مجله طب دامپزشکی جایگزین | زمستان ۱۴۰۱ |دوره ۵ | شماره ۱۵

مقاله پژوهشی

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

کلونینگ و بیان ژن *کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز استرپتومایسس* خاکزی در باکتری *اشریشیاکلی* برای حذف آلاینده‌های نفتی

علی رضا فتحی‌پور[۱]، مهدی نصیری‌نژاد[۱]، سلاله سادات میرصیفی‌فرد[۲]، سروناز فلسفی[۳]، مجید صادق‌پور[۴]، کیومرث امینی[۵*]

[۱]دانشجوی دکترای حرفه ای دامپزشکی، گروه درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۲]دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۴]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، عضو علمی انجمن میکروب شناسی ایران، تهران، ایران

[۵]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: استفاده گسترده از فرآورده‌های نفتی منجر به آلودگی محیط زیست شده ومشکلاتی جدی برای سلامت محیط ایجاد کرده‌اند. *استرپتومایسس‌ها* ۵۰٪ ازکل جمعیت اکتینومیست‌های خاک راتشکیل داده که به فرم رشته‌ای، گرم مثبت و هوازی هستند. این باکتری‌ها به طورگسترده درمحیط‌های طبیعی آبی و خشکی به وفور یافت می شوند، از نظر غذایی سخت‌گیر نبوده وتنها به منبع کربن و نیتروژن همراه با نمک‌های معدنی نیاز داشته و قادرند برای مدت‌های طولانی به صورت اسپور درخاک باقی بمانند. هدف از این مطالعه کلونینگ ژن کاتکول ۲، ۳-دی‌اکسیژناز ($C_{2,3}$) *استرپتومایسس* خاکزی در باکتری *اشریشیاکلی* به منظور حذف آلاینده‌های نفتی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۵۸ نمونه از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی خاک مناطق مختلف حاشیه نفتی شهر تهران و نواحی آلوده نفتی مثل انبار نفت و اطراف آن جمع‌آوری شد. پس ازکشت، رقت‌سازی و انتخاب کلونی‌های مشکوک به *استرپتومایسس* جهت تعیین هویت، پس از تایید باکتری *استرپتومایسس* بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، میکروسکوپی وتست‌های بیوشیمیایی جهت تایید نهایی، شناسایی مولکولی، توالی 16srRNA آن‌ها تکثیر و مورد بررسی قرارگرفت. پس ازاستخرج DNA نمونه‌ها، برای تکثیرژن $C_{2,3}$ از PCR استفاده شد. ژن $C_{2,3}$ به وسیله وکتور PTG19-T در باکتری *اشریشیاکلی اوریگامی* کلون شد. در نهایت میزان بیان ژن هدف با روش Real Time PCR تعیین و پس از سکانس کردن درخت فیلوژنی رسم شد.

یافته‌ها: آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز از منابع محدودی از جمله *استرپتومایسس‌ها* قابل استخراج است، با توجه به نیاز تکثیر ژن این آنزیم، از منابع باکتریایی تولید آن حائز اهمیت است. درنتیجه این مطالعه موفق به یافتن *استرپتومایسس‌های* بومی مولد آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز گردید و در نهایت با موفقیت ژن آنزیم به باکتری *اشریشیاکلی اوریگامی* وارد شد.

نتیجه‌گیری: دراین مطالعه بدنبال ایجاد میزبان نوترکیب با قابلیت بالای بیان، می‌تواند گام بزرگ در مسیر افزایش تولید این آنزیم درصنعت محسوب شود. همچنین بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه‌های جدید تولید کننده آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز می‌تواند منجر به یافتن روش نوین حذف آلاینده‌های نفتی درخاک گردد.

واژه‌های کلیدی: *کاتکول ۲و۳ دی اکسیژناز، ژن $C_{2,3}$، استرپتومایسس، 16srRNA، کلونینگ، اشریشیاکلی اوریگامی*

علی رضا فتحی‌پور، مهدی نصیری‌نژاد، سلاله سادات میرصیفی‌فرد، سروناز فلسفی، مجید صادق‌پور، کیومرث امینی. کلونینگ و بیان ژن کاتکول ۲ و۳ دی اکسیژناز *استرپتومایسس* خاکزی در باکتری *اشریشیاکلی* برای حذف آلاینده‌های نفتی. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۱؛ ۵(۱۵): ۸۸۱-۸۹۶.

* *نویسنده مسئول: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ، ساوه، ایران.*

Orcid: https://orcid.org/ 0000-0001-0836-2162 ،Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

مقدمه

در بین هیدروکربن‌های آلیفاتیک تشکیل دهنده سوخت‌های فسیلی، آلکان‌ها بخش مهمی از آن‌ها می باشند. آزاد شدن این ترکیبات در محیط مشکلات جدی زیست محیطی ایجاد می کند و نیاز به روش های کارآمد برای تجزیه این ترکیبات به ویژه آنهایی که دارای زنجیره بلندتری هستند وجود دارد. مشکلات اکولوژیک که در نتیجه آلودگی‌های نفتی ایجاد می‌شوند نیاز به توسعه تکنولوژی های کارآمد جهت تصفیه این آلاینده‌هارا نشان می دهد (Li *et al.*, 2013). جهت حذف آلودگی‌های نفتی و پیامدهای ناشی از آن راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است، در دهه‌های اخیر زیست پالایی به دلیل هزینه های کم و کارایی بالا نسبت به دیگر روش ها ارجحیت پیدا کرده است (Weinberg & Hanahan, 2000). در زیست پالایی کاتالیزورهای زیستی بر روی مواد آلاینده عمل کرده و آلاینده‌های موجود در آب، پساب، لجن، خاک و ... را تغییر داده و یا از بین می برد و روشی عملی و اقتصادی جهت حذف بسیاری از آلاینده های زیست محیطی محسوب می شود (Masters *et al.*, 2021).

شناسایی تعداد زیادی از باکتری ها با قابلیت تجزیه زیستی ترکیبات نفتی، منجر به توسعه زیست پالایی شده و این فناوری را تبدیل به روشی رایج و کارآمد در تصفیه مناطق آلوده کرده است. میکروارگانیسم‌های مختلفی از قبیل *Pseudomonas* *Rhodococcus sp*، *Streptomyces sp*.، *Bacillus sp*. و *Acinetobacter sp*. قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند. اگر چه تاکنون شمار متعددی از باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی و شناسایی شده اند، استفاده از باکتری های بومی با توجه به سازگاری آن ها به محیط در اولویت قرار دارد (Cohen, 2013).

زیست پالایی فرآیندی پیچیده بوده و جهت رسیدن به بهترین نتیجه در زیست پالایی علاوه بر استفاده از باکتری‌های کار آمد، دانستن شرایط محیطی بهینه نیز پر اهمیت می باشند. *استرپتومایسس* یکی از این میکروارگانیسم هاست که با توجه به توانایی زیاد در استفاده از منابع مختلف کربن در حذف آلاینده‌های زیستی و حضور در بیشتر مکان ها مورد توجه خاصی قرار گرفته است. امروزه از این باکتری‌ها در مهندسی ژنتیک استفاده می شود و نقش بسیار مهمی در فعالیت های متابولیکی محیط زیست مانند چرخه عناصر و تجزیه آلاینده های ناشی از فعالیت های زیستی و غیر زیستی بازی می کند (Glick & Patten, 2017).

