



## کلوبینگ و بیان ژن کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژنаз استرپتومایسنس خاکزی در باکتری اشریشیاکلی برای حذف آلاینده‌های نفتی

علی رضا فتحی‌پور<sup>۱</sup>، مهدی نصیری‌نژاد<sup>۲</sup>، سلاله سادات میرصفی‌فرد<sup>۳</sup>، سروناز فلسفی<sup>۴</sup>، مجید صادق‌پور<sup>۵</sup>، کیومرث امینی<sup>۶\*</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، گروه درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

<sup>۲</sup>دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup>استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۴</sup>کارشناس ارشد میکروبیولوژی، عضو علمی انجمن میکروب شناسی ایران، تهران، ایران

<sup>۵</sup>دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ | تاریخ 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 و مشکلاتی جدی برای سلامت محیط ایجاد کرده‌اند. استرپتومایسنس‌ها ۵۰٪ از کل جمعیت اکتینومیست‌های خاک را تشکیل داده که به فرم رشتہ‌ای، گرم مثبت و هوایی هستند. این باکتری‌ها به طور گسترده در محیط‌های طبیعی آبی و خشکی به وفور یافت می‌شوند، از نظر غذایی سخت‌گیر نبوده و تنها به منع کربن و نیتروژن همراه با نمک‌های معدنی نیاز داشته و قادرند برای مدت‌های طولانی به صورت اسپور در خاک باقی بمانند. هدف از این مطالعه کلوبینگ ژن کاتکول ۲، ۳ دی‌اکسیژناز ( $C_{2,3}$ ) استرپتومایسنس 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 جمع آوری شد. پس از کشت، رقت‌سازی و انتخاب کلوبینی‌های مشکوک به استرپتومایسنس جهت تعیین هویت، پس از تایید باکتری استرپتومایسنس بر اساس خصوصیات ظاهری کلینی، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی جهت تایید نهایی، شناسایی مولکولی، توالی 16srRNA آن‌ها تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA نمونه‌ها، برای تکثیر ژن  $C_{2,3}$  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 دی‌اکسیژناز از منابع محدودی از جمله استرپتومایسنس‌ها قابل استخراج است، با توجه به نیاز تکثیر ژن این آنزیم، از منابع باکتریایی تولید آن حائز اهمیت است. در تیجه این مطالعه موفق به یافتن استرپتومایسنس‌های بومی مولد آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز گردید و در نهایت با موفقیت ژن آنزیم به باکتری اشریشیاکلی اوریگامی وارد شد.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه بدبند ایجاد میزان 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 دی‌اکسیژناز می‌تواند منجر به یافتن روش نوین حذف آلاینده‌های نفتی در خاک گردد.

**واژه‌های کلیدی:** کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز، ژن  $C_{2,3}$ ، استرپتومایسنس، 16srRNA، کلوبینگ، اشریشیاکلی اوریگامی

علی رضا فتحی‌پور، مهدی نصیری‌نژاد، سلاله سادات میرصفی‌فرد، سروناز فلسفی، مجید صادق‌پور، کیومرث امینی. کلوبینگ و بیان ژن کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز استرپتومایسنس خاکزی در باکتری اشریشیاکلی برای حذف آلاینده‌های نفتی. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۱؛ ۱۵(۵): 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](mailto:dr_kumarss_amini@yahoo.com)

باکتری‌های کار آمد، دانستن شرایط محیطی بهینه نیز بر اهمیت می‌باشند. استرپتومایسیس یکی از این میکروارگانیسم‌هاست که با توجه به توانایی زیاد در استفاده از منابع مختلف کربن در حذف آلاینده‌های زیستی و حضور در بیشتر مکان‌ها مورد توجه خاصی قرار گرفته است. امروزه از این باکتری‌ها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود و نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های متابولیکی محیط زیست مانند چرخه عناصر و تجزیه آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیر زیستی بازی می‌کند (Glick & Patten, 2017).

