https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
13rd Year, Vol. 13, No. 49, 2024 pp. 111-129
Received: 01/03/2023 Accepted: 18/04/2023

(Research Paper)

Isolation of a Moderately Halophilic *Bacillus* sp. G362 from Garab HotSpring in Northeastern Iran and Characterization of Thermostable, Broad Range, and pH-Stable of Its Endoglucanase

Nazanin Gholampour-Faroji
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
nazanin.gholampoor@yahoo.com
Jafar Hemmat *
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
j.hemmat@gmail.com
Aliakbar Haddad-Mashadrizeh
Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
a.haddad@um.ac.ir
Nazanin Kazeminejad
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
nazanin.kazeminejad@gmail.com

Abstract :

The stability of enzymes to heat and pH is one of the most important determining factors in their application. In this research, achieving thermostable and pH-stable cellulase was aimed by screening in one of the Hot springs of Garab in northeast Iran. The samples collected from one of the Hot springs of Garab, in Razavi Khorasan province in Iran, were used to isolate, screen, and identify bacteria capable of producing thermostable cellulase. The cultures were cultured at 45°C and under aerobic conditions. The bacteria were isolated on a CMC agar medium. Initial screening of the isolates was done based on specific culture medium, salt tolerance, and temperature changes. Then, their additional screening was done by evaluating endoglucanase activity at different temperatures and pH using qualitative and quantitative methods. Finally, the molecular identification of the selected isolate was done by 16S rRNA gene sequencing. The results of this study, led to the introduction of a selected strain identified primarily as *Bacillus* sp. G362, a moderate halophile growing in 6%(w/v) salt concentration. It showed high endoglucanase stability at 55°C and high stability in a wide range of acidic and alkaline pH. The studied Hot spring, like some other Iranian

* Corresponding Author
2030-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Gholampuor Faroji, N., Hemmat, J., Haddad-Mashadrizeh, A., & kazeminejad, N. Isolation of a moderately halophilic Bacillus sp. G362 from Garab Hot spring in northeastern Iran and characterization of thermostability and broad range pH stability of its endoglucanase. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (49): 111-129. http://dx.doi.org 10.22108/BJM.2023.137002.1528

Hot springs, has cellulase-producing bacteria, which *Bacillus* sp. G362 is capable of producing endoglucanase showing the thermostablity and pH stability at a wide range of alkaline and Acidic pH. In addition, the specific endoglucanase gene of G362 *Bacillus* sp. can be identified through molecular methods and used for further research including structural studies. It may even be used as a protein template in protein engineering.

Keywords: cellulose, carboxymethyl cellulose, thermostable enzymes, cellulase, salt tolerance

Introduction:

Cellulases are one of the most widely used industrial enzymes that must show stability against special process conditions such as high temperature and extreme pH values (1). Therefore, obtaining sources of cellulases that are resistant to high temperatures and extreme pH, to denaturing agents such as organic solvents, detergents, and inhibitors, is interesting (1, 2). While fungal sources have traditionally been explored, recent focus has shifted towards bacterial origins due to certain advantages in industrial production processes (3, 4). The extensive presence of cellulolytic bacteria in diverse natural habitats such as soil, lakes, animal waste, decomposing materials, and the digestive systems of certain animals has been reported (5). In addition, hot springs, serving as the main habitat for thermophilic bacteria, have been of considerable interest in obtaining thermophilic cellulase-producing bacteria (6). The stability of enzymes to heat and pH is one of the most important determining factors in their application. In this research, the achievement of thermostable and pH-stable cellulase was aimed by screening in one of the Hot springs of Garab located in the northeast of Iran.

Materials and Methods:

The samples collected from one of the Hot springs of Garab, in Razavi Khorasan province, Iran, were used to isolate, screen, and identify the bacteria producing thermostable cellulase. The cultures were cultured at 45°C and under aerobic conditions. The bacteria were isolated on CMC agar medium according to a previously described method (8). Initial screening of the isolates was done based on specific culture medium, salt tolerance, and temperature changes. To cultivate, isolate, and determination of the growth temperature, all bacteria were incubated at temperatures of 37, 45, 50, and 55°C. Subsequently, all isolates were cultured on modified Mandel's agar with salt concentrations of 0.5%, 3%, and 6%. Finally, the molecular identification of the selected isolate was done by Molecular identification of the selected strain was carried out by determining the 16S rRNA gene sequence. Nucleotide homogeneity based on 16S rRNA sequences was performed using EzTaxon (https://www.ezbiocloud.net) (12). Phylogenetic trees were constructed using MEGA X (13). To compare the thermal stability of initially selected strains, the residual endoglucanase activity was measured at temperatures of 55, 60, 70, and 80 °C for 1, 2, and 3 hours (h). For pH stability comparison, enzyme solutions were evaluated at different pH levels (4, 7, and 10) for residual endoglucanase activity at 2, 4, and 6 h. Endoglucanase activity was assessed using the DNS method (8, 10, 14). Graphs and analyses were performed using the GraphPad Prism 8. A significance level of $P < 0.05$ was considered for all samples as indicative of a significant difference.

Results :

Two *Bacillus* isolates, G3M1 and G362, were selected based on comparative assessments of endoglucanase activity among 8 isolates that produced endoglucanase. Subsequently, their thermal stability was compared at temperatures of 60, 70, and 80 °C during a 3h heat treatment period, at

one-hour intervals. The residual activity and thermal stability of strains G362 and G3M1 significantly decreased compared to their respective controls ($p < 0.0001$). Conversely, in G3M1, its thermal stability increased significantly compared to the control at 60 °C, after 3 hours ($p < 0.0001$). At 70 °C, G3M1 maintained only 50% of its activity after 2 hours, while G362 exhibited a significant reduction in thermal stability after 3 hours at 60 °C ($p < 0.0001$) and lost its activity within the first hour at 70 °C. Both strains G362 and G3M1 completely lost their enzymatic activities at 80 °C, as observed in Figure 1.

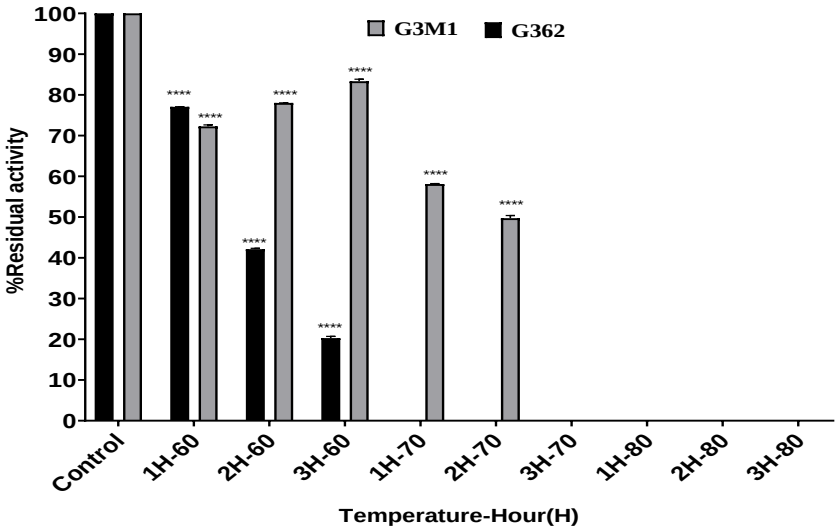


Figure 1. The thermal stability of endoglucanase activity in selected isolates. The control group represents the enzyme without any heat treatment. The reference points include H-60 (at 60°C), H-70 (at 70°C), and H-80 (at 80°C) for durations of 1, 2, and 3 h of heat treatment. The notation **** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0001$).

