

## جداسازی و شناسایی باکتری مولد ریپوفلاوین از خاک مناطق مختلف ایران

الهام سیاسی\*، فرزانه حسینی، حلیمه بابایی

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

### چکیده

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

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

**واژه‌های کلیدی:** ریپوفلاوین، 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 B اهمیت بالایی در حفظ انرژی بدن دارند اما این ویتامین در بدن ذخیره نمی‌شود و تأمین آن از طریق مواد غذایی ضروری

### 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

است. ریپوفلاوین یا ویتامین B2 یک ضرورت در رژیم غذایی برای انسان است که، بر خلاف بسیاری از گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها، قادر به سنتز ویتامین نیستند (۱۷، ۱۹). 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 و ۱/۱ میلی‌گرم در روز برای زنان است. در رژیم‌های غذایی غربی مصرف شیر و فرآورده‌های لبنی به‌طور عمده به جذب روزانه ریپوفلاوین 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 ریپوفلاوین است به‌همان اندازه از ویتامین به‌علت پردازش از دست می‌رود. به هرحال، روش‌های غنی سازی، نان‌ها و فرآورده‌های غله ای را به‌عنوان منابع خوبی از ریپوفلاوین تبدیل می‌کند. این ویتامین

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 متابولیسی، ریبوفلاوین پیش ماده فلاوین نوکلئوتید (FMN) و فلاوین آدنین نوکلئوتید (FAD) است، که هردو به-عنوان 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 فلاووپروتئین‌ها می‌توان به ضروری بودن در متابولیسم آمینواسیدها، تولید انرژی و فعال‌سازی فولات در اشکال 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<sub>2</sub> 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 ۳ و ۴-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 فلاویناز / 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 می‌پذیرد. 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 اسکومیس‌ها. 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 گوسیپی*، *کاندیدا فاماتو* و *باسیلوس سوبتیلیس* هستند که سطوح تولید ریبوفلاوین در آن‌ها به- ترتیب ۲۰،۱۵ و ۱۴ گرم بر لیتر است (۱۰، ۱۲). در *آسپرژیلوس گوسیپی* تولید ریبوفلاوین توسط مهندسی متابولیسم تا ۱۰ برابر افزایش یافته است (۱۰، ۱۲). هم‌چنین *آسپرژیلوس گوسیپی* از میکروارگانیسم‌هایی است که تولید ریبوفلاوین را از ضایعات نفتی انجام می‌دهد (۱۰). در مورد *باسیلوس سوبتیلیس* سطوح بالای تولید ریبوفلاوین در حالی

حاوی نمونه‌ها یادداشت شد. ظروف مخصوص نمونه‌برداری به حجم ۰/۵ لیتری ۱ لیتر پس از اسیدشویی چندین بار با آب مقطر شسته و جهت استریل کامل در  $121^{\circ}\text{C}$  اتوکلاو شدند.

**۲- کشت و جداسازی باسیلوس‌ها** - جهت جداسازی جنس باسیلوس‌ها 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 به وسیله الک استریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. ۱ گرم خاک الک شده را به داخل لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار 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  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت 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 دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت 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-طور کلی 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.

صورت می‌پذیرد که در معرض شبه پورین‌ها و آنالوگ سمی ریپوفلاوین (روزئوفلاوین) قرار گرفته یا از طریق مهندسی ژنتیک انجام می‌گیرد (۱۰). در لاکتوباسیلوس لاکتیس از هر دو روش ذکر شده تولید ریپوفلاوین با موفقیت انجام شده است و چنین گزارش شده که ریپوفلاوین تولید شده توسط این سویه‌ها می‌تواند کمبود القا شده ریپوفلاوین 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 میکروارگانیسم‌های 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، اکتینومیسیت‌ها و سیانوباکتری‌ها هستند (۱۳). بنابراین در این تحقیق به‌منظور جداسازی باکتری باسیلوس سویتی‌لیس از خاک مناطق مختلف ایران به‌عنوان جدایه مؤثر در تولید ویتامین ریپوفلاوین و بررسی حضور ژن *ribC* در این جدایه‌های جداسازی شده که با تولید ریپوفلاوین 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  $4^{\circ}\text{C}$  جهت آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. مشخصات، محل نمونه‌برداری و تاریخ آن بر روی ظروف