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

استرپتومایسیس‌ها به دلیل نقش منحصر به فرد خود در توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد فعال بیولوژیکی از جمله نگهدارنده‌ها و آنزیمهای، یکی از عوامل حائز اهمیت در ارتقا صنعت تولید غذا و دارو محسوب می‌شوند. توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید بیوسورفاکتانت‌ها سبب شده است که میکروارگانیسم‌های متنوعی در تولید بیوسورفاکتانت‌ها مورد توجه قرار گیرند. کاتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژنаз آنزیمی است که تجزیه حلقه آروماتیک را کاتالیز می‌کند. ژن ساختاری این آنزیم در یک قطعه ۵-۲

## مقدمه

در بین هیدروکربن‌های آلیاتیک تشکیل دهنده سوخت‌های فسیلی، آلکان‌ها بخش مهمی از آن‌ها می‌باشند. آزاد شدن این ترکیبات در محیط مشکلات جدی زیست محیطی ایجاد می‌کند و نیاز به روش‌های 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 تکنولوژی‌های کارآمد جهت تصفیه این آلاینده‌هارا نشان می‌دهد (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 هزینه‌های کم و کارایی بالا نسبت به دیگر روش‌ها 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 می‌برد و روشی عملی و اقتصادی جهت حذف بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌شود (Masters et al., 2021).

شناسایی تعداد زیادی از باکتری‌ها 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 *Pseudomonas*, *Rhodococcus* sp, *Acinetobacter* sp, *Bacillus* sp, *Streptomyces* sp, *sp.* قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند. اگرچه تاکنون شمار متعددی از باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی و شناسایی شده اند، استفاده از باکتری‌های بومی با توجه به سازگاری آن‌ها 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

Sánchez-Suárez *et al.*, (muconate 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 استرپتومایسنس و کلونینگ آن در باکتری اشرشیاکلی به منظور حذف آلانینده‌های نفتی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### غربالگری نمونه‌های خاک و جداسازی استرپتومایسنس‌ها

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 جمع‌آوری شده و بعد از بسته بندی در کیسه‌های پلاستیکی استریل، به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکرووارگانیسم‌های دارای *Skim milk agar* و *Mahon et al.*, (2018).

در خصوص کشت نمونه‌های خاک به منظور کاهش تعداد فرم‌های رویشی با هدف جداسازی سویه‌های استرپتومایسنس از دو تیمار مختلف شامل تیمار حرارتی، خشک کرده خاک استفاده شد و سپس رقت سازی به روش سریال دایلوشن از نمونه‌های خاک در آب مقطر، انجام شد. در شناسایی مولکولی ایزوله مورد بحث در این تحقیق، آنالیز داده‌های حاصل از بررسی توالی قطعه مربوط به ژن *16srDNA* حاکی از تطابق منطقی آن با توالی ژن مذکور در باکتری‌های استرپتومایسنس 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 استرپتومایسنس تعلق دارد.

کیلونوکلئوتید محدود کننده *BglIII* 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 ایزو مریک، ترکیب بی‌رنگ و به طور طبیعی در مقداری کم یافت می‌شود (Primrose & Twyman, 2013). کلونسازی ژن یا کلونینگ مولکولی به طور عام به معنای جدا کردن یک توالی از ژنوم یک موجود و قرار دادن آن در ژنوم *DNA* یا مولکول *DNA* موجود دیگر است. به مولکول *DNA* نوترکیب حاصل از کلونسازی که حاوی ژن‌های بیگانه است، کلونسازی ژن یا کلونینگ مولکولی به طور عام به معنای جدا کردن نام دارد (Weinberg & Hanahan, 2000).

استرپتومایسنس‌ها قادر به تولید بیش از یک نوع آنتی‌بیوتیک بوده و ممکن است از نظر شیمیایی در یک خانواده نباشد. تولیدات استرپتومایسنس‌ها، در کشاورزی، تولید فرآورده‌های صنعتی و درمان بیماری‌های انسان و دام کاربرد دارند. تنوع در مکانیسم فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط استرپتومایسنس‌ها موجب گردیده تا این گروه از باکتری‌ها در زمانه تولید آنتی‌بیوتیک مورد توجه باشند. از سوی دیگر جستجو در میان متابولیت‌های ثانویه استرپتومایسنس‌ها جهت دست‌یابی به انواع جدید آنتی‌بیوتیک، 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 منع کردن در دسترس باکتری، مولکول‌های آروماتیک است. آنزیم‌های دی‌اکسیژناز توسط *Hayaishi* کشف شد که شکست اکسیداتیو کاتکول را کاتالیز کنند و دی‌اکسیژنازهای اینترادیول که عضو بارز آن‌ها کاتکول ۱ و ۲ دی‌اکسیژناز (پیروکاتکاز Pyrocatechase) است، پیوند کردن-کربن میان گروه‌های هیدروکسیل فل را می‌شکند و تشکیل فرآورده‌ای به نام سیس-سیس موکونات (*cis, cis*-cyclohexane dimers) می‌نمایند.