*اکتینومیست*ها رشته‌ای ترین باکتری‌ها هستند که اساساً هوازی بوده اما بعضی جنس‌های آن بی هوازی اختیاری یا اجباری اند و از اکوسیستم های زمینی و دریایی جداسازی می‌شوند. *استرپتومایسس*ها از خانواده اکتینومیست‌ها، گرم مثبت و هوازی هستند که از خاک، آب، رسوبات و منابع مختلف جدا می‌شوند اما جایگاه طبیعی اکثر *استرپتومایسس*ها خاک است و حدود ۱ تا ۲۰ درصد جمعیت قابل کشت را تشکیل می‌دهند *استرپتومایسس*ها به دلیل توانایی تولید و سنتز آنتی‌بیوتیک بسیار معروف می باشند. این باکتری‌ها درحدود ۷۵٪ از آنتی‌بیوتیک‌های مفید پزشکی و تجاری را تولید می‌کنند و تقریباً ۶۰٪ از آنتی‌بیوتیک‌هایی که در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند از گونه‌های *استرپتومایسس* جدا شده‌اند (Watson *et al.*, 2007).

استرپتومایسس‌ها به دلیل نقش منحصر به فرد خود در توانایی تولید متابولیت های ثانویه و مواد فعال بیولوژیکی از جمله نگهدارنده ها و آنزیمها، یکی از عوامل حائز اهمیت در ارتقا صنعت تولید غذا و دارو محسوب می شوند. توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید بیوسورفاکتانت‌ها سبب شده است که میکروارگانیسم‌های متنوعی در تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد توجه قرار گیرند. کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز آنزیمی است که تجزیه حلقه آروماتیک را کاتالیز می کند. ژن ساختاری این آنزیم در یک قطعه ۵-۳

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

کیلونوکلئوتید محدودکننده BglII پلاسمید pTC1 قرار دارد (Nathans & Ho, 1975).

کاتکول ترکیب ارگانیک با فرمول مولکولی $C_6H_4(OH)_2$ است. این ماده ایزومر ارتو سه بنزنولیول ایزومریک، ترکیب بی‌رنگ و به طور طبیعی در مقادیر کم یافت می شود (Primrose & Twyman, 2013). همسانه سازی، کلون‌سازی ژن یا کلونینگ مولکولی به طور عام به معنای جدا کردن یک توالی از ژنوم یک موجود و قرار دادن آن در ژنوم یا مولکول DNA موجود دیگر است. به مولکول DNA نوترکیب حاصل از کلون‌سازی که حاوی ژن‌های بیگانه است، کلون نام دارد (Weinberg & Hanahan, 2000).

استرپتومایسس‌ها قادر به تولید بیش از یک نوع آنتی‌بیوتیک بوده و ممکن است از نظر شیمیایی در یک خانواده نباشند. تولیدات *استرپتومایسس‌ها*، درکشاورزی، تولید فرآورده‌های صنعتی و درمان بیماری‌های انسان و دام کاربرد دارند. تنوع در مکانیسم فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط *استرپتومایسس‌ها* موجب گردیده تا این گروه از باکتری‌ها درزمینه تولید آنتی‌بیوتیک مورد توجه باشند. از سوی دیگر جستجو در میان متابولیت‌های ثانویه *استرپتومایسس‌ها* جهت دست‌یابی به انواع جدید آنتی بیوتیک، همچنان ادامه دارد (Primrose & Twyman, 2013).

کاتکول دی‌اکسیژنازها شکست اکسیداتیو کاتکول و کاتکول‌های استخلاف شده را کاتالیز می‌کنند که به عنوان یک مرحله کلیدی در تجزیه باکتریایی ترکیبات آروماتیک در محیط محسوب می‌شود. این آنزیم‌ها زمانی القاء می‌شوند که تنها منبع کربن در دسترس باکتری، مولکول‌های آروماتیک است. آنزیم‌های دی اکسیژناز توسط Hayaishi کشف شد که شکست اکسیداتیو کاتکول را کاتالیز کنند و دی‌اکسیژنازهای اینترادیول که عضو بارز آن‌ها کاتکول ۱ و ۲ دی اکسیژناز (پیروکاتکاز Pyrocatechase) است، پیوند کربن-کربن میان گروه‌های هیدروکسیل فنل را می‌شکند و تشکیل فرآورده‌ای به نام سیس- سیس موکونات (cis, cis-muconate) را می‌دهد (Sánchez-Suárez *et al.*, 2020). در ایران مطالعاتی در این زمینه انجام نشده است و در نتیجه هدف این مطالعه جداسازی و کلونینگ ژن کاتکول ($C_{2,3}$) از گونه‌های *استرپتومایسس* و کلونینگ آن در باکتری اشرشیاکلی به منظور حذف آلاینده‌های نفتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

غربالگری نمونه‌های خاک و جداسازی *استرپتومایسس‌ها*

نمونه برداری خاک در فصول سرد و گرم سال (از ابتدا تا انتهای سال ۱۳۹۹) از مناطق مختلف حاشیه نفتی شهر تهران و نواحی آلوده نفتی مثل انبار نفت و اطراف آن انجام گرفته و آنها جمع‌آوری شد. به این ترتیب که ۵۸ نمونه از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری خاک جمع آوری شده و بعد از بسته بندی در کیسه‌های پلاستیکی استریل، به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت *Skim milk agar* و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد (Mahon *et al.*, 2018).

در خصوص کشت نمونه‌های خاک به منظور کاهش تعداد فرم‌های رویشی با هدف جداسازی سویه‌های استرپتومایسس از دو تیمار مختلف شامل تیمار حرارتی، خشک کرده خاک استفاده شد و سپس رقت سازی به روش سریال دایلوشن از نمونه های خاک درآب مقطر، انجام شد. در شناسایی مولکولی ایزوله مورد بحث در این تحقیق، آنالیز داده های حاصل از بررسی توالی قطعه مربوط به ژن *16srDNA* حاکی از تطابق منطقی آن با توالی ژن مذکور در باکتری‌های *استرپتومایسس* بود. این نتیجه در تائید مشاهدات مربوط به خصوصیات مورفولوژیکی کلونی، اثبات کرد که باکتری که از خاک مناطق مختلف حاشیه شهر تهران و باغ‌های اطراف آن جداسازی شده است، به جنس *استرپتومایسس* تعلق دارد.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

محیط کشتهای مصرفی

محیط کشت های استفاده شده در تحقیق شامل موارد زیراست: مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، نوترینت براث، تریپتیک سوی براث، پلیت کانت آگار، تریپتیک سوی آگار، استارچ کازئین آگار که تولید شرکت مرک-کشور آلمان استفاده شد.

کشت نمونه‌های خاک

برای نمونه برداری از خاک به نکات مهمی توجه شد. در خصوص کشت نمونه‌های خاک به منظور کاهش تعداد فرم‌های رویشی با هدف جداسازی سویه‌های *استرپتومایسس* از دو تیمار مختلف شامل تیمار حرارتی، خشک کرده خاک استفاده شد. سپس رقت سازی به روش سریال دایلوشن از نمونه های خاک درآب مقطر، انجام شد (Indira, 2014). پس از نمونه برداری، نمونه های خاک در یک سطل جمع آوری و کاملاً مخلوط شد و مواد درشت مثل سنگ ها و ریشه ها حذف گردید. برای بررسی خصوصیات بیولوژیک، حداقل ۵۰۰ گرم از خاک منطقه مدنظر نمونه برداری شد.