BHI broth حاوی باکتری با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ °C سانتیفریوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب حاصل ۲ بار با محلول نرمال سالین ۸/۵٪ شستشو داده شد. به این صورت که ابتدا ۱۰ میلی لیتر سرم نرمال سالین را در لوله حاوی رسوب ریخته، سپس با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ °C سانتیفریوژ گردید. دو بار این مرحله تکرار شد. پس از شستشو، ایزوله‌ها در محیط کشت حاوی ریپوفلاوین ۲٪ کشت داده شدند. برای این منظور از محیط MRS Agar استفاده گردید و ۲٪ ویتامین ریپوفلاوین به محیط اضافه گردید. پس از خنک شدن محیط کشت ایزوله‌های تفکیک شده را در محیط حاوی ریپوفلاوین ۲٪ کشت داده شدند و در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. بعد از رشد این باکتری‌ها شستشوی سوسپانسیون انجام گرفت. این بار باکتری‌ها در محیط حاوی MRS Agar بدون ریپوفلاوین کشت داده شدند. جدایه‌هایی که در محیط فاقد ریپوفلاوین رشد نکردند از سایرین جداسازی شدند. از جدایه‌هایی از *باسیلوس سوبتیلیس* که در محیط دارای ریپوفلاوین رشد داشتند، کشت خالص تهیه نموده و روی نوترین آگار در ۳۷ °C در شرایط هوای کشت داده شدند (این سویه‌ها به‌عنوان کاندید برای دارا بودن توانایی سنتز ریپوفلاوین انتخاب شدند). سپس این جدایه‌های خالص شده، برای شناسایی ژن دخیل در سنتز ریپوفلاوین (حضور ژن *rib C*) با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی شدند.

#### 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 Agar، آزمایش کاتالاز با معرف H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، آزمون ژلاتین در محیط ژلاتیناز، آزمون تریپل‌شوگر ایرون آگار در محیط

TSI، آزمون IMViC در محیط‌های SIM و MRVP و سیمون سترات، آزمون احیای نترات در محیط نترات برات،

آزمون هیدرولیز لیپید در محیط تری بوتترین آگار، آزمون اوره از در محیط اوره، آزمون کازین در محیط Skim Milk Agar،

آزمون لیستیناز در محیط لیستین، 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، گزبلوز، آراینوز و مانیتول انجام گرفت.

#### ۵- جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* مولد

#### ریپوفلاوین با کشت نمونه‌ها در محیط کشت

ریپوفلاوین ۲٪ - نمونه‌هایی که دارای نتایج مثبت در

آزمون‌های هیدرولز نشاسته در محیط Starch Agar،

هیدرولیز ژلاتین در محیط ژلاتیناز و هیدرولیز چربی در محیط تری بوتترین آگار و احیای نترات در محیط نترات برات

هستند جداسازی شدند. سپس این جدایه‌ها تفکیک شده و پس از شستشو در محیط کشت ریپوفلاوین 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

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

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

## ۶- استخراج ژنوم - برای استخراج ژنوم از باسیلوس

سوبیتی/یس‌های خالص‌سازی شده در محیط ریپوفلاوین، 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 سوبیتی/یس، واکنش PCR انجام شد. مشخصات پرایمرها، مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه PCR به‌ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمر برای تکثیر ژن *rib C*.

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر 5'-3'	اندازه محصول
<i>rib C</i>	F- GACGGCGTTCATCTCGGGCATC R- GAAACCCGATGGTCCGCCTC	543bp

جدول ۳- برنامه دستگاه PCR برای تکثیر ژن *rib C*

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

## 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.

## 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 IX 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 سوبیتی/یس مولد ریپوفلاوین جداسازی شد.