سطح آن‌ها خشک شده کشت خطی داده شد و در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس، در شرایط هوایی به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد و از لحاظ خلوص برسی گردیدند. باکتری استرپتومایسیس 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 استرپتومایسیس**

پس از زمان رشد باکتری‌ها در سطح محیط کشت، کلونی‌های متفاوتی به دست آمد. کلونی‌های استرپتومایسیس با ظاهر گچی و بویی شبیه بوی خاک قابل تمیز می‌باشند. برای به دست آوردن کلونی‌های تک، با استفاده از یک لوب، کلونی باکتری‌ها جدا و در پلیت‌های حاوی محیط کشت استارچ کازین آگار کشت داده شد. این پلیت‌ها به مدت ۵-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان لازم برای رشد باکتری‌ها، ویژگی کلونی‌ها 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 استرپتومایسیس**

پس از تایید باکتری استرپتومایسیس بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی جهت تایید نهایی شناسایی مولکولی نیز انجام گردید. علاوه بر شناسایی جنس باکتری‌ها از طریق روش‌های 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 استرپتومایسیس تعیین توالی شده حدود ۱۵۰۰ bp است که حاوی درصد GC بالای است.

## محیط کشت‌های مصرفی

محیط کشت‌های استفاده شده در تحقیق شامل موارد زیراست: مولر هیتون برات، مولر هیتون آگار، نوترینت برات، تریپتیک سوی برات، پلیت کانت آگار، تریپتیک سوی آگار، استارچ کازین 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 استرپتومایسیس از دو تیمار مختلف شامل تیمار حرارتی، خشک کرده خاک استفاده شد. سپس رقت سازی به روش سریال دایلوشن از نمونه‌های خاک در آب مقطر، انجام شد (Indira, 2014). پس از نمونه برداری، نمونه‌های خاک در یک سطل جمع آوری و کاملاً مخلوط شد و مواد درشت مثل سنگ‌ها و ریشه‌ها حذف گردید. برای برسی 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 هوایی، در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس از لحاظ رشد و عدم رشد و کلنی‌های مشکوک به استرپتومایسیس مورد بررسی قرار گرفت (Montazer *et al.*, 2020).

## انتخاب کلونی‌های مورد نظر جهت به دست

### آوردن استرپتومایسیس

کلنی‌های رشد کرده در سطح محیط تریپتیک سوی آگار که با کلنی‌های استرپتومایسیس تهیه شده از نظر بانک میکروبی شباht ظاهری داشتند توسط آنس سوزنی کشت برداشته و در سطح جدید تریپتیک سوی آگار که قبلاً در پلیت ریخته

براساس برنامه سیکل حرارتی: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هر کدام 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.

### واکنش ذنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای تایید نهایی سویه استرپتومایسیس از پرایمرهای عمومی زیر استفاده گردید (جدول ۱). سپس محصول واکنش ذنجیره‌ای 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 میکروتیوب و انتقال میکروتیوب‌ها به دستگاه ترموسایکر

نام ژن	توالی اولیگونوکلوتئیدی پرایمر ( $5' \rightarrow 3'$ )	اندازه طول قطعه (bp)
16s F= 5'AGAGTTGATCMTGGCTCAG3' R= 5'GGTTACCTTGTACGACTTCACC3'		۲۳۸

جدول ۱. پرایمرهای 16SrRNA مورد استفاده تایید نهایی سویه استرپتومایسیس

موحله	دما (درجه سیلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	-
اتصال	۵۵	۴۵	-
بازآرایی (گسترش)	۷۲	۶۰	۲۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	-

جدول ۲. برنامه دمایی مخلوط واکنش PCR برای ژن 16srDNA باکتری استرپتومایسیس.

جهت سترز به شرکت ماکروژن - ایران سفارش داده شد. پس از آن، پرایمرها توسط آب قطره 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.

### آماده سازی پرایمرها

جهت انجام PCR، در مرحله اول با توجه به سکانس ژن NCBI آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز که از سایت (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

نام ژن	توالی اولیگونوکلوتئیدی پرایمر ( $5' \rightarrow 3'$ )	اندازه طول قطعه (bp)
$C_{2,3}catI$	F=CGACCTGATCTCCATGACCGA R=TCAGGTCAGCACGGTCA	۲۳۸

جدول ۳. پرایمر مورد استفاده در این پژوهش.