The enzyme stability of G362 and G3M1 strains were investigated at pH levels of 4, 7, and 10 over a period of 6 hours. In pH levels 7 and 4, the enzyme activity did not show a significant change during the initial 2 h. Specifically, the remaining enzyme activity relative to their respective controls was not statistically significant ($p > 0.05$). The pH effect on endoglucanase activity for the selected isolates at pH 4 indicated that the remaining endoglucanase activity in strain G362 was 80.85% and 80.65%, over 4 and 6 hours, respectively, showing a significant preservation of endoglucanase activity. In contrast, for strain G3M1, the residual activities were 96% and 93%, indicating a significant decrease in activity. However, no decline in activity was observed over the 6 h period (Figure 6). As the pH increased to 10, the remaining endoglucanase activities for G362 were 91.62%, 88.51%, and 88.71%, over periods of 2, 4, and 6 hours, respectively. Meanwhile, for G3M1, the remaining endoglucanase activities were 88.03%, 87.97%, and 68.78%, respectively, demonstrating a significant reduction in activity. However, the endoglucanase activity of strain G362 was significantly preserved at alkaline pH (Figure 2). These assessments revealed the pH ability of the endoglucanase of selected strains (G362 and G3M1) over a wide pH range. Overall, the results suggested that the endoglucanase produced by strains G362 and G3M1 exhibit resistance to both acidic and alkaline conditions within the pH range of 4 to 10. Additionally, the tolerance of strain G362 to a 6% salt concentration was significant compared to the 0.5% tolerance of G3M1, furthermore, its substantial enzyme activity makes G362 a preferred strain for further studies. The

Strain G362 has been registered in the NCBI (GenBank) based on its 16S rRNA sequence, with the accession number OP957018.1. The nucleotide sequence comparison revealed a remarkable 99.93% similarity between the 16S rRNA sequence of strain G362 and those of *Bacillus cabrialesii* TE3, *Bacillus tequilensis* KCTC 13622, *and Bacillus inaquosorum* KCTC 13429 as well as 99.86% similarity with the *Bacillus subtilis.*

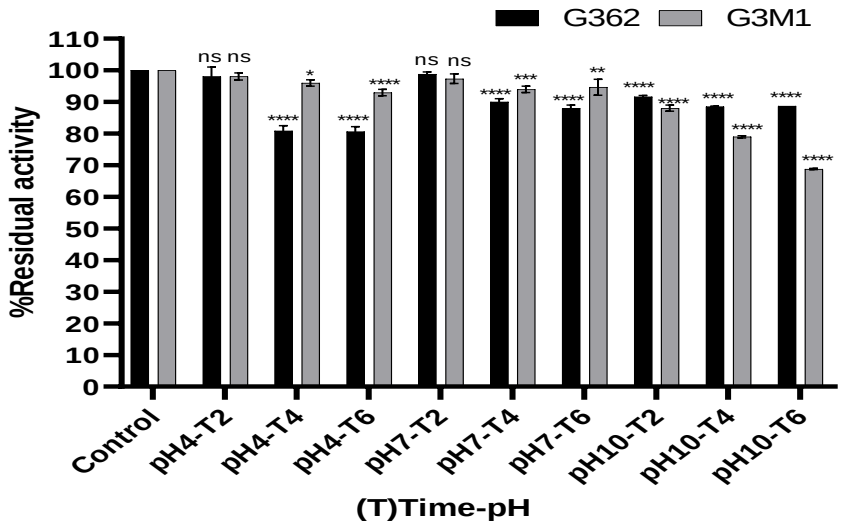


Figure 2. The residual endoglucanase activity in selected isolates over a 6h period, at intervals of 2, 4, and 6 h and pH 4, pH 7, and pH 10. * indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.016$). ** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0013$). *** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0004$). **** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0001$). ns indicates a non-significant level.

Discussion and Conclusion:

The studied Hot spring, like some other Iranian Hot springs, has cellulase-producing bacteria, which *Bacillus* sp. G362, a moderate halophile growing in 6%(w/v) salt concentration is capable of producing endoglucanase showing thermostability and pH stability at a wide range of alkaline and Acidic pH. These characteristics make *Bacillus* sp. G362 as a candidate for more studies and applications. Moreover, the endoglucanase-specific gene of the isolate can be cloned and expressed for further investigation and even may be used as an enzyme model in protein engineering.

زیست‌شناسی میکروبی
سال سیزدهم، شماره ۴۹، ۱۴۰۳، ۱۲۹-۱۱۱
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۹

مقاله پژوهشی

جداسازی سویه *باسیلوس* G362 نمک‌دوست نسبی از چشمه آب گرم گراب در شمال شرق ایران و تعیین خصوصیات اندوگلوکاناز پایدار در حرارت و طیف وسیع pH آن

نازنین غلامپور فاروجی: دانشجوی دکتری پژوهشکدهٔ زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
nazanin.gholampoor@yahoo.com
جعفر همت*: استادیار گروه زیست فناوری صنعتی و محیط زیست، پژوهشکدهٔ زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
j.hemmat@gmail.com
علی اکبر حداد مشهد ریزه: استادیار سلولی و مولکولی، گروه پژوهشی زیست فناوری صنعتی، پژوهشکدهٔ زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
a.haddad@um.ac.ir
نازنین کاظمی نژاد: کارشناس گروه زیست فناوری صنعتی و محیط زیست، پژوهشکدهٔ زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
nazanin.kazeminejad@gmail.com

چکیده

پایداری آنزیم‌ها به حرارت و pH از مهم‌ترین شاخصه‌های تعیین‌کننده در کاربرد آنهاست. در این تحقیق دستیابی به سلولاز پایدار در برابر حرارت و pH، با غربالگری در یکی از چشمه‌های گراب واقع در شمال شرق ایران هدف‌گذاری شد.

نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از یکی از چشمه‌های آب گرم گراب، در استان خراسان رضوی در ایران، برای جداسازی، ارزیابی و شناسایی باکتری‌های قادر به تولید سلولاز پایدار در برابر حرارت استفاده شدند. کشت‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری و جدایه‌ها روی محیط *CMC* آگار جداسازی شدند. غربالگری اولیه جدایه‌ها مبتنی بر محیط کشت اختصاصی، تحمل‌پذیری به نمک و دما انجام شد. سپس غربالگری تکمیلی آنها با ارزیابی فعالیت اندوگلوکانازی در دماها و *pH* مختلف به روش کیفی و کمی سنجش انجام شد. در نهایت، شناسایی مولکولی جدایه انتخابی با روش تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق منجر به معرفی سویه انتخابی نمک‌دوست نسبی با نام انتسابی G362 *Bacillus sp.* با پایداری قابل توجه فعالیت اندوگلوکانازی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و پایداری در طیف وسیعی از pH اسیدی و قلیایی شد. چشمه مطالعه‌شده مانند برخی از چشمه‌های آب گرم ایران دارای باکتری مولد سلولاز است که سویه منتخب این تحقیق، با قابلیت رشد در نمک ۶ درصد و تولید آنزیم اندوگلوکاناز مقاوم به حرارت و پایداری عملکردی بالا در طیف وسیع pH قلیایی و اسیدی می‌تواند برای مطالعات بیشتر به کار گرفته شود. علاوه بر این، ژن اختصاصی اندوگلوکاناز جدایه *Bacillus sp.* G362 را می‌توان شناسایی مولکولی کرد و برای تحقیقات بیشتر از جمله مطالعات ساختاری استفاده نمود. حتی ممکن است به‌عنوان یک الگوی پروتئین در مهندسی پروتئین استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سلولز، کربوکسی متیل سلولز، آنزیم‌های مقاوم به حرارت، سلولاز، تحمل‌پذیری به نمک