انتقال رقت‌های خاک به محیط کشت

از کلیه رقت‌های تهیه شده برای هر نمونه خاک به میزان ۲ میلی‌لیتر در سطح محیط تریپتیک سوی آگار ریخته شد و به طور یکنواخت در تمام سطح محیط پخش و در شرایط هوازی، در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس از لحاظ رشد و عدم رشد و کلنی‌های مشکوک به *استرپتومایسس* مورد بررسی قرار گرفت (Montazer *et al.*, 2020).

انتخاب کلونی های مورد نظر جهت به دست آوردن استرپتومایسس

کلنی‌های رشد کرده در سطح محیط تریپتیک سوی آگار که با کلنی‌های استرپتومایسس تهیه شده از نظر بانک میکروبی شباهت ظاهری داشتند توسط آنس سوزنی کشت برداشته و در سطح جدید تریپتیک سوی آگار که قبلاً در پلیت ریخته و سطح آن‌ها خشک شده کشت خطی داده شد و در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس، در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد و از لحاظ خلوص بررسی گردیدند. باکتری *استرپتومایسس* از طریق تست‌های بیوشیمیایی و بر اساس مورفولوژی ماکروسکوپی، میکروسکوپی و رشد در محیط‌های اختصاصی باسیل به دست آمد (Montazer *et al.*, 2020).

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به *استرپتومایسس*

پس از زمان رشد باکتری‌ها در سطح محیط کشت، کلونی‌های متفاوتی به دست آمد. کلونی‌های *استرپتومایسس* با ظاهر گچی و بویی شبیه بوی خاک قابل تمیز می‌باشند. برای به دست آوردن کلونی های تک، با استفاده از یک لوپ، کلونی باکتری ها جدا و در پلیت های حاوی محیط کشت استارچ کازئین آگار کشت داده شد. این پلیت ها به مدت ۷-۵ روز در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان لازم برای رشد باکتری ها، ویژگی کلونی ها از قبیل رنگ سطح و پشت کلونی، سفتی و نرمی و چگونگی حاشیه آنها ثبت و نگهداری شدند (Mahon *et al.*, 2018).

شناسایی مولکولی جدایه‌های *استرپتومایسس*

پس از تایید باکتری *استرپتومایسس* بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی جهت تایید نهایی شناسایی مولکولی نیز انجام گردید. علاوه بر شناسایی جنس باکتری ها از طریق روش های ذکر شده، استفاده از شناسایی توالی حفاظت شده ژن *16srRNA* باکتریها روش نوینی است که می‌توان از آن برای شناسایی جنس باکتری استفاده کرد. طول این گونه‌های *استرپتومایسس* تعیین توالی شده حدود ۱۵۰۰bp است که حاوی درصد بالای GC است.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR)

برای تایید نهایی سویه *استرپتومایسس* از پرایمرهای عمومی زیر استفاده گردید (جدول ۱). سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به منظور سکانس برای شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد.

برنامه دمایی PCR

ترکیب DNA تخلیص شده با حجم مورد نیاز واکنش در یک میکروتیوپ و انتقال میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکر براساس برنامه سیکل حرارتی: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (جدول ۲). محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر (′۳→′۵)	اندازه طول قطعه(bp)
16s	F= 5′AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3′ R= 5′GGTTACCTTGTTACGACTTCACC3′	۲۳۸

جدول۱. پرایمرهای 16SrRNA مورد استفاده تایید نهایی سویه *استرپتومایسس*

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	–
اتصال	۵۵	۴۵	–
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۳۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	–

جدول۲. برنامه دمایی مخلوط واکنش PCR برای ژن *16srDNA* باکتری *استرپتومایسس*.

آماده سازی پرایمرها

جهت انجام PCR، در مرحله اول با توجه به سکانس ژن آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز که از سایت NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) گرفته شد و توسط برنامه Gene Runner، پرایمرهای هر ژن طراحی، مقایسه و BLAST گردید، سپس این پرایمرها جهت سنتز به شرکت ماکروژن – ایران سفارش داده شد. پس از آن، پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شدند. در جدول (۳) توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است.

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر (′۳→′۵)	اندازه طول قطعه(bp)
$C_{2,3}cat1$	F=CGACCTGATCTCCATGACCGA R=TCAGGTCAGCACGGTCA	۲۳۸

جدول۳. پرایمر مورد استفاده در این پژوهش.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

حجم مورد نظر	مواد	نام ژن
µl۴	Distilled Water	
µl۱۰	Master mix	
µl۱	Forward each Primer(10 pimol)	*$C_{2,3}$cat1*
µl۱	Reverse each Primer(10 pimol)	
µl۴	DNA Streptomyces	
µl۲۰	Total volume	

جدول ٤. مخلوط واکنش PCR برای ژن *C2,3*.

مقادیر PCR

مقادیر مواد PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x، ۱ میکرولیتر از هرکدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر بود (جدول ۴).

تعیین گونه *استرپتومایسس*

برای تعیین هویت نهایی جنس *استرپتومایسس*، با استفاده از فراوان سازی ژن‌های *16srRNA* برای تایید نهایی سویه *استرپتومایسس* از پرایمرهای *16srRNA* (جدول ۱) استفاده گردید. سپس محصول PCR به منظور سکانس برای شرکت Bioneer کره ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد.

کلون کردن ژن *C2,3* در باکتری *اشریشیاکلی اوریگامی*

درحالی که PCR به عنوان روشی برای تولید مقادیر بالا یک قطعه دلخواه جایگزین کلونینگ شده است، اما در موارد خاص کلونینگ DNA تکثیر شده به وسیله PCR ضروری است. به عنوان مثال تکنیک‌های معینی همانند سنتز پروتئین در *in vitro* با وارد سازی قطعه DNA به داخل یک وکتور پلاسمیدی یا فاژی مناسب بهتر به دست می‌آید. روش‌های کلونینگ برای محصولات PCR به طور تقریبی اجازه کلونینگ قطعات DNA به دست آمده از دستکاری‌های متداول DNA را هم به صورت انتهای صاف و هم چسبنده فراهم می‌نماید. DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت همانند TaqDNA منجر می‌شوند که محصولات PCR در انتهای ´۳ خود یک باقی‌مانده آدنین تنها را دارا باشند (Asiabadi *et al.*, 2014).

استفاده از تکنیک TA-Cloning

به منظور کلونینگ سریع‌تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شد که کیت TA-PCR Cloning از شرکت سیناژن-ایران تهیه گردید. در این روش از یک وکتور خطی به نام PTG19-T که در انتهای ´۳ آن باز تیمین قرار دارد، استفاده گردید. استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ´۳ خود دارای باز تیمین است، منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می‌گردد، سپس آنزیم T4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می‌کند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر تشکیل شده که توانایی تکثیر خود به خود را در میزبان مناسب مانند *اشرشیاکلی اوریگامی* دارا می‌باشد. در این روش نیاز به مرحله هضم آنزیمی نمی باشد و این مرحله حذف شده است (Asiabadi *et al.*, 2014).

غربال‌گری سفید/آبی به منظور تایید صحت کلونینگ

وکتورکلونینگ به کاررفته دراین روش PTG19-T دارای ژن *Lacz* است، چون MCS وسط *Lacz* قرار گرفته و اگر قطعه‌ای وارد وکتور شود ژن *Lacz* تخریب می‌شود. در محیط کشت X-gal که آنالوگ لاکتوز است و IPTG که القاگر پروموتور *Lac z* وجود دارد، در نتیجه آنزیم پروتئاز باکتری فعال بوده و از X-gal استفاده کرده و کلنی آبی تشکیل می‌شود. اگر ژن مورد نظر ما وارد وکتور شده باشد، ژن *Lacz* تخریب شده و آنزیم غیرفعال شده است، در نتیجه باکتری

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

نتوانسته از X-gal استفاده کند و کلنی‌های سفید در محیط کشت تشکیل می‌شود. در نتیجه تشکیل کلنی‌های سفید نشان دهنده این است که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. به علاوه چون محیط دارای آمپی‌سیلین است، کلنی‌هایی که می‌توانند در محیط رشد کنند در واقع نشان دهنده دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین هستند (*Asiabadi et al., 2014*).