نام ژن	مواد	حجم مورد نظر
	Distilled Water	$\mu\text{l}^4$
	Master mix	$\mu\text{l}^{10}$
$C_{2,3}cat1$	Forward each Primer(10 pimol)	$\mu\text{l}^1$
	Reverse each Primer(10 pimol)	$\mu\text{l}^1$
	DNA Streptomyces	$\mu\text{l}^4$
	Total volume	$\mu\text{l}^{20}$

جدول ۴. مخلوط واکنش PCR برای ژن  $C_{2,3}$ 

آشیابادی 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-PCR از شرکت سیناژن-ایران تهیه گردید. در این روش Cloning از یک وکتور خطی به نام PTG19-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین فرار 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 اشرشیا کلی اوریگامی دارا می‌باشد. در این روش نیاز به مرحله هضم آنزیمی نمی‌باشد و این مرحله حذف شده است (Asiabadi et al., 2014).

#### غربال‌گری سفید/آبی به منظور تایید صحت کلونینگ

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

#### مقادیر PCR

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

#### تعیین گونه استرپتومایسیس

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

#### کلون کردن ژن $C_{2,3}$ در باکتری اشريشیاکلی اوریگامی

در حالی 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 فازی 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

فیلوزنیتکی 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 گفتی 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 استرپتومایسیس شناسایی شد و سپس جدایه‌هایی که دارای ژن  $C_{2,3}$  بودند با استفاده از  $16S rRNA$  تعیین توالی شدند. بررسی مولکولی نشان داد، که این جدایه‌ها منسوب به گونه استرپتومایسیس است.

### بررسی میکروسکوپی نمونه‌های خاک به منظور جداسازی استرپتومایسیس

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

### تعیین هویت بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی

کلونی جدایه‌های مشکوک به استرپتومایسیس در مقایسه با کلنی استرپتومایسیس گرفته شده از بانک میکروسکوپی و همچنین زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت و این نتایج بیانگر صحت وجود جدایه‌ها در خاک‌های جمع آوری شده می‌باشد.

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 ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سیلیسیوس برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سیلیسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سیلیسیوس برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سیلیسیوس برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن  $16srRNA$  به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (*Montazer et al., 2019*).

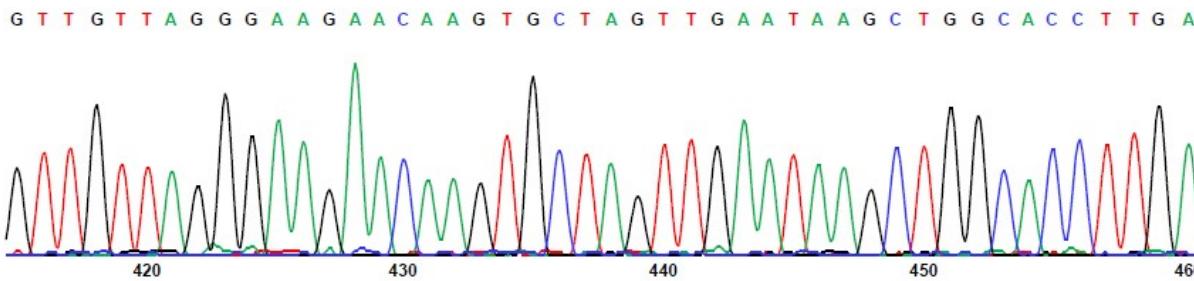
### رسم درخت فیلوزنی

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 DNA توالی‌یابی شده مستقیم و معکوس توسط نرم‌افزار Baser رشته واحدی (از'۵ به ۳') مرتب شد. توالی‌های حاصله با جدایه‌های 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 Clustal W هم ردیف شدند. آنالیز فیلوزنیکی پس از همردیف نمودن توالی‌ها توسط نرم‌افزار Clustal W با استفاده از برنامه‌های MEGA 5.10 درخت‌های

مورفولوژیکی و برای حصول اطمینان از استرپتومایسیس بودن ایزوله‌ها، توالی  $16srRNA$  آنها تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

### تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به استرپتومایسیس

همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد تعیین هویت بر اساس خصوصیات موفولوژیکی، میکروسکوپی، تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. در جهت تائید مشاهدات