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

غلامپور فاروجی، نازنین، همت، جعفر، حداد مشهد ریزه، علی اکبر، کاظمی نژاد، نازنین. جداسازی سویه باسیلوس G362 نمک دوست نسبی از چشمه آب گرم گراب در شمال شرق ایران و تعیین خصوصیات اندوگلوکاناز پایدار در حرارت و طیف وسیع pH آن. *زیست‌شناسی میکروبی*. ۱۴۰۳، ۱۳ (۴۹): ۱۱۱-۱۲۹.
http://dx.doi.org10.22108/BJM.2023.137002.1528

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

مقدمه

سلولازها به‌عنوان یکی از پرکاربردترین آنزیم‌های صنعتی هستند که باید در برابر شرایط خاص فرایندها ازجمله دمای بالا و pH پایین یا بالا پایداری نشان دهند (۱)؛ بنابراین، دستیابی به منابع سلولازهای مقاوم به حرارت و pH، به عوامل دناتوره‌کننده مانند حلال‌های آلی، شوینده‌ها و بازدارنده‌ها شایان توجه محققان است (۱، ۲). گرچه قبلاً به منابع قارچی توجه شده است، غربالگری در منابع جدید با منشأ باکتریایی به‌واسطه برخی مزایای انجام فرایندهای تولیدی نیز مدنظر بوده است (۳، ۴) و حضور گسترده باکتری‌های سلولولیتیک در زیستگاه‌های طبیعی متنوع مانند خاک، دریاچه‌ها، فضولات حیوانات، مواد درحال تجزیه، دستگاه گوارش برخی حیوانات ازجمله موریانه گزارش شده است (۵). علاوه بر این، چشمه‌های آب گرم به‌عنوان زیستگاه اصلی باکتری‌های اکسترموفیل گرمادوست (۶)، برای دستیابی به باکتری‌های تولیدکنندهٔ سلولاز مقاوم به حرارت درخور توجه بسیاری از محققان بوده است (۶-۱۳).

ترموفیل‌ها موجوداتی با قابلیت زندمانی و رشد بهینه به‌ترتیب در دمای ۴۱ تا ۱۲۲ و ۶۰ تا ۱۰۸ درجه سانتی‌گراد هستند که در سه گروه گرمادوست‌های متوسط، گرمادوست شدید و فراگرمادوست‌ها طبقه‌بندی می‌شوند که به‌ترتیب دارای رشد بهینه در دامنه دمایی ۶۰-۵۰، ۸۰-۶۰ و ۱۱۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد هستند (۱۴). با هدف شناسایی تنوع زیستی و بهره‌برداری از ذخایر ژنتیکی ایران، در مطالعه حاضر یکی از چشمه‌های آب گرم گراب واقع در شمال شرق کشور در خراسان رضوی مطالعه شد تا ضمن ارزیابی پتانسیل باکتریایی تجزیه‌کنندهٔ سلولز آن بتوان در صورت امکان باکتری یا باکتری‌هایی با توان تولید آنزیم سلولاز مقاوم به حرارت و pH قابل توجه جداسازی کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها:

نمونه‌برداری از چشمه‌های آب گرم شمال شرق واقع در دو منطقه مختلف با نام‌های گرماب (طاقانکوه) و گراب انجام شد (شکل ۱). مختصات جغرافیایی، دما و pH محل در زمان نمونه‌برداری ثبت شد. موقعیت جغرافیایی گراب و طاقانکوه در جدول ۱ ارائه شده و به‌ترتیب با دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثبت شدند. نمونه‌گیری در دو فصل مختلف پاییز و زمستان انجام شد که با pH ۶/۶-۵/۵ متغیر بود. گفتنی است دمای این چشمه تا ۵۰ درجه در سایر فصول گزارش شده است. در منطقه گراب، چشمه‌های متعدد به فاصله ۳۰۰-۵۰ متر از چشمه اصلی منشعب شده‌اند که در این تحقیق از منطقه G3 آن با طول و عرض جغرافیایی به‌ترتیب "6684`63.°59 و "8392`98.°35، pH بین ۶/۶-۵/۵ و دمای ۵۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد نمونه‌گیری و در ظروف شیشه‌ای استریل و فلاسک در حداقل زمان به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی سویه‌های باکتریایی مولد سلولاز، طبق روش قبلاً معرفی‌شده انجام شد (۸). برای کشت و جداسازی باکتری‌ها، گرمخانه‌گذاری در دماهای ۳۷، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در مرحله بعدی، همه جدایه‌ها روی محیط کشت مندلس (۳) با درصدهای نمک ۰/۵ درصد، ۳ درصد و ۶ درصد کشت داده شدند (جدول ۲). غنی‌سازی باکتریایی در محیط کشت حاوی سبوس گندم انجام شد. سپس باکتری‌های جداسازی‌شده، روی همان محیط کشت مندلس خالص‌سازی شدند و باکتری‌های خالص‌سازی‌شده، روی همان محیط کشت جداشده کشت داده شدند.

برای تعیین دمای رشد، همه باکتری‌های در دماهای ۳۷، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری

http://dx.doi.org10.22108/BJM.2023.137002.1528

شدند. در مرحله بعدی، همه جدایه‌ها روی محیط کشت مندلس تغییریافته با درصدهای نمک ۰/۵ درصد، ۳ درصد و ۶ درصد کشت داده شدند.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری

Table 1- Geographic coordinates of sampling points

منطقه	استان	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	pH	دما (سانتی‌گراد)
گراب ۳ (G3)	خراسان رضوی	۳۵°.۹۸`۸۳۹۲"	۵۹°.۶۳`۶۶۸۴"	۵/۶–۵/۶	۵۰–۲۵
طاقانکوه (گرماب) (T1)	خراسان رضوی	"۱۴۱.۲۹`۳°۳۶	"۵۵.۸۴`۱۴°۵۸	۶	۳۰

شکل ۱- موقعیت جغرافیایی چشمه گراب ۳

Figure 1- Geographical location of Garab 3 hot spring

جدول ۲- ترکیبات موجود در محیط کشت مندلس

Table 2- Compounds in Mendels culture medium

ردیف	ترکیب	مقدار
۱	$(NH_4)_2SO_4$	۱/۴ g L^{-1}
۲	KH_2PO_4	۲ g L^{-1}
۳	$CaCl_2$	۰/۳ g L^{-1}
۴	$MgSO_4$	۰/۳ g L^{-1}
۵	$ZnSO_4.7H_2O$	۱ mL^{-1}
۶	$CoCl_2.6H_2O$	۱ mL^{-1}
۷	$FeSO_4.7H_2O$	۱ mL^{-1}
۸	$MnSO_4.7H_2O$	۱ mL^{-1}
۹	Proteose peptone	۰/۷۵ g L^{-1}
۱۰	Tween 80	۲ g
۱۱	CMC-Na	۱۰ g L^{-1}
۱۲	Urea	۰/۳ g L^{-1}