#### ۴- نتایج حاصل از رنگ آمیزی اسپور به روش

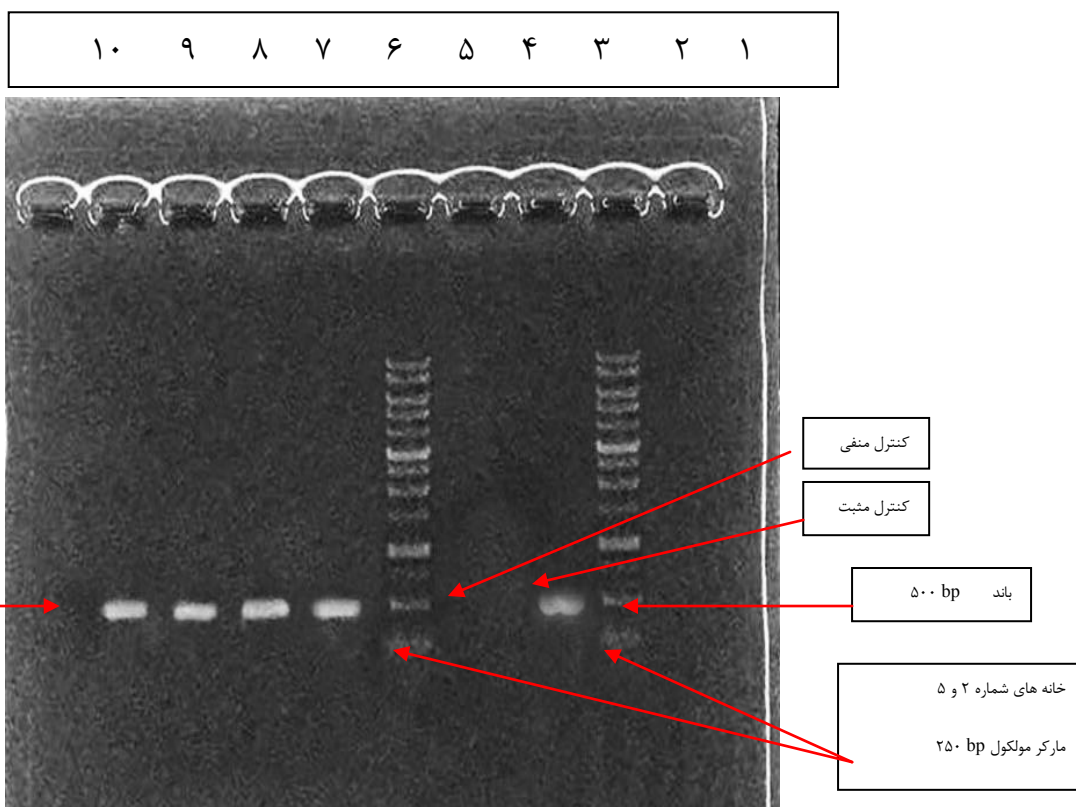
مالاشیت گرین- با این روش رنگ آمیزی وجود اسپوره های سبز درون سلول های رویشی با رنگ قرمز- صورتی مشاهده شد.

#### ۵- نتایج رشد جدایه های باسیلوس در محیط های

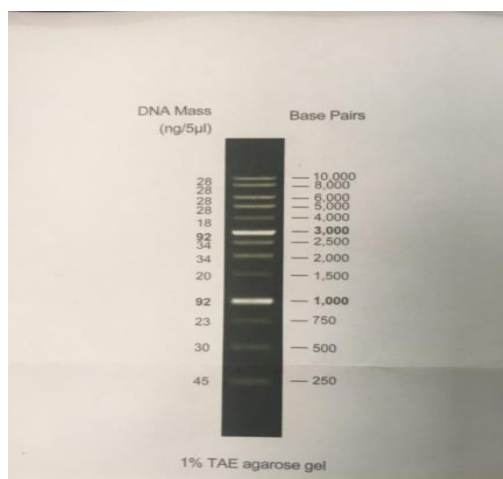
افتراقی- جهت تأیید شناسایی جدایه های باسیلوس سویتی- لیس جداسازی شده، از آزمون های افتراقی استفاده شد. نتایج آزمون های افتراقی در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴- نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای تشخیص باسیلوس سویتی لیس.

بakteri	آزمون کاتالاز	آزمون هیدرولیز	هیدرولیز لیپید	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز ژلاتین	آزمون اوره از	آزمون سیترات	MR	VP
محیط کشت	معرف H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	بلاد آگار	تری بوتیرین آگار	Starch Agar	ژلاتیناز	اوره	سیمون سیترات	MRVP	MRVP
باسیلوس سویتی لیس	+	همولیز الفا	+	+	+	-	+	+	-
بakteri	آزمون اندول	تخمیر گلوکز	تخمیر مانیتول	تخمیر ارابینوز	تخمیر گزیلوز	آزمون لیستیناز	احیای نیترات	آزمون تریپل ابرون آگار	هضم کارژین
محیط کشت	STM	دارای قند گلوکز	دارای قند مانیتول	دارای قند ارابینوز	دارای قند گزیلوز	لیسیتین	نیترات براث	TSI	Skim Milk Agar
باسیلوس سویتی لیس	---+	+	+	+	+	+	+	Alk/A g	+



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *ribC* در باسیلوس سویتی لیس- 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: نمونه های دارای ژن *ribC* با طول *bp* ۵۴۳.



شکل ۲ - مارکر مولکولی 250 bp - DNA Ladder(8201) (مارک متابیون تهیه شده از شرکت روبین طب گستر)

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 به کار رفت. باندهای حاصل از تکثیر ژن *ribC* با واکنش PCR در شکل ۱ آورده شده است.