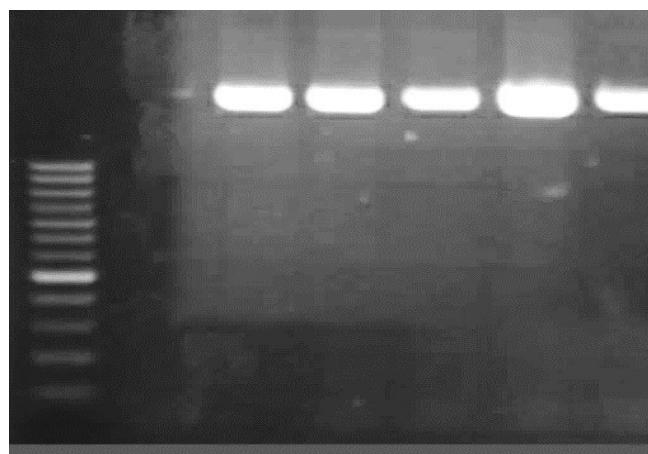
شکل ۱. نتیجه سکانس و بلاست جهت تعیین هویت مولکولی گونه استرپتومایسیس.

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

### 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 $C_{2,3}$

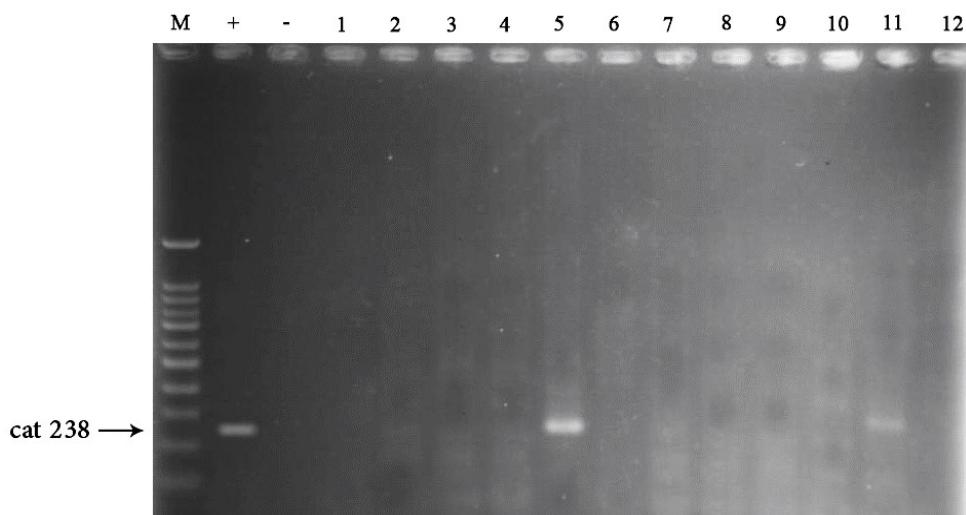
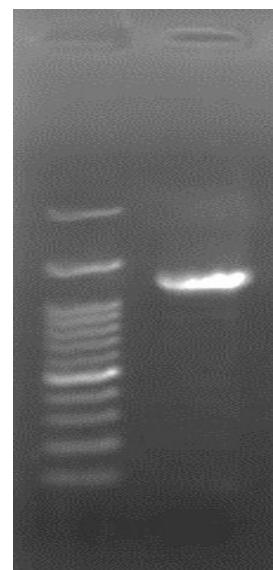


شکل ۲. نتیجه تائید استخراج DNA پس از انجام تست PCR

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

### 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 استرپتومایسیس جدا شده ۳ سویه واجد ژن  $C_{2,3}$  بود.

شکل ۳. نتیجه آزمون PCR برای بررسی فراوانی ژن  $C_{2,3}$ .

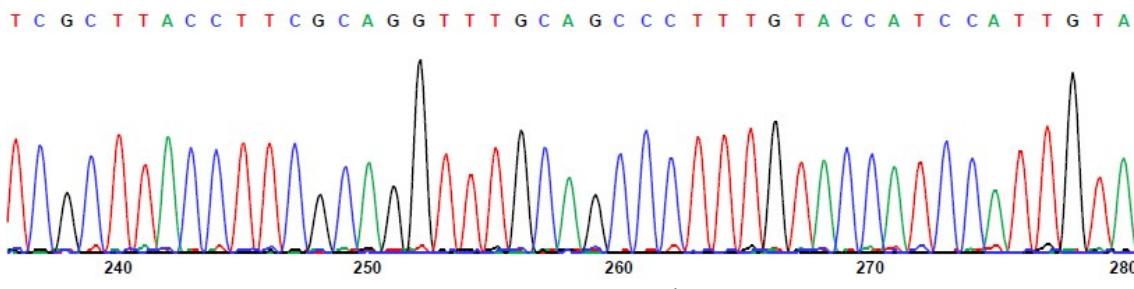
شکل ۴. نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی 16S به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتومایسنس.