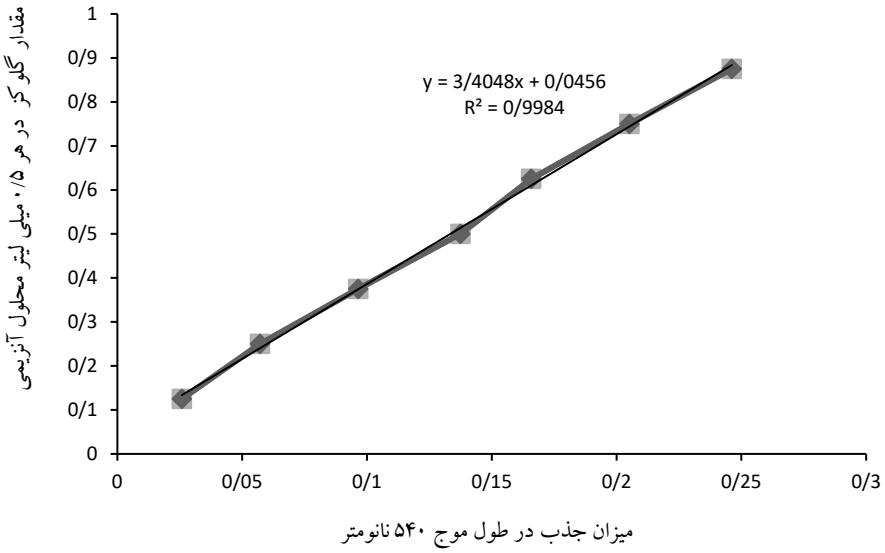
http://dx.doi.org 10.22108/BJM.2023.137002.1528

ارزیابی اولیه فعالیت اندوگلوکانازی و غربالگری جدایه‌ها: برای ارزیابی تولید آنزیم در جدایه‌ها، ابتدا جدایه‌ها در محیط پیش‌کشت کشت داده شدند که حاوی ترکیبات موجود در محیط کشت Mendelsمطابق جدول ۲ بودند. سپس به میزان ۲ درصد از پیش‌کشت به محیط کشت اصلی تولید آنزیم تلقیح شد که مشابه با همان محیط مندلس بود، با این تفاوت که تنها منبع کربن آن سبوس گندم (۲/۵ درصد) بود و سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۴۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از آن، محیط کشت‌های حاوی آنزیم با دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی حاصل به‌عنوان محلول آنزیمی در مراحل بعدی استفاده شد. غربالگری اولیه باکتری‌های جداشده براساس شاخص فعالیت کیفی اندوگلوکاناز روی محیط حاوی کربوکسی متیل سلولز ۰/۱ درصد و آگارز با رنگ‌آمیزی قرمز کنگو و براساس بزرگی و شفافیت هاله انجام شد که نشان‌دهندهٔ فعالیت سلولازی بود (۸).

سنجش کمی فعالیت اندوگلوکانازی: با هدف غربالگری و مقایسه فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌ها میزان فعالیت آنزیم‌ها با یکدیگر مقایسه شدند (شکل ۲). برای سنجش فعالیت آنزیم از روش میلر و حضور معرف دی‌نیترو سالسیلیک اسید (DNS[1]) استفاده شد. فعالیت اندوگلوکاناز به روش DNS ازطریق مقدار قندهای کاهنده آزادشده در طول هیدرولیز اندازه‌گیری شد. در این روش آنزیم‌های خام در معرض سوبسترای کربوکسی متیل سلولز و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. برای توقف واکنش محلول DNS به آن اضافه شد (۱۵). یک واحد فعالیت آنزیم سلولاز معادل مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی یک میکرومول گلوکز در یک دقیقه از سوبسترا در شرایط آزمایش است. برای غربالگری اولیه سویه‌های مولد آنزیم، از اندوگلوکاناز تجاری شرکت نوآزایم (Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

شناسایی مولکولی سویه منتخب: در گام نخست رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی برای شناسایی سویه‌ها بهره‌برداری شد (۱۶). در ادامه و با هدف شناسایی مولکولی باکتری منتخب مولد سلولاز، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی شامل 4f: 5'- TATCGGAGAGTTTGATCCTGG -3' و 1541r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' به‌منظور تکثیر ژن *16S rRNA* انجام شد. به این منظور، DNA ژنومی جدایه منتخب با استفاده از کیت (PGA Bacterial DNA Extraction) استخراج شد. برنامه PCR در ۳۵ چرخه بعد از دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، شامل دناتوراسیون، اتصال و طویل‌سازی در دمای ۹۳، ۵۳ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب برای مدت ۴۵، ۶۰ و ۹۰ ثانیه و با مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای بررسی محصول PCR الکتروفورز انجام شد. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت FavorPrep purification Mini kit صورت گرفت. پس از تخلیص، غلظت DNA ژنومی در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجش شد و به‌منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. همگون‌یابی نوکلئوتیدی براساس توالی‌های *16S rRNA* با استفاده از پایگاه اطلاعاتی EzTaxon انجام شد (https://www.ezbiocloud.net). درخت فیلوژنتیک با استفاده از نتایج حاصل از مقایسه توالی‌ها براساس پایگاه

داده EzBiocloud (۱۷) و توسط نرم‌افزار MEGA X 11 ساخته شد (۱۸). آنالیز فیلوژنی با روش آماری Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ بوت استرپ (Bootstrap) انجام شد.



شکل ۲- نمودار منحنی استاندارد گلوکز

Figure 2- Glucose standard curve diagram

پایداری حرارتی اندوگلوکانازها: برای مقایسه پایداری حرارتی باکتری‌های منتخب اولیه، فعالیت باقی‌مانده اندوگلوکانازی آنها طی تیمار حرارتی در دماهای ۵۵، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد با فواصل زمانی ۱، ۲ و ۳ ساعت انجام شد. آنزیم اولیه بدون هیچ‌گونه تیمار حرارتی به‌عنوان مبنا و ۱۰۰ درصد فعالیت در نظر گرفته شد. سپس سنجش فعالیت آنزیمی نمونه‌های تیمارشده با روش DNS ارزیابی شد (۸، ۱۵، ۱۹).

ارزیابی پایداری حرارتی pH اندوگلوکانازها: برای مقایسه پایداری pH، محلول‌های آنزیمی در pHهای مختلف شامل ۴، ۷ و ۱۰ با غلظت ۰/۰۵ مولار تیمار شدند. فعالیت باقی‌مانده اندوگلوکانازهای جدایه‌ها، طی ۱، ۲ و ۳ ساعت تیمار، در شرایط استاندارد فعالیت آنزیم توسط بافرهای pH مختلف و با روش DNS بررسی شد (۸، ۱۵).