انجام *Real-Time-PCR*

Real-Time-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت به این صورت انجام شد که در ابتدا ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green و سپس ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سیلسیوس برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سیلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سیلسیوس برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سیلسیوس برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن *16srRNA* به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (Montazer *et al.*, 2019).

رسم درخت فیلوژنی

تجزیه تحلیل نتایج حاصل از توالی‌یابی توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit بررسی گردید. بعد از اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از دو رشته توالی یابی شدهٔ مستقیم و معکوس توسط نرم فزار DNA Baserرشتهٔ واحدی (از'۵ به '۳) مرتب شد. توالی های حاصله با جدایه های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند. هر توالی به طور جداگانه توسط نرم افزار nBlast در بانک ژن جستجو شد و توالی‌های حاصل از Blast توسط نرم افزار W Clustal هم ردیف شدند. آنالیز فیلوژنتیکی پس از هم‌ردیف نمودن توالی‌ها توسط نرم‌افزار W Clustal، با استفاده از برنامه‌های MEGA 5.10 درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شدند. درخت‌های تهیه شده با استفاده از روش الحاق ترسیم MEGA 5.10 برنامه در Neighbor Joining همسانه گردید. به منظور ترسیم هیستوگرام مربوط به نمایش نمودار فواصل درون گونه‌ای پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel، نمودار مربوطه رسم شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر، نمونه برداری خاک از مناطق مختلف حاشیه نفتی شهر تهران و نواحی آلوده نفتی مثل انبار نفت و اطراف آن انجام شد. به این ترتیب که ۵۸ نمونه از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری خاک جمع آوری شده و بر اساس آزمون‌های مولکولی، تا سطح جنس و گونه شناسایی گردید. در این بین ۱۲ نمونه به عنوان *استرپتومایسس* شناسایی شد و سپس جدایه‌هایی که دارای ژن $C_{2,3}$ بودند با استفاده از *16SrRNA* تعیین توالی شدند. بررسی مولکولی نشان داد، که این جدایه‌ها منسوب به گونه *استرپتومایسس* است.

بررسی میکروسکوپی نمونه‌های خاک به منظور جداسازی *استرپتومایسس*

در نتیجه غربال گری ۵۸ نمونه خاک ارسالی به آزمایشگاه در مجموع ۱۲ کلنی مشکوک به استرپتومایسس‌های رشته‌ای گرم مثبت جداسازی شده، که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تحت عنوان استرپتومایسس تعیین هویت شدند.

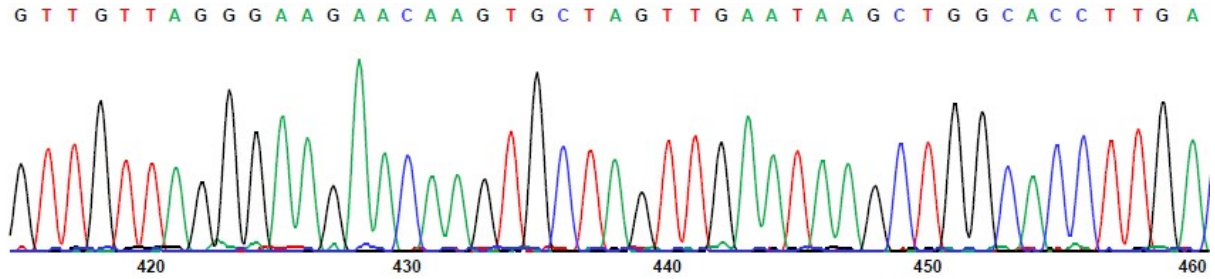
تعیین هویت بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی و میکروسکوپی

کلونی جدایه‌های مشکوک به *استرپتومایسس* در مقایسه با کلنی *استرپتومایسس* گرفته شده از بانک میکروبی و همچنین زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت و این نتایج بیانگر صحت وجود جدایه‌ها در خاک‌های جمع آوری شده می باشد.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به *استرپتومایسس*

همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد تعیین هویت بر اساس خصوصیات موفولوژیکی، میکروسکوپی، تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. در جهت تائید مشاهدات مورفولوژیکی و برای حصول اطمینان از *استرپتومایسس* بودن ایزوله ها، توالی *16srRNA* آنها تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



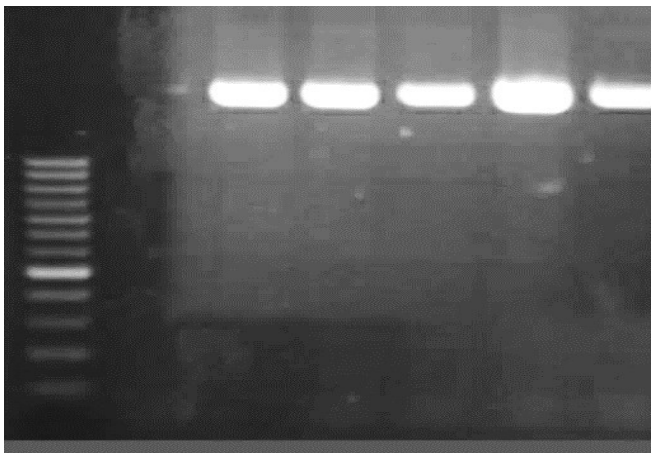
شکل ۱. نتیجه سکانس و بلاست جهت تعیین هویت مولکولی گونه *استرپتومایسس*.

نتیجه تائید استخراج DNA

پس از استخراج DNA نمونه مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری شده و نتیجه در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی و کلون ژن $C_{2,3}$

واکنش PCR برای ژن $C_{2,3}$ با پرایمرهای ذکر شده انجام شد. نتایج حاصل در شکل ۳ آورده شده است. از ۱۲ سویه *استرپتومایسس* جدا شده ۳ سویه واجد ژن $C_{2,3}$ بود.



شکل ۲. نتیجه تایید استخراج DNA پس از انجام تست PCR.

نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی و کلون ژن $C_{2,3}$

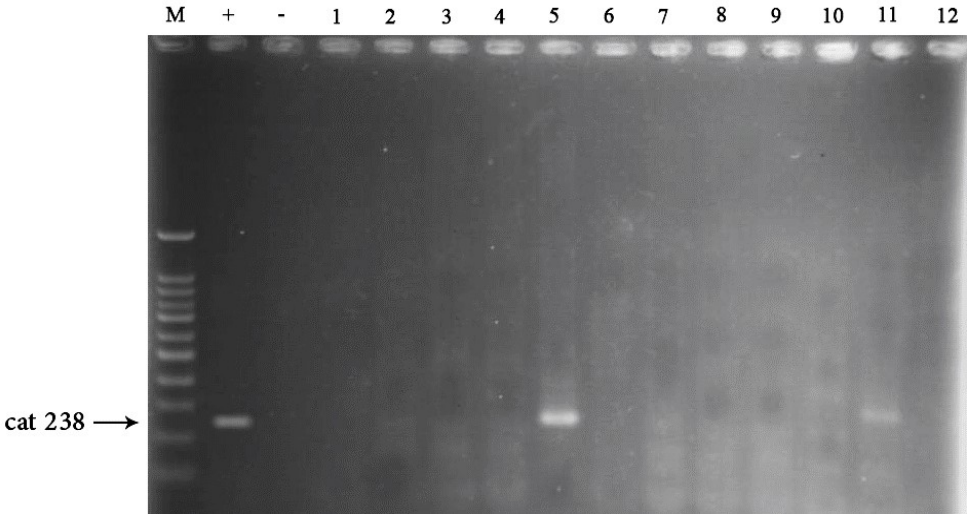
واکنش PCR برای ژن $C_{2,3}$ با پرایمرهای ذکر شده انجام شد. نتایج حاصل در شکل ۳ آورده شده است. از ۱۲ سویه *استرپتومایسس* جدا شده ۳ سویه واجد ژن $C_{2,3}$ بود.