به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلندی‌های 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).

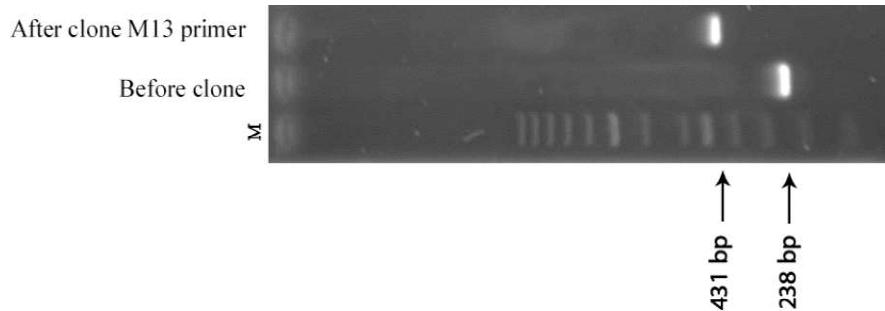
### تولید کلون‌های نوترکیب در T-A Cloning نتایج حاصل از کلونینگ ژن $C_{2,3}$

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

### تایید نتایج کلون به وسیله PCR و سکانس

شکل ۵. نتایج کلون ژن  $C_{2,3}$ 

شکل ۶. تایید کلونینگ توسط سکانس با پرایمر های M13 و کنور.



شکل ۷. تایید کلونینگ توسط PCR با پرایمر های M13

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 استرپتومایسیس با استفاده از ژن 16srRNA مورد بررسی

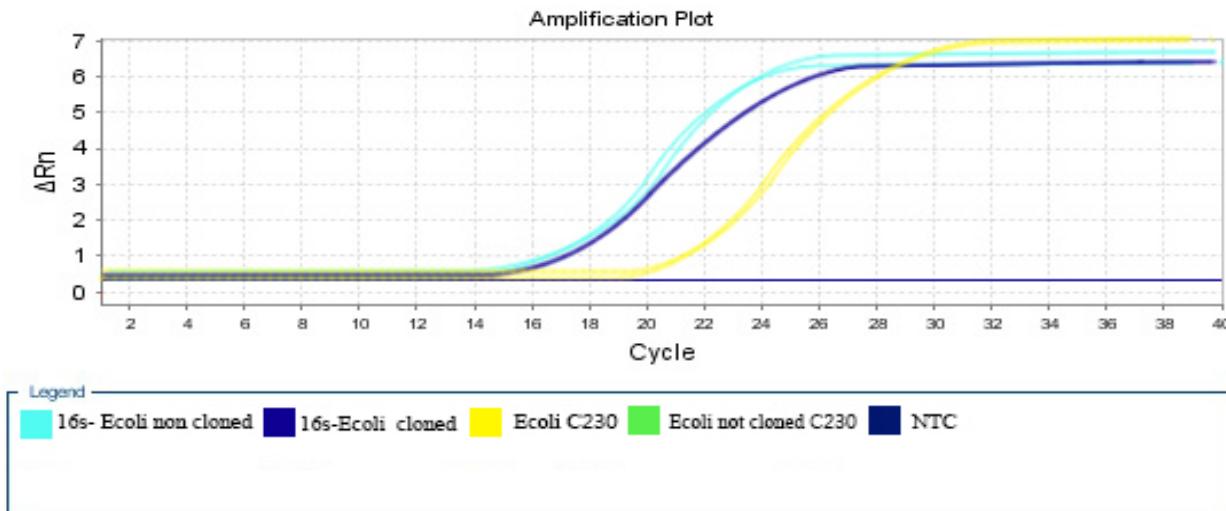
### تایید نتایج کلون به وسیله Real time PCR و سکانس

به منظور تایید نتایج کلونینگ RNA کلنی‌های 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 اشرشیا کلی اوریگامی تایید شد.