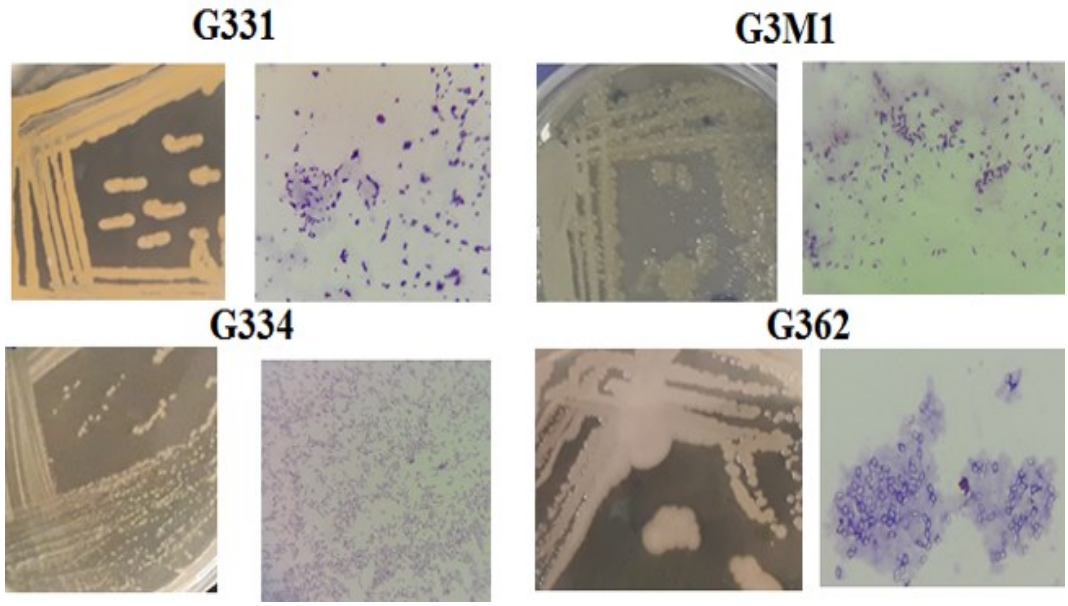
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تمامی آزمون‌های انجام‌شده در این تحقیق در سه تکرار انجام شدند. آنالیزها به روش One-way ANOVA و Two-way ANOVA انجام شدند. $P < 0/05$ برای نمونه‌ها به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی باکتری: براساس غربالگری اولیه از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از چشمه‌های طاقانکوه، باکتری هیدرولیزکنندهٔ سلولز در شرایط استفاده‌شده جداسازی نشد؛ با وجود این، این غربالگری روی نمونه‌های مرتبط با چشمه G3 آب گرم گراب منجر به رشد، جداسازی و خالص‌سازی ۸ جدایه باکتریایی تولیدکنندهٔ سلولاز پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد شد (جدول ۱). طی

غربالگری ثانویه این جدایه‌ها روی محیط کشت معرفی‌شده و در محیط نمکی ۰/۵ درصد، ۳ درصد و ۶ درصد به‌ترتیب ۱، ۵ و ۲ جدایه جداسازی شد (جدول ۱).

تعیین مشخصات میکروسکوپی جدایه‌ها: شناسایی اولیه باکتری‌های رشدیافته براساس فنوتیپ و رنگ‌آمیزی گرم (شکل ۳)، گرم مثبت بودن جدایه‌های رشدیافته شامل G3M1، G331، G334، G335 و G362 را آشکار کرد. براساس این ارزیابی‌ها ۲ جدایه شامل G333 و G361 گرم منفی تشخیص داده شدند. همچنین، مشاهدات میکروسکوپی نشان داد دو جدایه G362 و G3M1 جزء باسیل‌های گرم مثبت تشکیل‌دهندهٔ اسپور هستند.



شکل ۳- ارزیابی‌های میکروسکوپی برخی جدایه‌های رشدیافته پس از رنگ‌آمیزی گرم

Figure 3- Microscopic evaluations of some isolates grown after gram staining

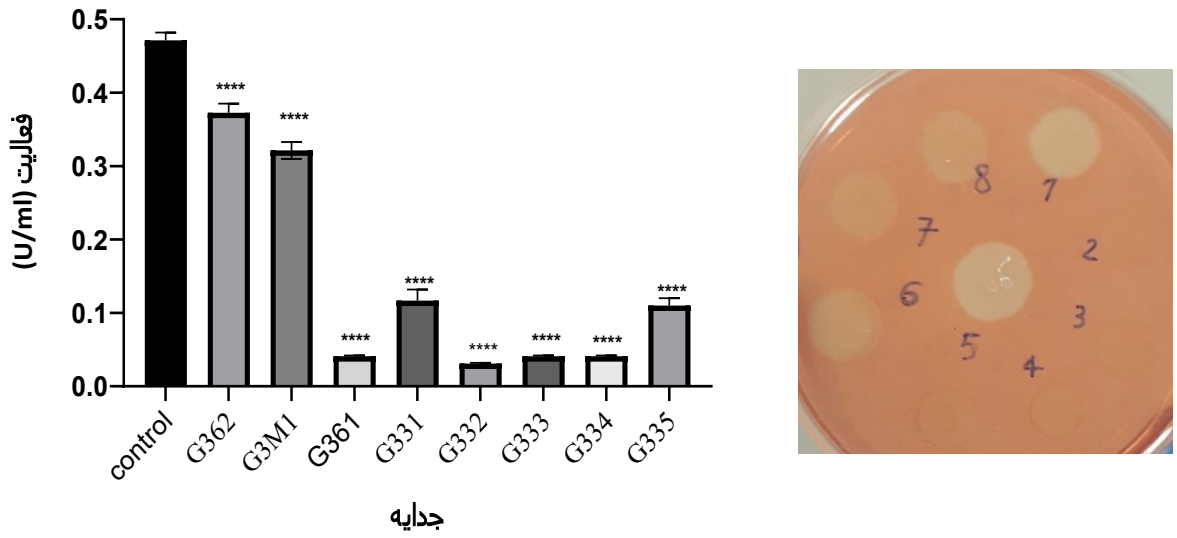
ارزیابی فعالیت آنزیمی: سنجش فعالیت اندوگلوکانازی ۸ جدایه انتخابی به روش کیفی و کمی در مقایسه با آنزیم صنعتی به‌عنوان کنترل انجام شد. ارزیابی اندازه و شفافیت هاله ناشی از فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌های انتخابی روی بستر حاوی کربوکسی متیل سلولز ۰/۱ درصد به‌عنوان شاخص کیفی مبنای اولیه انتخاب جدایه‌های فوق برای آزمون‌های تکمیلی قرار گرفت (شکل ۴). علاوه بر این، میزان فعالیت کمی جدایه با روش DNS انجام شد که در مجموع چهار جدایه شامل G362، G3M1، G331 و G335 به‌ترتیب با فعالیت ۰/۳۷، ۰/۳، ۰/۱۲ و ۰/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌لیتر فعالیت بیشتری نشان دادند (جدول ۳ و شکل ۴-الف). براساس این، می‌توان چنین جمع‌بندی کرد که بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی به‌ترتیب در جدایه‌های G362 و G3M1 بود. برای ارزیابی تحمل‌پذیری و رشد باکتری‌ها در نمک، تمامی جدایه‌های مولد اندوگلوکاناز در ۳ محیط کاملاً مشابه با میزان نمک‌های متفاوت ۰/۵، ۳ و ۶ درصد کشت داده شدند و هریک از این جدایه‌ها قادر به تحمل نمک متفاوتی بودند که در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

http://dx.doi.org10.22108/BJM.2023.137002.1528

جدول ۳- مشخصات، قابلیت رشد و فعالیت جدایه‌های مولد اندوگلوکاناز

Table 3- Characteristics, growth ability and activity of endoglucanase producing isolates