تعیین هویت مولکولی جنس استرپتومایسس

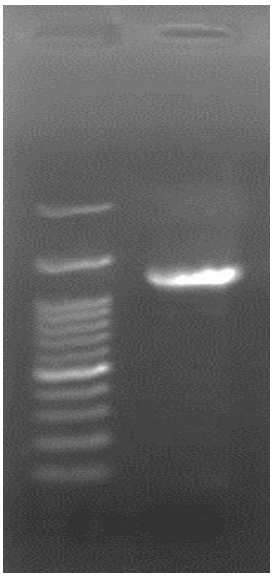
به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتومایسس حامل ژن $C_{2,3}$ از پرایمرهای عمومی *16srRNA* استفاده شد (شکل ۴).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]



شکل۳. نتیجه آزمون PCR برای بررسی فراوانی ژن $C_{2,3}$.



شکل٤. نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی *16s* به منظور تعیین هویت مولکولی جنس *استرپتومایسس*.

تولید کلون‌های نوترکیب در T-A Cloning

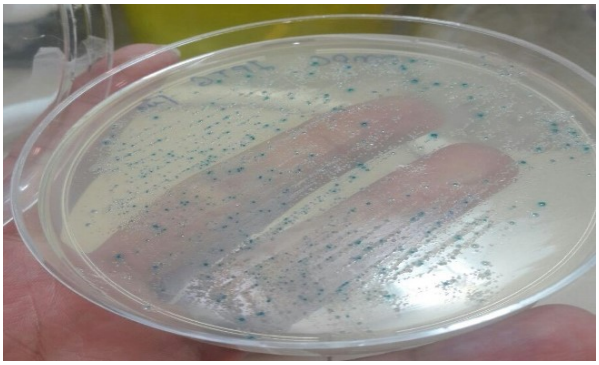
نتایج حاصل از کلونینگ ژن $C_{2,3}$

پس از کلون کردن سویه حامل ژن $C_{2,3}$ توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه‌های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۵).

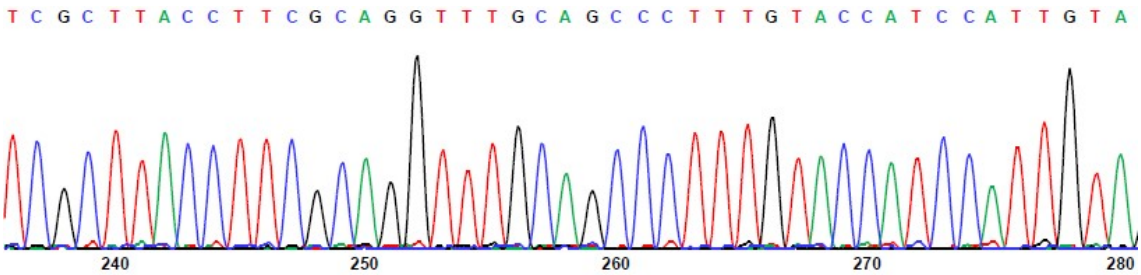
تایید نتایج کلون به وسیله PCR و سکانس

به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج شده و توسط آزمون PCR و در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن $C_{2,3}$ به باکتری *اشرشیاکلی اوریگامی* تایید شد و در نهایت محصول PCR برای سکانس به شرکت Bioneer ارسال گردید و BLAST شد (شکل ۶ و ۷).

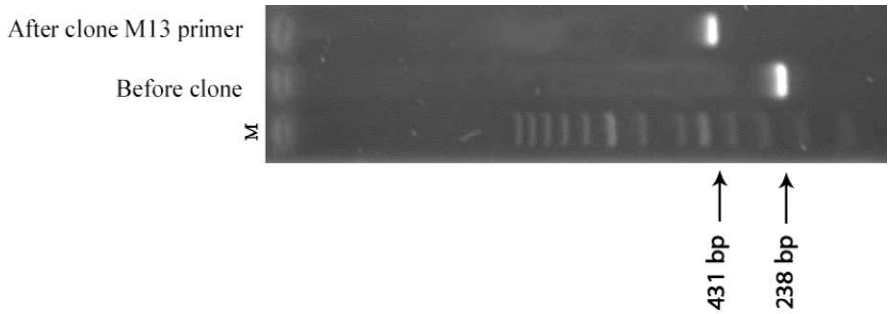
[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]



شکل ۵. نتایج کلون ژن $C_{2,3}$.



شکل ٦. تایید کلونینگ توسط سکانس با پرایمر های M13 وکتور.



شکل ۷. تایید کلونینگ توسط PCR با پرایمر های M13.

تایید نتایج کلون به وسیله Real time PCR و سکانس

به منظور تایید نتایج کلونینگ RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد و توسط آزمون Real time PCR میزان بیان ژن $C_{2,3}$ بررسی شد .در نهایت با سکانس محصول PCR بیان ژن مورد نظر در باکتری *اشرشیاکلی اوریگامی* تایید شد.

نتایج Real time PCR

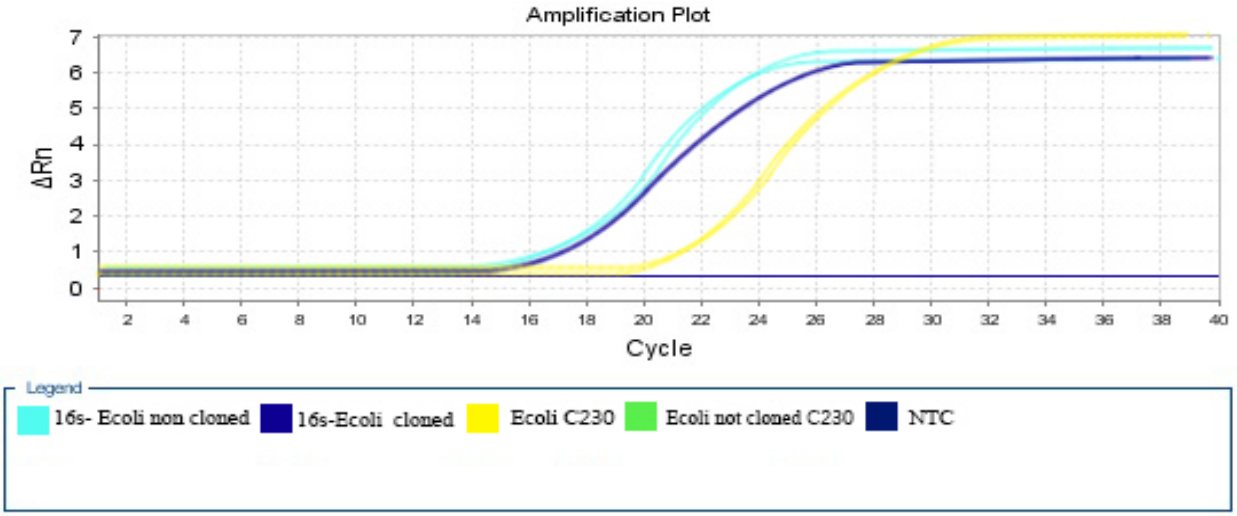
نتیجه تایید تست استخراج RNA و نتایج حاصل از Real Time PCR را در شکل ۸ قابل مشاهده است.

