Wang R, Worrall A, Blumberg E, Liu P, Doyon J, et al. Answer to march 2022 photo quiz. Journal of Clinical Microbiology 2022; 60(3): e0098021.

15. Keshavarzi S, Ahmadzadeh M, Mirzaei S, Behboudi K & Bandehpour M. Enhancing surfactant production in Bacillus subtilis UTB96 by fermentation optimization. Journal of BioControl in Plant Protection 2018; 5(2): 13-26[Article in Persian].

16. Swaathy S, Kavitha V, Sahaya-Pravin A, Sekaran G, Mandal AB & Gnanamani A. Phylogenetic framework and biosurfactant gene expression analysis of marine, bacillus spp. of eastern coastal plain of tamil nadu. International International Journal of Bacteriology 2014; 2014(1): 860491.

17. Guan C, Cui W, Cheng J, Zhou L, Guo J, Hu X, et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in Bacillus subtilis. Microbial Cell Factories 2015; 14(1): 150.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

18. Malaki MS, Rouhi L & Khashei-Varnamkhasti Kh. Apoptotic induction in human colorectal adenocarcinoma cell line and growth inhibition of some gastrointestinal pathogenic species by lactobacillus sakei metabolites. Journal of Payavard Salamat 2021; 14(6): 476-83[Article in Persian].

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

Journal of Payavard Salamat
Vol. 18, No. 3, Aug 2024

The Molecular Isolation of the *srf* Gene from Thermophilic Soil Bacilli and Its Cloning in Susceptible Cells for Industry Use

Maryam Pourmehdi[1] (M.S.), Nooshin Khandan Dezfully[2]* (Ph.D.), Kumarss Amini[3] (Ph.D.)

1 Master of Science in Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
2 Assistant Professor, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
3 Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Received: 7 Jul. 2023
Accepted: 10 Sep. 2024

Background and Aim: Thermophilic bacillus is a type of thermophilic bacillus, carries various genes and biosurfactants, microbial surfactants are surface active molecules produced by various microorganisms such as bacteria, yeasts and filamentous fungi. Biosurfactants are able to reduce the surface energy between phases and create electrostatic barriers, thus preventing the integration of particles. The aim of the present study was the molecular isolation of the *srf* gene from thermophilic soil bacilli and its cloning in susceptible cells for industry use.

Materials and Methods: Fifteen samples from different regions of Kerman were collected and screened to isolate Bacillus strains. Morphological and biochemical studies were done to identify the strains. After biochemical examination of isolated microbial isolates and confirmation of Bacillus strains, DNA extraction was done. Then, the *srf* gene was identified by PCR method from these isolates. The amplified fragment was inserted into pTG19 vector by TA cloning method. Then, the recombinant vector was transformed into *E.coli* origami bacteria and cloning was confirmed using common methods. The housekeeping gene 16S rRNA was used as the internal control of the test. The analysis of the gene expression level was performed by measuring the relative expression of mRNA as compared to the negative control that *E.coli* bacteria lacked the *srf* gene.

Results: A total of 12 isolates of thermophilic bacilli were obtained from soil samples. As result, the PCR reaction for the *srf* gene with the designed primers was found to be positive in 1 isolate (8.3%). The presence of *srf* gene and the expression of this gene were checked by real time PCR test. Examining the white and blue colonies, M13 primer, junction location and determination of the 16S rRNA gene sequence confirmed the correctness of the cloning of the mentioned gene in the host bacteria.

Conclusion: As a result of the present study, it was possible to identify the native thermophilic bacillus carrying the *srf* gene, which can be used to obtain biosurfactant enzyme widely, conveniently and economically, for use in industrial and agricultural purposes, removing oil pollutants and reducing environmental surface tension, etc. which can be advantages.

Keywords: Biosurfactant, Bacillus, Thermophile, Cloning, *E.coli*

*** Corresponding Author:**
Khandan Dezfully N
Email:
khandan22@iau.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-03-10]

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