	نام جدایه	تحمل نمک ٪	دمای رشد	نوع گرم	فعالیت اندوگلوکانازی ($\mu mol\ min^{-1}\ mL^{-1}$)
۱	G362	۶	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۳۷
۲	G361	۶	۳۷/۴۵	منفی	۰/۰۴
۳	G332	۳	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۰۳
۴	G333	۳	۳۷/۴۵	منفی	۰/۰۴
۵	G334	۳	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۰۴
۶	G3M1	۰.۵	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۰۳
۷	G335	۳	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۱
۸	G331	۳	۳۷/۴۵	مثبت	۰/۱۲
–	آنزیم صنعتی (کنترل)	–	–	–	۰/۴۷



(B) ب (A) الف

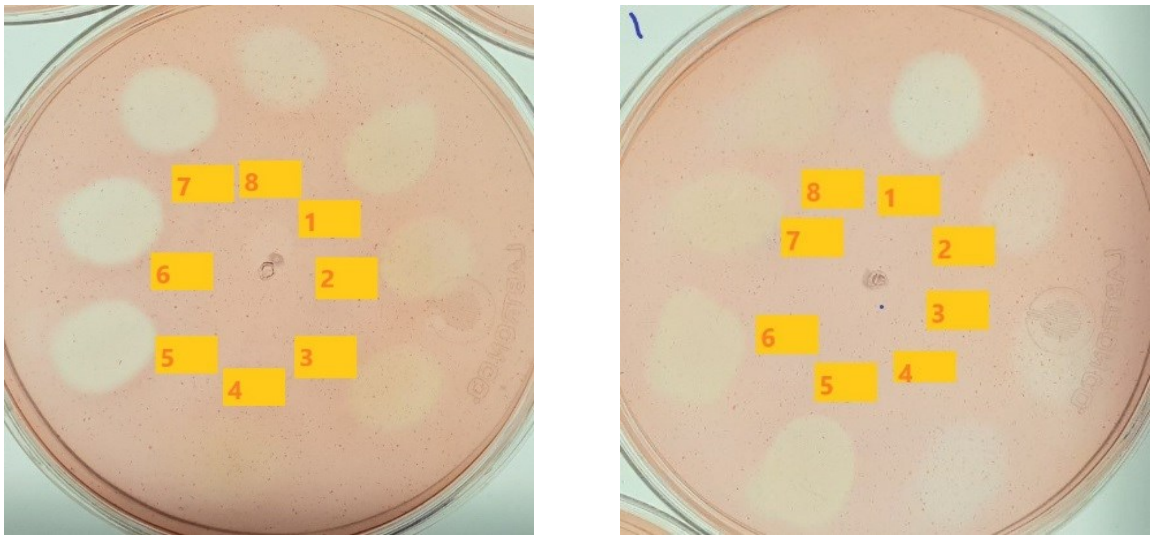
شکل ۴- سنجش کیفی (الف) و کمی (ب) فعالیت اندوگلوکانازی ۸ جدایه . الف) مرکز پلیت آنزیم صنعتی به‌عنوان کنترل مثبت. اعداد 8-1 نشان‌دهندهٔ کد جدایه‌ها به شرح زیر هستند: 1:G362, 2: G332, 3:G333, 4: G334, 5: G334, 6: G3M1, 7:G335, 8: G331. ب) نمودار فعالیت اندوگلوکانازی ۸ جدایه باکتریایی. علامت **** بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.0001$).

Figure 4- Qualitative (A) and quantitative (B) measurement of endoglucanase activity of eight isolates. A) industrial enzyme in the center of plate as a positive control. The numbers 1-8 show the code of isolates as follows: 1:G362, 2:G332, 3:G333, 4:G334, 5:G334, 6:G3M1, 7:G335, 8:G331. b) endoglucanase activity of eight bacterial isolates. The sign **** indicates the level of significant difference with the control group ($p < 0.0001$).

ارزیابی پایداری حرارتی اندوگلوکانازها:

برای ارزیابی اولیه پایداری حرارتی اندوگلوکاناز دو جدایه منتخب از لحاظ فعالیت کمی، یعنی G362 و G3M1 میزان فعالیت باقی‌مانده طی تیمار حرارتی در

دماهای ۵۵ درجه سانتی‌گراد طی سه ساعت، در مقابل دو سویه دیگر مولد سلولاز مقاوم حرارت (G162 و G25031) بررسی شد که در تحقیق مکمل در دست انتشار به دست آمده است. نتایج فعالیت باقی‌مانده جدایه‌های انتخابی براساس آزمون کیفی شفافیت و اندازه هاله ناشی از فعالیت اندوگلوکانازی طی تیمار حرارتی نشان دادند جدایه G3M1 طی ۳ ساعت تیمار حرارتی نسبت به سویه کنترل خود (G25031) میزان بیشتری از فعالیت آنزیمی خود را حفظ کرد (شکل ۵-الف). همچنین طی تیمار حرارتی ۵۵ درجه سانتی‌گراد، اندوگلوکاناز حاصل از جدایه G362، نسبت به سویه کنترل خود (G161) تقریباً عمده فعالیت خود را طی دو ساعت اول حفظ کرد؛ گرچه در ساعت سوم افت فعالیت نشان داد (شکل ۵-ب).



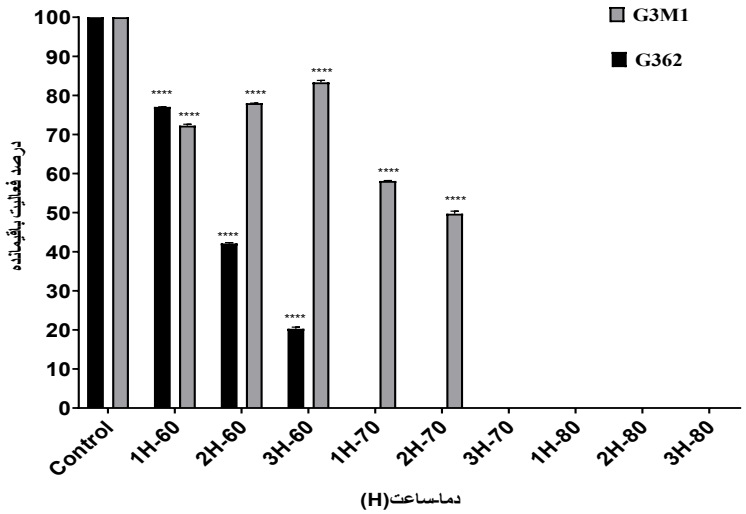
الف(A) ب(B)

شکل ۵- ارزیابی اولیه پایداری حرارتی اندوگلوکانازهای جدایه‌های منتخب به روش کیفی طی ۳ ساعت تیمار حرارتی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد. الف) شماره‌های ۱-۴ و ۵-۸ به‌ترتیب مربوط به فعالیت‌های مبنا و باقی‌مانده اندوگلوکانازی جدایه‌های G3M1 و G25031 طی ساعت‌های یک تا سه تیمار حرارتی است. ب) شماره‌های ۱-۴ و ۵-۸ به‌ترتیب مربوط به فعالیت‌های مبنا و باقی‌مانده اندوگلوکانازی جدایه‌های G162 و G362 طی ساعت‌های یک تا سه تیمار حرارتی است.