نتایج رسم درخت فیلوژنی

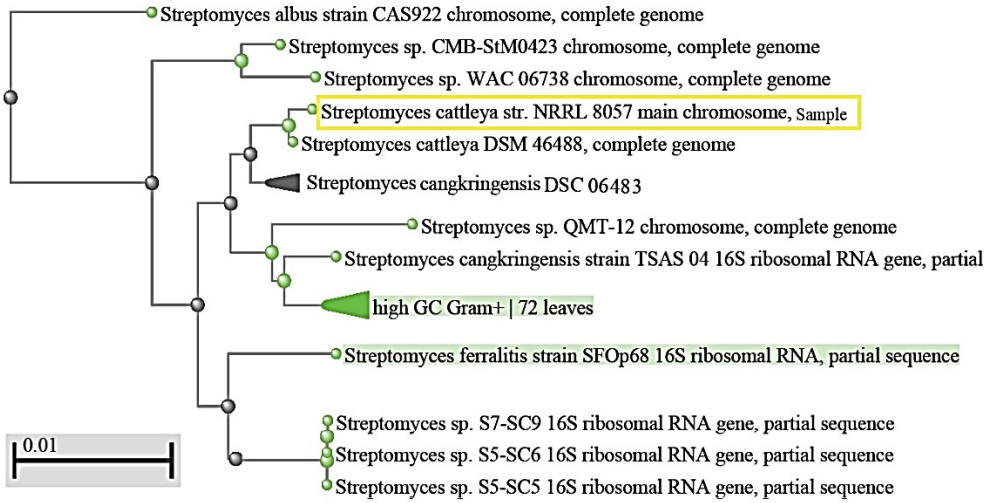
برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار clustalX و Mega5 استفاده شد. در این مرحله از روش neighbor joining برای رسم درخت استفاده شد. بررسی درخت فیلوژنی گونه‌های مورد مطالعه و مقایسه با گونه‌های مشابه در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های استرپتومایسس با استفاده از ژن *16srRNA* مورد بررسی

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می‌دهد که گونه‌های *استرپتومایسس* کـه بیـانگر رابطـه خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم بود (شکل ۹).



شکل۸. نتایج Real time PCR.



شکل۹. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن *16srRNA*.

بحث

نفت خام یکی از مهمترین نهاده ها در صنایع انرژی و شیمیایی است که با توجه به رسوبات طبیعی و انتشار گسترده گازهای سمی حاصل از آن، یکی از شایع ترین آلاینده های آلی برای محیط زیست به حساب می آید. پالایش زیستی منابع آلوده به ترکیبات نفتی راهکاری مناسب برای پاکسازی این منابع می باشد که در این فرآیند میکروارگانیسمها و به ویژه باکتری ها در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی نقش کلیدی ایفا می کنند. ترکیبات هیدروکربنی دارای اجزای مختلفی هستند که ترکیبات آروماتیک از فراوانترین آن ها هستند و توسط آنزیم های دی اکسیژناز تخریب می شوند. گونه‌های *استرپتومایسس* به فراوانی در طبیعت وجود دارند و از این رو چنانچه آنزیم مطلوب در این باکتری یافت شود، استفاده از آن در صنعت

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

مقرون به صرفه است. مصارف آن در پزشکی می‌تواند کاندید مناسبی برای داروهای شیمیایی گران قیمت باشد.

کاتکول در نتیجه تجزیه بسیاری از ترکیبات آلاینده آروماتیک نظیر فنل، تولوئن، استیرن، بنزن، آنیلین، فتالات و مشتقات آن ها به صورت یک ترکیب حد واسط شکل می گیرد. همچنین سمیت کتکول از فنل بیشتر می باشد و لذا حذف آن از آلاینده ها از اهمیت بالایی برخوردار است (Kumar *et al.*, 2005). آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز مهم‌ترین آنزیم دخیل در تجزیه کاتکول است و لذا بررسی دقیق ویژگی های آن از اهمیت بالایی برخوردار است. بدین منظور در پژوهش های متعددی ژن رمز کننده این آنزیم کلون شده است. به عنوان نمونه می توان به پژوهش Nakai و همکاران در سال ۱۹۹۵ اشاره کرد. این گروه به منظور تکثیر این ژن با استفاده از PCR از پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی آمینواسیدی استفاده کردند. سپس پروتئین بیان شده تحت اپران *lac* در *E.Coli* مورد بررسی قرار گرفت (Nakai *et al.*, 1995).

براساس مطالعه He و همکاران، کاتکول آنزیم اصلی تخریب آروماتیک است. در این بررسی با استفاده از تکنیک Real time PCR و کلونینگ، تنوع و الگوهای توزیع ژن های *C2,3* در رسوبات سطحی دریا بوهای مشخص گردید. نتایج نشان داد که رسوبات دریای بوهای حامل ژن‌های مربوط به زیر خانواده *C2,3* بودند و نمونه‌ها از منطقه تخلیه خاک و مزرعه پرورش آبزی جدا شد (He *et al.*, 2016). ترکیبات جدا شده از ژن‌های $C_{2,3}$ خاک در مقایسه با نمونه‌های خلیج بوهای نشان داد، کربن آلی کل یک عامل تعیین کننده مهم برای تغییر ترکیب است.

Huang و همکاران ژن کاتکول ۲ و ۳-دی اکسیژناز ($C_{2,3}$) را از *استرپتومایسس* جداسازی نمودند. پس از استخراج DNA به وسیله PCR ژن مورد نظر تخلیص، سپس RNA آن استخراج و cDNA ساخته شد. ژن کاتاکول در پلاسمید کاتابولیک نفتالین کلون شده و توالی یابی شد. ژن *ND6* $C_{2,3}$ در *Escherichia coli DH 5α* با استفاده از پروموتر لاک pUC18 بیان شد و محصول ژن آن توسط کروماتوگرافی DEAE-Sephacel و Phenyl-Sepharose CL-4B خالص شد. ژن $C_{2,3}$ از ۹۲۴ نوکلئوتید تشکیل شده و یک پلی پپتید با وزن مولکولی ۳۶ کیلو دالتون حاوی ۳۰۷ مانده اسیدآمینه راکدگذاری می‌کرد آزمایش‌های آنزیمی نشان داد که خلوص و مقاومت $C_{2,3}$ جدا شده از *استرپتومایسس* نسبت به *سودوموناس* بهتر بود (Huang *et al.*, 2010). نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده سازگاری این میکروارگانیسم‌ها به محیط ریزوسفر و به دنبال آن ارتقا پتانسیل آن‌ها برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی می‌باشد. نتایج این تحقیق به عنوان یک مرحله اساسی در راستای توسعه گیاه پالایی خاک‌های آلوده در جنوب غرب ایران محسوب می‌گردد.