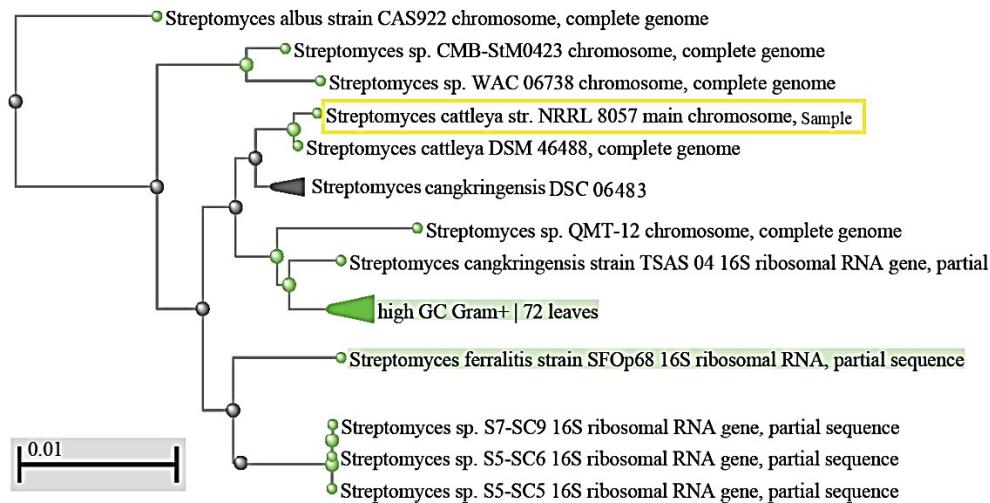
### نتایج Real time PCR

استرپتومایسیس که پیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آنها با هم بود (شکل ۹).

قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنیکی به روش پیوند همچویاری (NJ) نشان می دهد که گونه های



شکل ۸. نتایج Real time PCR



شکل ۹. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالي ژن 16srRNA

در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی نقش کلیدی ایفا می کنند. ترکیبات هیدروکربنی دارای اجزای مختلفی هستند که ترکیبات آروماتیک از فراوانترین آنها هستند و توسط آنزیم های دی اکسیژناز تخریب می شوند. گونه های استرپتومایسیس به فراوانی در طبیعت وجود دارند و از این رو چنانچه آنزیم مطلوب در این باکتری یافت شود، استفاده از آن در صنعت

**بحث**  
نفت خام یکی از مهمترین نهادهای در صنایع انرژی و شیمیابی است که با توجه به رسوبات طبیعی و انتشار گسترده گازهای سی 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

$C_{2,3}$  در *Escherichia coli DH 5\alpha* با استفاده از پروموتر لاک pUC18 بیان شد و محصول ژن آن توسط Phenyl DEAE-Sephacel و -Kromatografی 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 اسید آمینه را کد گذاری می کرد آزمایش های آنزیمی نشان داد که خلوص و مقاومت  $C_{2,3}$  جدا شده از استرپتومایسیس نسبت به سودوموناس بهتر بود (Huang et al., 2010). نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده سازگاری این میکروارگانیسم ها به محیط ریزوسفر و به دنبال آن ارتقا پتانسیل آن ها برای پاکسازی آلودگی های نفتی می باشد. نتایج این تحقیق به عنوان یک مرحله اساسی در راستای توسعه گیاه پالایی خاک های آلوده در جنوب غرب ایران محسوب می گردد.

در بررسی Heydari و همکاران میزان 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 هیدروکربن های آромاتیک حلقوی در محیط دریا پایداری زیادی داشته و در صورت ورود به بدن آبزیان در بافت های چربی تجمع می یابند (Montazer et al., 2019). سرتانزایی، 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 نفتالین و مقایسه توانایی آن ها در حذف این ماده انجام شد. به طور کلی نتایج نشان می دهد که باکتری های استرپتومایسیس جدا شده در حذف این آلاینده از محیط کشت توانا بوده و بنابراین می توان

مقرون به صرفه است. مصارف آن در پزشکی می تواند 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 کاتکول 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 مهم ترین 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  $C_{2,3}$  در رسوبات سطحی دریا بوهای مشخص گردید. نتایج نشان داد که رسوبات دریای بوهای حامل ژن های مربوط به زیر خانواده  $C_{2,3}$  بودند و نمونه ها از منطقه تخلیه خاک و مزرعه پرورش آبزی جدا شد (He et al., 2016). ترکیبات  $C_{2,3}$  خاک در مقایسه با نمونه های 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 استرپتومایسیس جداسازی نمودند. پس از استخراج RNA به وسیله PCR ژن مورد نظر تخلیص، سپس DNA آن استخراج و cDNA ساخته شد. ژن کاتکول در پلاسمید کاتابولیک نفتالین کلون شده و توالی یابی شد. ژن *ND6*