### بحث

ریبوفلاوین یا ویتامین B<sub>2</sub> 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. از جمله این میکروارگانیسرها *باسیلوس سوبتیلیس* است که در خاکهای مناطق مختلف یافت می شود و توانایی تولید ویتامین ریبوفلاوین را دارند که به این ترتیب از باکتریهای مولد ریبوفلاوین برای غنی سازی نانها و فرآورده های غله ای به عنوان منابع خوبی از ریبوفلاوین استفاده می شوند (۱۱، ۱۲).

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

### ۶- بررسی کشت در محیط کشت فاقد

**ریبوفلاوین ۰.۲٪** - جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس* که پس از شستشو در محیط کشت فاقد ریبوفلاوین ۰.۲٪ رشد داشتند خالص سازی شدند و سپس رشد آنها روی نوترین آگار در ۳۷°C در شرایط هوایی مثبت گزارش شد و برای حضور ژن *rib C* در آن نمونه ها، واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام گرفت. زیرا توانایی این جدایه ها در رشد روی محیط فاقد ریبوفلاوین ۰.۲٪ می تواند به دلیل 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 به منظور تایید حضور ژن *rib C* در جدایه هایی که توانایی تولید ریبوفلاوین را در محیط فاقد ریبوفلاوین امکان پذیر ساخته و سبب گردیده است تا این جدایه ها در این محیط کشت رشد کنند، از واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده شد.

### ۷- نتایج واکنش PCR برای بررسی حضور ژن

***ribC* در جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس*** - پس از استخراج DNA ژنومی از جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس* جهت تکثیر ژن *ribC* که کد کننده ریبوفلاوین است از روش PCR استفاده شد. نتایج حاصل از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز در تمام جدایه های استخراج شده پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی بررسی شد و چنین گزارش شد که از ۱۰۰ نمونه باکتری ایزوله شده ۱۹ جدایه (۱۹ درصد) دارای

اولیه ۱۹ نمونه *باسیلوس سوبتیلیس* مولد ریپوفلاوین از انواع خاک‌های مناطق مختلف به دست آمد که نشان دهنده پتانسیل بالای باکتری‌های خاک مناطق مختلف در تولید ریپوفلاوین است. نمونه برداری از گستره وسیعی از خاک‌های مناطق مختلف انجام گرفت و در طی مراحل کار آزمایشگاهی موفق به جداسازی جدایه‌های مولد ریپوفلاوین از آن‌ها گردید. با نمونه-گیری از خاک چندین جدایه مولد ریپوفلاوین به دست آمد که بسیار ارزشمند هستند. در مورد انتخاب گونه *باسیلوس*‌ها چنین است که این گونه به دلیل خصوصیات برتر فراوانی که نسبت به دیگر میکروارگانیسم‌ها داشت انتخاب شد. در میان میکروارگانیسم‌های تولید کننده ریپوفلاوین *باسیلوس سوبتیلیس* 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. *باسیلوس*‌ها توانایی صنعتی شدن بالایی دارند و در دستگاه‌های فرمانتور می‌توانند به خوبی فعالیت داشته باشند (۱۲). این میکروارگانیسم توانایی بهینه شدن را به خوبی 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-طور کلی، 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 ریپوفلاوین 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 و در آن تحقیق مشخص شد که بیان زیاد ژن *ribA* در *باسیلوس سوبتیلیس* تولید ریپوفلاوین را به بیش از ۲۵ درصد افزایش می‌دهد و ژن *ribA* به‌عنوان ژن اصلی در تولید ریپوفلاوین معرفی شد ولی در تحقیق حاضر، ژن *ribC* به‌عنوان ژن اصلی تولید کننده ریپوفلاوین معرفی شد چون حضور این ژن باعث تولید ریپوفلاوین در *باسیلوس سوبتیلیس* شده بود (۳). در تحقیقی که توسط ریچر و همکارانش در سال 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 ریپوفلاوین 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 این باکتری مطالعه صورت گرفته بود و چنین گزارش شده که بیان بیش از حد ژن *ribA* در باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به‌تنهایی به افزایش تولید ریپوفلاوین منجر نخواهد شد و نیازمند دخالت ژن‌های دیگر هم است (۴). در این تحقیق از جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* به‌عنوان باکتری مولد ریپوفلاوین استفاده شده است و فقط حضور ژن *ribC* به‌عنوان ژن مولد ریپوفلاوین بررسی شد. در تحقیق دیگری که در سال ۱۹۹۹ توسط سالوویا 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* ریپوفلاوین کیناز تک عملکردی را کد می‌کند که می‌تواند اثر موتاسیون ژن *ribC* را مهار کند، و محصولات ریپوفلاوین را بازیابی نماید. هم‌چنین در آن تحقیق مشخص شد موتاسیون ژن *ribC* می‌تواند تولید ریپوفلاوین 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 ریپوفلاوین گزارش شد (۱۲). در حالی که در این تحقیق *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی شده از خاک به‌عنوان میکروارگانیسم مولد ریپوفلاوین معرفی شد. جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* از خاک به راحتی انجام می‌شود ولی جداسازی باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* به آسانی *باسیلوس*‌ها انجام نمی‌شود و نیازمند انجام آزمون‌های افتراقی بیش‌تری است. بنابراین استفاده از *باسیلوس سوبتیلیس* به-عنوان میکروارگانیسم مولد ریپوفلاوین برای انجام کارهای تحقیقاتی در مورد ویتامین ریپوفلاوین راحت‌تر است. در تحقیقی که توسط بورگرس و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد حضور ژن‌های دخیل در بیوسنتز ویتامین B<sub>2</sub> مانند *ribA*، *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 ریپوفلاوین به-وسیله PCR تعیین گردید. در تحقیق انجام شده توسط دل وار و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفته باکتری‌های لاکتیک