Figure 5- Qualitative evaluation of the thermal stability of endoglucanases of the selected isolates during 3 hours of heat treatment at 55°C. Numbers 1-4 and 5-8 show the primary and residual endoglucanase activities of G3M1 and G25031 isolates in (A) and of G162 and G362 in (B), respectively.

در ادامه ارزیابی کمی و مقایسه‌ای میزان فعالیت اندوگلوکانازی باقی‌مانده ۲ جدایه انتخابی در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان ۳ ساعت تیمار حرارتی، با فاصله زمانی ۱ ساعت بررسی شد. در بررسی پایداری حرارتی میزان فعالیت باقی‌مانده آنزیم سویه G362 و G3M1 نسبت به هریک از کنترل‌های آنها به‌طور معناداری ($p < 0.0001$) کاهش یافت؛ درحالی‌که در جدایه G3M1 در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت ۳ ساعت در مقایسه با کنترل، پایداری حرارتی آنزیم به‌طور معناداری ($p < 0.0001$) افزایش یافت. در سویه G3M1 در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان در مقایسه با کنترل، پایداری

حرارتی آنزیم به‌طور معناداری ($p < 0.0001$) کاهش یافت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت فقط ۵۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. در سویه G362 در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت ۳ ساعت در مقایسه با کنترل، پایداری حرارتی آنزیم به‌طور معناداری ($p < 0.0001$) کاهش یافت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در همان ۱ ساعت اول فعالیت خود را ازدست داد؛ اما در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هر دو جدایه G362 و G3M1 فعالیت خود را کاملاً از دست دادند (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه میزان پایداری حرارتی فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌های انتخابی، مبنا: در زمان صفر و بدون تیمار حرارتی، H-60: در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، H-70: در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و H-80: در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در طول مدت ۱، ۲ و ۳ ساعت تیمار حرارتی. گروه کنترل آنزیم بدون هیچ‌گونه تیمار حرارتی است. علامت **** بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.0001$).

Figure 6. The thermal stability of endoglucanase activity in the selected isolates. The control group represents the enzyme without any heat treatment. The reference points include H-60 (at 60°C), H-70 (at 70°C), and H-80 (at 80°C) for durations of 1, 2, and 3 h of heat treatment. The notation **** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0001$).

سنجش قابلیت پایداری pH اندوگلوکانازها:

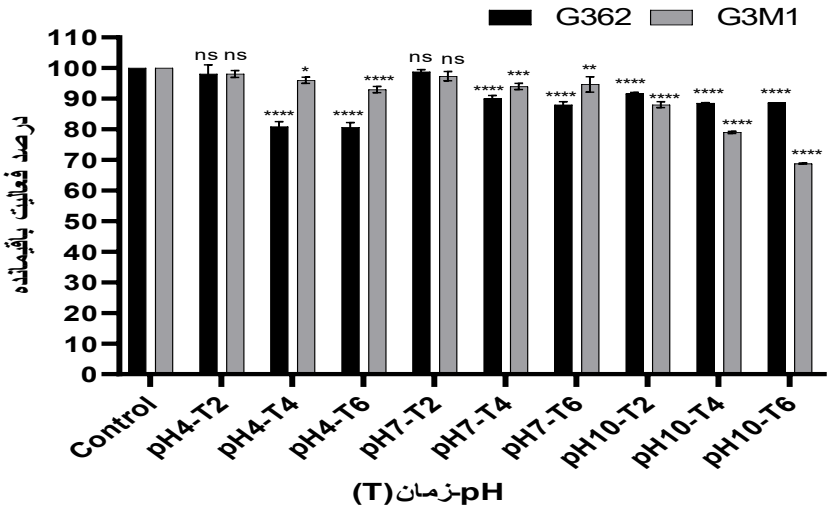
نتایج حاصل از ارزیابی پایداری آنزیم سویه G362 و G3M1 در pHهای ۴، ۷ و ۱۰ در بازه زمانی ۶ ساعت بررسی شدند. براساس این، در pHهای ۷ و ۴ طی دو ساعت اولیه فعالیت آنزیم تغییر محسوسی نشان نداد. به عبارتی میزان فعالیت باقی‌مانده نسبت به هریک از کنترل‌های آنها طی ۲ ساعت غیرمعنادار بود ($p > 0.05$).

نتایج ارزیابی اثر pH بر فعالیت اندوگلوکانازی ۲ جدایه منتخب در pH ۴ در بازه‌های زمانی ۴ و ۶ ساعت نشان دادند درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیمی در جدایه G362 در pH ۴ به‌ترتیب ۸۰/۸۵ و ۸۰/۶۵ درصد بود که به‌طور معناداری فعالیت اندوگلوکانازی حفظ شده است؛ درحالی‌که در مورد جدایه G3M1، به‌ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد بود که به‌طور معناداری کاهش یافت؛ اما طی ۶ ساعت افت فعالیت نشان نداد (شکل ۷).

با افزایش pH به ۱۰، فعالیت باقی‌مانده آنزیم جدایه‌های G362 طی بازه‌های زمانی ۲، ۴ و ۶ ساعت به‌ترتیب ۹۱/۶۲، ۸۸/۵۱ و ۸۸/۷۱ درصد بود؛ درحالی‌که در مورد جدایه G3M1 فعالیت باقی‌مانده آنزیم به‌ترتیب ۸۸/۰۳، ۸۷/۹۷ و ۶۸/۷۸ درصد است که این نشان داد

http://dx.doi.org 10.22108/BJM.2023.137002.1528

فعالیت باقی‌مانده جدایه G3M1 به‌طور معناداری کاهش داشته است؛ اما فعالیت اندوگلوکانازی جدایه G362 به‌طور معناداری در pH قلیایی حفظ شده است (شکل ۷). این ارزیابی‌ها حفظ قابلیت اندوگلوکانازی جدایه‌های انتخابی به‌ترتیب در ارتباط با G362، G3M1 را در محدوده وسیع pH آشکار کرد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این ارزیابی‌ها به معرفی اندوگلوکاناز حاصل از جدایه G362 و G3M1 با قابلیت مقاومت به اسید و قلیا در محدوده pH ۴ تا ۱۰ منجر شد. همچنین، تحمل‌پذیری ۶ درصدی سویه G362 در مقابل تحمل‌پذیری ۰/۵ درصدی G3M1 و میزان کمیت فعالیت آن قابل توجه بود؛ براساس این، جدایه G362 به‌عنوان سویه منتخب برای مطالعات بیشتر در نظر گرفته شد.