در بررسی Heydari و همکاران میزان فعالیت آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز بعد از اندازه گیری میزان توانایی تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفت. بررسی های انجام شده نشان داد که جدایه های T16 و B3 دارای آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز هستند که این جدایه ها توانایی بالایی در امولوسیون کنندگی و در مقابل توانایی کمتری در پخش نفت و پاشش قطره از خود نشان دادند (Heydari *et al.*, 2018).

Montazer و همکاران نشان دادند که اغلب هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در محیط دریا پایداری زیادی داشته و در صورت ورود به بدن آبزیان در بافت‌های چربی تجمع می یابند (Montazer *et al.*, 2019). سرطانزایی، جهش زایی و ایجاد اختلالات جنینی از جمله آثار سمی این ترکیبات است. از این رو تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده نفتالن و مقایسه توانایی آن‌ها در حذف این ماده انجام شد. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های *استرپتومایسس* جدا شده در حذف این آلاینده از محیط کشت توانا بوده و بنابراین می‌توان

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

این گونه‌ها را برای انجام آزمایش‌های میدانی پیشنهاد کرد و در شرایط آلودگی بالا، از آن‌ها استفاده کرد. پس از نمونه‌برداری از رسوبات آلوده نفتی و انجام مراحل غنی‌سازی باکتری‌های مقاوم به ماده فوق، جداسازی و سپس خالص‌سازی شدند. از ۸ گونه باکتری به دست آمده ۲ گونه که پس از سه روز از تلقیح از جذب نوری بالاتر و pH محیط کشت کمتری برخوردار بودند.

در مطالعه Babaei و همکاران تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی توسط گونه های میکروبی موجود در خاک آلوده به مواد نفتی به منظور بررسی قابلیت این دسته از میکروارگانیسم ها در راستای حذف آلاینده های نفتی مورد مطالعه قرار گرفت. خاک آلوده به مواد نفتی از پالایشگاه کرمانشاه جمع آوری شده و تلقیح میکروارگانیسم ها در سه مرحله کشت در محیط جامد، غنی سازی و کشت در محیط آبی انجام شد. حذف هیدروکربن های نفتی در شرایط هوازی در یک رآکتور بیولوژیکی محتوی میکروارگانیسم های کشت شده انجام گردید. رآکتور با ظرفیت شامل دو گونه ۳۶ لیتر به دو بخش هوازی و ته نشینی تقسیم شده و بر اساس سیستم لجن فعال کار می کند. باکتری های تلقیح شده که عمدتا *استرپتومایسس* هستند قادرند از هیدروکربن های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. همچنین تأثیر عواملی نظیر دما، PH، مواد مغذی و زمان ماند بر عملکرد رآکتور مورد بررسی قرار می گیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی توسط باکتری های تلقیح شده منجر به کاهش قابل ملاحظه سطح هیدروکربن های نفتی در پسآب خروجی می گردد(Babaei *et al.*, 2013).

در مطالعه Xie و همکاران، کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز از باکتری *استرپتومایسس* به عنوان آنزیم اصلی برای تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن های آروماتیک جدا شد. ژن *کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز* از DNA *استرپتومایسس* تخلیص و به پلاسمید گونه *P. Putida BNF* تلقیح و کلون شد. توالی نوکلئوتیدی کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز ($C_{2,3}$) با ۹۲۴ جفت باز کد کننده تشکیل شده که یک پلی پپتید ۳۰۷ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند(Xie *et al.*, 2014). ژن $C_{2,3}$ درکروموزوم *Acinetobacter* sp ادغام شد و نوترکیب BS3-$C_{2,3}$ تشکیل شدکه می‌تواند پروتئین کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز را بیان کند. نوترکیب-BS3 $C_{2,3}$ قادر به تخریب هیدروکربن های مختلف معطر و N-alkanes است. ویژگی و فعالیت بالای این آنزیم نشان می دهد که BS3-$C_{2,3}$ کاندید بالقوه ای برای تجزیه تخریب روغن خام باشد (Xie *et al.*, 2019).

در مطالعه Hassan و Aly، تمرکز بر بررسی توانایی سویه های استرپتومایسس برای تخریب BTEX در دامنه pH قلیایی بود. بر این اساس، کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز ($C_{2,3}$) استخراج شده با استفاده ازخواص جنبشی در پلاسمید تلقیح و به باکتری میزبان منتقل و در E. Coli DH5α کلون شد. کاتکول تکثیر شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتیجتا کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز به عنوان تجزیه کننده آلاینده های نفتی جدا شده از *استرپتومایسس* خاک شناخته شد. این یافته ممکن است به منظور برآورد پتانسیل واقعی این سویه مورد استفاده در حذف آلاینده‌های BTEX یا از بین بردن طبیعی محل‌های آلوده BTEX قلیایی ضروری باشد (Hassan & Aly, 2018).

در یک پژوهش دیگر که در سال ۲۰۰۰ منتشر شد، ژن رمزگذار کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز ترموفیل از *استرپتومایسس* ستونی همسانه سازی و بیان شد (An *et al.*, 2001). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۶ توسط Matsumura و همکاران انجام گرفت ژن *catA* در *اشرشیاکلی* بیان و پروتئین حاصل با ستون MonoQ جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت (Matsumura *et al.*, 2006).در مطالعه حاضر ژن $C_{2,3}$ با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی بر اساس توالی به دست آمده با استفاده از PCR تکثیر و پس از قرار گرفتن در وکتور PTG19-T به *اشرشیاکلی اوریگامی* اوریگامی منتقل شد.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

از جمله محدودیتهای این مطالعه می توان به نمونه گیری از خاک حاوی ترکیبات نفتی و روغنی که به سایر مواد و ترکیبات آمیخته بود اشاره نمود.

نتیجه گیری

این مقاله حاصل از پایان نامه و برای اخذ درجه کارشناسی ارشد می باشد. در نتیجه این مطالعه و در راستای ایجاد میزبان نوترکیب با قابلیت بالای بیان، می‌تواند گام بزرگ در مسیر افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب شود. همچنین بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه‌های جدید تولید کننده آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز می‌تواند منجر به پیدا کردن روش نوین حذف آلاینده‌های نفتی گردد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می دارند که تضاد منافعی وجود ندارد.

References

An HR., Park HH. and Kim ES. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (catA) from Streptomyces setonii. FEMS Microbiol Lett, 2001; 195(1): 17-22. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10491.x.

Asiabadi FI., Mirbagheri SA., Najafi P. and Moatar F. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils around Isfahan Oil Refinery (Iran) by sorghum and barley. Curr World Environ, 2014; 9(1): 65.

Babaei S., Najafi F., Soltani N., Khavari-Nejad R. and Abbaspanah B. Physiological responses of Anabaena sp. ISC55 to crude oil and its potential for biodegradation. Int J Algae, 2013; 15(3): 264-273.

Cohen SN. DNA cloning: a personal view after 40 years. Proc Natl Acad Sci, 2013; 110(39): 15521-15529.

Glick BR. and Patten CL. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA: 5nd ed., John Wiley & Sons, 2017.

Hassan HA. and Aly AA. Isolation and characterization of three novel catechol 2, 3-dioxygenase from three novel haloalkaliphilic BTEX-degrading Pseudomonas strains. Int J Biol Macromol, 2018; 106: 1107-1114.

He P., Li L., Liu J., Bai Y. and Fang X. Diversity and distribution of catechol 2, 3-dioxygenase genes in surface sediments of the Bohai Sea. FEMS Microbiol Lett, 2016; 363(10): fnw086.