مناطق مختلف به دست آمد که نشان دهنده پتانسیل بالای باکتری‌های خاک در تولید ریپولایون 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 ریپولایون استفاده نمود و از این جدایه وحشی که قدرت برای تولید ریپولایون از خود نشان می‌دهد بهره گرفت. هم‌چنین با ایجاد جدایه‌های جهش یافته و حذف ژنتیکی اپران‌های مهار کاتابولیکی تولید ریپولایون، می‌توان آن‌ها را به یک تولیدکننده فوق‌العاده تبدیل نمود. در گام بعدی ژن‌های تولیدکننده ریپولایون که از *باسیلوس سوبتیلیس*‌های گوناگون به دست آمده‌اند را می‌توان در باکتری‌هایی که خود تولیدکننده ریپولایون نیستند اما مناسب برای کلون کردن ژن‌های خارجی هستند قرارداد تا باکتری‌گیرنده به‌عنوان کارخانه تولیدکننده ریپولایون عمل کند و این ویتامین را هرچه بیش‌تر تولید نماید. هم‌چنین می‌توان با ایجاد جهش در تولیدکنندگان ریپولایون تولید آن را افزایش داد که این عمل توسط بسیاری از مواد شیمیایی مانند EMS و نیز پرتوهای X و UV امکان‌پذیر است. علاوه بر این به‌منظور افزایش بیش‌تر تولید ریپولایون می‌توان به پروتوپلاست فیوژن سویه‌های مولد ریپولایون اشاره کرد و با تکنیک‌های مدرن جهت ارتقاء کیفیت ریپولایون و نیز افزایش تولید ریپولایون توسط تولیدکنندگان آن به کمک روش‌های پیشرفته پرداخت. در نهایت با خالص‌سازی ریپولایون 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.

فاکتوری برای غنی‌سازی مواد غذایی از نظر منابع ریپولایون معرفی شده‌اند به‌خصوص در آن تحقیق روی لبنیات و شیر سویا بررسی انجام گرفته است و برای تولید این محصولات غنی از ویتامین B<sub>2</sub> استفاده از باکتری‌ها پیشنهاد شده است (۵). در تحقیق دیگری که توسط گولباچ و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شده است چنین گزارش شده که ریپولایون 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 *آشبا یا گوسیپی* 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 ریپولایون برای انجام کارهای تحقیقاتی و مصارف صنعتی راحت‌تر و مقرون‌به‌صرفه 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 ریپولایون بوده و ژن *ribC* ژن تولیدکننده این ویتامین بوده و توانایی تولید ریپولایون 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 ریپولایون در خاک‌های مناطق مختلف می‌توان با در نظر گرفتن خصوصیات ژنتیکی دیگر باکتری‌های مولد ریپولایون از روش‌های مهندسی ژنتیک در تلفیق خصوصیات ژنتیکی متفاوت استفاده شود تا ریپولایونی 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 ریپولایون از انواع خاک‌های

## 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. Schallmeyer 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 TiO<sub>2</sub> 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 role in mammalian nutrition and homeostasis, 1981, p: 81-83.
17. Zabala-Díaz IB, Froelich CA, Ricke SC. Adaptation of a methionine auxotroph *Escherichia coli* growth assay to microtiter plates for quantitating methionine. *Journal of Rapid Methods and Automation in 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—A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000; 102(5): 355-65.