باز کد کننده تشکیل شده که یک پلی پپتید ۳۰۷ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند(Xie et al., 2014). ژن  $C_{2,3}$  در کروموزوم *Acinetobacter* sp ادغام شد و نوترکیب BS3- $C_{2,3}$  تشکیل شده می‌تواند پروتئین کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز را بیان کند. نوترکیب BS3-N- $C_{2,3}$  قادر به تخریب هیدروکربن‌های مختلف معطر و alkanes است. ویژگی و فعالیت بالای این آنزیم نشان می‌دهد 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 توپایی سویه pH استرپتومایسیس برای تخریب BTEX در دامنه  $C_{2,3}$  قلیایی بود. بر این اساس، کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز استخراج شده با استفاده از خواص جنبشی در پلاسمید تلقیح و به باکتری میزان متنقل و در *E. Coli DH5α* کلون شد. کاتکول تکثیر شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتیجتاً کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز به عنوان تجزیه کننده آلاینده‌های نفتی جدا شده از استرپتومایسیس خاک شناخته شد. این یافته ممکن است به منظور برآورده 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 استرپتومایسیس 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 MonoQ اشرشیاکلی بیان و پروتئین حاصل با ستون Matsumura et al., 2006 در مطالعه حاضر ژن  $C_{2,3}$  با استفاده از PCR تکثیر و پس از قرار گرفتن در وکتور آمده با استفاده از PCR به دست آمد. در پژوهشی 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 متنقل شد.

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 برحوردار بودند.

در مطالعه Babaei و همکاران تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی توسط گونه‌های میکروبی موجود در خاک آلوده به مواد نفتی به منظور بررسی قابلیت این دسته از میکرووارگانیسم‌ها در راستای حذف آلاینده‌های نفتی مورد مطالعه قرار گرفت. خاک آلوده به مواد نفتی از پالایشگاه کرمانشاه جمع آوری شده و تلقیح میکرووارگانیسم‌ها در سه مرحله کشت در محیط جامد، غنی‌سازی و کشت در محیط آبی انجام شد. حذف هیدروکربن‌های نفتی در شرایط هوایی در یک رآکتور بیولوژیکی محتوى میکرووارگانیسم‌ها کشت شده انجام گردید. رآکتور با ظرفیت شامل دو گونه ۳۶ لیتر به دو بخش هوایی و ته نشینی تقسیم شده و بر اساس سیستم لجن فعال کار می‌کند. باکتری‌های تلقیح شده که عمدتاً استرپتومایسیس هستند قادرند از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. همچنین تأثیر عواملی نظری دما، PH، مواد مغذی و زمان ماند بر عملکرد رآکتور مورد بررسی قرار می‌گیرد. تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری‌های تلقیح شده منجر به کاهش قابل ملاحظه سطح هیدروکربن‌های نفتی در پس‌آب خروجی می‌گردد (Babaei et al., 2013).

در مطالعه Xie و همکاران، کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز از باکتری استرپتومایسیس به عنوان آنزیم اصلی برای تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک جدا شد. ژن کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژناز از DNA استرپتومایسیس 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

افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب شود. همچنین بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه‌های جدید تولید کننده آنزیم کاتکول ۲ و ۳ دی اکسیژنаз می‌تواند منجر به پیدا کردن روش نوین حذف آلاینده‌های نفتی گردد.

### تضاد منافع

نویسنده‌گان اعلام می‌دارند که تضاد منافع وجود ندارد.

از جمله محدودیتهای این مطالعه می‌توان 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 می‌باشد. در نتیجه این مطالعه و در راستای ایجاد میزان نوترکیب با قابلیت بالای بیان، می‌تواند گام بزرگ در مسیر

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.

- 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 arvillae* 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., Macmillia, 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.



# 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<sup>1</sup>, Mehdi Nasirinejad<sup>1</sup>, Solaleh Sadat Mirsifi Fard<sup>2</sup>, Sarvenaz Falasfi<sup>3</sup>, Majid Sadeghpour<sup>4</sup>, Kumarss Amini<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Professional Doctorate Student in Veterinary Medicine, Clinic Department, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

<sup>2</sup>Master's Degree in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Department of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Senior Expert in Microbiology, Scientific Member of the Iranian Microbiology Association, Tehran, Iran

<sup>5</sup>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

**Background 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<sub>2,3</sub>*) 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<sub>2,3</sub>* gene. The *C<sub>2,3</sub>* 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<sub>2,3</sub> 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 Altn 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](mailto:ebrahim.hossini@yahoo.com), Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7581-5835>