Huang YJ., Jiang YB., Fossey JS., James TD. and Marken F. Assembly of N-hexadecyl-pyridinium-4-boronic acid hexafluorophosphate monolayer films with catechol sensing selectivity. J Mater Chem, 2010; 20(38): 8305-8310.

Heydari Q., Qavidel A., Khosh Kholq Sima N. and Ebadi A. investigating the activity of catechol 2,3 dioxygenase enzyme in bacteria isolated from soil contaminated with crude oil. the first international conference and the fourth national conference on conservation of natural resources and environment, 2018; 128-132.

Indira G. In vitro antifungal susceptibility testing of 5 antifungal agents against dermatophytic species by CLSI (M38-A) micro dilution method. Clin Microbial, 2014; 3(3): 145.

Kumar A, Kumar S, Kumar S. Biodegradation Kinetics of Phenol and Catechol Using Pseudomonas putida MTCC 1194. Biochemical Engineering, 2005; 22: 151-159.

Li L., Cole J. and Margolin DA. Cancer stem cell and stromal microenvironment. Ochsner J, 2013; 13(1): 109-118.

Mahon CR., Lehman DC. and Manuselis G.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

Textbook of diagnostic microbiology-e-book. 6nd ed., Elsevier Health Scienc, 2018.

Masters EA., Hao SP., Kenney HM., Morita Y., Galloway CA., de Mesy Bentley., et al. Distinct vasculotropic versus osteotropic features of S. agalactiae versus S. aureus implant-associated bone infection in mice. J Orthop Res, 2021; 39(2): 389-401.

Matsumura E., Sakai M., Hayashi K., Murakami S., Takenaka S. and Aoki K. Constitutive expression of catABC genes in the aniline-assimilating bacterium Rhodococcus species AN-22: production, purification, characterization and gene analysis of CatA, CatB and CatC. Biochem J, 2006; 393(Pt 1): 219-226. doi:10.1042/BJ20050740.

Montazer Z., Habibi Najafi MB. and Levin DB. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. Polymers; 2020; 12(1):123.

Montazer Z., Habibi Najafi MB. and Levin DB. Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. Can J Microbiol; 2019; 65(3): 224-34.

Nakai C., Uyeyama H., Kagamiyama H., Nakazawa T., Inouye S., Kishi, F., et al. Cloning, DNA sequencing, and amino acid sequencing of catechol 1,2-dioxygenases (pyrocatechase) from Pseudomonas putida mt-2 and Pseudomonas arvilla C-1. Arch Biochem Biophys, 1995; 321(2): 353-362. doi:10.1006/abbi.1995.1405.

Nathans D. and Ho S. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Annu Rev Biochem, 1975; 44: 273-93.

Primrose SB. and Twyman R. Principles of gene manipulation and genomics. 7nd ed., Wiley-Blackwell, 2013.

Sánchez-Suárez J., Coy-Barrera E., Villamil L. and Díaz L. Streptomyces-derived metabolites with potential photoprotective properties-A systematic literature review and meta-analysis on the reported chemodiversity. Molecules, 2020; 25(14): 3221.

Watson JD., Myers RM., Caudy AA. and Witkowski J. A. Recombinant DNA: genes and genomes: a short course. 3nd ed., Macmilla, 2007.

Weinberg R. and Hanahan D. The hallmarks of cancer. Cell, 2000; 100(1): 57-70.

Xie YF., Feng WW., Liu MC., Xie J., Yu L., Gong XH., et al. Investigation of efficacy enhancing and toxicity reducing mechanism of combination of aconiti lateralis radix praeparata and paeoniae radix alba in adjuvant-induced arthritis rats by metabolomics. Evid-based Complement Altern Med, 2019; 2019: 9864841.

Xie Y., Yu F., Wang Q., Gu X. and Chen W. Cloning of catechol 2, 3-dioxygenase gene and construction of a stable genetically engineered strain for degrading crude oil. Indian J Microbiol, 2014; 54(1): 59-64.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Research Article

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

Cloning and Expression of *Catechol 2,3-Dioxygenase* Genes of *Streptomyces* Living in the Soil in *Escherichia Coli* Bacteria to Remove Oil Pollutants

Alireza Fathipour[1], Mehdi Nasirinejad[1], Solaleh Sadat Mirsifi Fard[2], Sarvenaz Falasfi[3], Majid Sadeghpour[4], Kumarss Amini[5]

[1]Professional Doctorate Student in Veterinary Medicine, Clinic Department, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[2]Master's Degree in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Department of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4]Senior Expert in Microbiology, Scientific Member of the Iranian Microbiology Association, Tehran, Iran
[5]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 22/Nov/2022 Revised: 23/Dec/2022 Accepted: 29/Dec/2022

Abstract

Backgroudnd and aim: Today, the widespread use of petroleum products has led to environmental pollution and has created serious problems for the health of the environment. *Streptomyces* make up 50% of the total population of soil *actinomycetes* are filamentous, gram-positive, and essentially aerobic. These bacteria are abundant in natural aquatic and terrestrial environments, are not nutritionally hardy, require only a source of carbon and nitrogen along with mineral salts, and they are able to remain in the soil as spores for a long time. The aim of the study was to clone the *Streptomyces catechol 2, 3-dioxygenase* gene ($C_{2,3}$) present in the soil in *Escherichia coli* bacteria in order to remove oil pollutants.

Materials and Methods: In this study, 58 samples were collected from a depth of 5 to 10 cm in different areas of the suburb of Tehran and oil contaminated areas such as the oil depot and its surroundings. After culturing, diluting and selecting suspicious *Streptomyces* colonies for identification, after confirmation of *Streptomyces* bacteria based on colony appearance, microscopic characteristics, and biochemical tests for final confirmation of molecular identification, their 16srRNA sequence was amplified and replicated, was examined. In the next step, after DNA extraction of the samples, PCR was used to amplify the $C_{2,3}$ gene. The $C_{2,3}$ gene was then cloned into *Escherichia coli Origami* by PTG19-T vector. Finally, the amount of gene expression was determined by Real Time PCR and after sequencing the phylogenetic tree was drawn.

Results: The enzyme catechol 2, 3-dioxygenase can be extracted from limited sources such as *Streptomyces*, so the need for gene amplification of this enzyme is important from the bacterial sources that produce it. Therefore, in this study, this enzyme was isolated from Streptomyces. As a result of this study, we were able to find native *Streptomyces* that produce the enzyme catechol 2, 3-dioxygenase, and finally, the gene of this enzyme was successfully introduced into *Escherichia coli Origami*.

Discussion: In this study, in order to create of a recombinant host with high expression capacity, it can be considered a big step towards increasing the production of this enzyme in the industry. Further investigation to find new strains producing catechol 2, 3-dioxygenase can lead to a new method of removing oil contaminants.

Keywords: *Catechol 2, 3-dioxygenase enzyme, $C_{2,3}$ gene, Streptomyces, 16srRNA, cloning, E. Coli Origami*

Cite this article as: Alireza Fathipour, Mehdi Nasirinejad, Solaleh Sadat Mirsifi Fard, Sarvenaz Falasfi, Majid Sadeghpour, Kumarss Amini. Cloning and expression of *catechol 2, 3-dioxygenase* genes of *Streptomyces* living in the soil in *Escherichia Coli* bacteria to remove oil pollutants. J Altrn Vet Med. 2022; 5(15): 881-896.

**** Corresponding Author***
Department of Biology, Faculty of Sciences, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran.
E-mail: ebrahim.hossini@yahoo.com, Orcid: https://orcid.org/0000-0001-7581-5835

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.3.9]