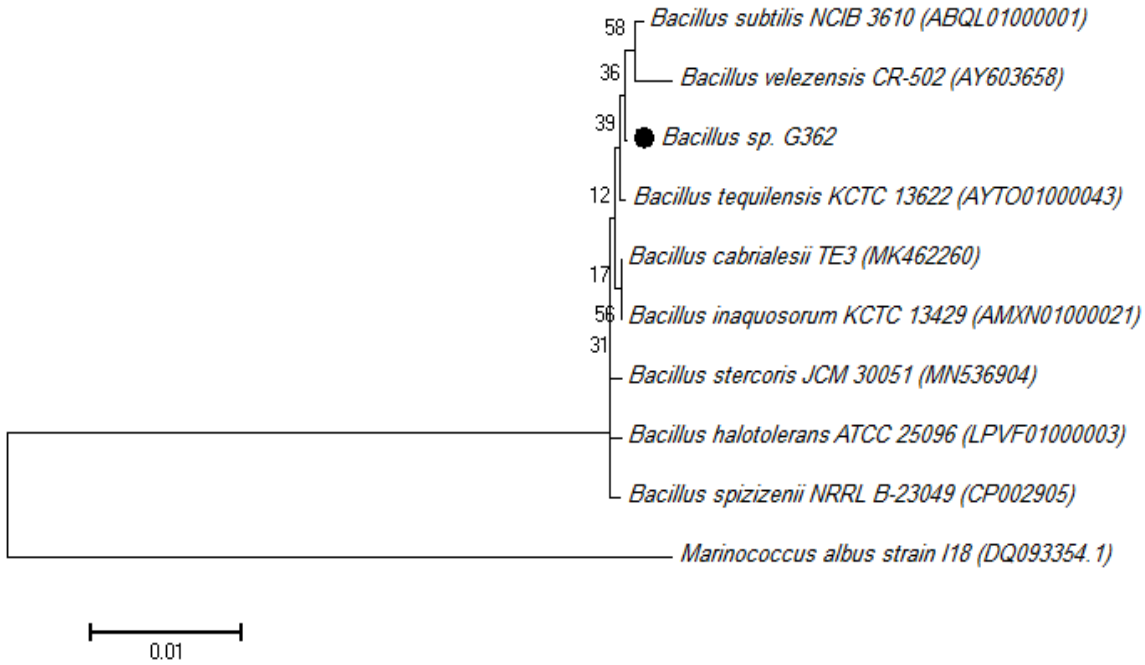
شکل ۷-مقایسه فعالیت باقی‌مانده اندوگلوکانازی جدایه‌ها در مدت زمان ۶ ساعت و در بازه‌های زمانی ۲، ۴ و ۶ ساعت در pH 4، pH 7 و pH 10. علامت * بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p: 0/016). علامت ** بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p: 0/0013). علامت *** بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p: 0 /0004). علامت **** بیان‌کنندهٔ سطح اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p: 0 /0001). علامت ns بیان‌کنندهٔ سطح غیرمعنادار است.

Figure 7. The residual endoglucanase activity in selected isolates over a 6h period at intervals of 2, 4, and 6 h at pH 4, pH 7, and pH 10. * indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.016$). ** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0013$). *** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0004$). **** indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0001$). **ns** indicates a non-significant level.

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک جدایه

انتخابی: پس از غربالگری‌های فوق‌الذکر جدایه‌ها، جدایه منتخب G362، برای شناسایی مولکولی مبتنی بر تکثیر ژن *16S rRNA* انتخاب شد. به این منظور، پس از استخراج ژنوم جدایه‌های انتخابی و تکثیر ژن هدف با استفاده از واکنش PCR، قطعات ژنی به اندازه تقریبی 1500 نوکلئوتیدی روی ژل آگارز ۱ درصد آشکار شدند (شکل ۸). پس از تعیین توالی این قطعات، جدایه G362 براساس توالی *16S rRNA* در بانک ملی اطلاعات بیوتکنولوژی در GeneBank ثبت شد و با

شماره شناسایی OP957018.1 در دسترس قرار گرفت. در همین راستا، شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه G362 با سویه‌های *Bacillus cabrialesii* TE3، *Bacillus tequilensis* KCTC 13622 و *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429 به میزان ۹۹/۹۳ درصد و با سویه باکتریایی *Bacillus subtilis* به میزان ۹۹/۸۶ درصد آشکار شد (شکل ۸).



شکل ۸– شناسایی مولکولی جدایه منتخب. درخت فیلوژنتیک پیوستگی – همسایگی براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA*. شماره‌های دسترسی برای توالی‌های به‌دست‌آمده از پایگاه‌های داده در پرانتز آورده شده است. درصدهای بوت استرپ در هر گره، وقوع با درخت‌هایی با ۱۰۰۰ بوت استرپ را نشان می‌دهد. نوار ۰/۰۱ جایگزینی در هر موقعیت نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.

Figure 8- Molecular identification of the selected isolate. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene nucleotide sequence comparison. Accession numbers for sequences obtained from databases are given in parentheses. Bootstrap percentages per node represent occurrences with trees with 1000 bootstraps. Bars indicate 0.01 substitutions at each nucleotide position.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه جداسازی باکتری‌های آبکافت‌کنندهٔ سلولز از چشمه‌های طاقانکوه، گراب هدف‌گذاری شد. از چشمه طاقانکوه در شرایط بررسی‌شده در این تحقیق باکتری جداسازی نشد که می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد که نیازمند بررسی بیشتر است. تعداد محدود باکتری موجود، محدودیت مواد شیمیایی و غذایی محیط کشت استفاده‌شده یا وجود محدودکننده در آب چشمه، می‌تواند دلایل احتمالی عدم جداسازی باکتری هدف باشد. چشمه آب گرم گراب با دمای حداکثری ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان یک نقطه بکر در شمال شرق ایران که تاکنون به تنوع زیستی ریزسازواره‌های آن توجه نشده است، برای اولین‌بار برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هوازی سلولز بررسی شد. در این تحقیق، هشت باکتری مولد سلولاز جداسازی شدند که قادر به رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و نمک (

۶-۰/۵ درصد وزنی / حجمی) بودند؛ اما هیچ‌یک از جدایه‌های معرفی‌شده در اینجا قادر به رشد در دمای بالاتر از دمای محل نمونه‌برداری (دمای چشمه گراب ۵۰ درجه سانتی‌گراد) نبودند (جدول ۱)؛ بنابراین، براساس طبقه‌بندی‌های صورت‌گرفته جدایه‌های باکتریایی مولد سلولاز جداسازی‌شده در این تحقیق در دسته باکتری‌ها تحمل‌کنندهٔ حرارت و نمک تولیدکنندهٔ اندوگلوکاناز هستند؛ گرچه برخی از جدایه‌های این چشمه، آنزیم‌های اندوگلوکانازی تولید کردند که در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت نشان دادند (شکل ۵ و ۶). در همین راستا، اندوگلوکاناز استخراج‌شده از جدایه G362، به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد فعال و پایدار بود که در مقایسه با جدایه قبلی جداشده از چشمه آب گرم دهلران، یعنی *ایزوپتریکولا وریابلیس* سویه IDAH9[۲] در ساعت اول تیمار تقریباً مشابه بود و نزدیک ۸۰ درصد فعالیت اولیه را حفظ کرد؛ اما پس از ۳ ساعت تیمار حرارتی افت فعالیت چشمگیری نشان داد؛ درحالی‌که آنزیم جدایه G362 نزدیک به ۲۰ درصد فعالیتش بیشتر باقی نمانده بود؛ در مورد *ایزوپتریکولا* این مقدار حدود ۴۰ درصد بود (۷). همچنین آنزیم به‌دست‌آمده از این جدایه با ۰/۳۷ IU/ml فعالیت در pHهای ۴، ۷ و ۱۰ به‌ترتیب ۹۵، ۹۰ و ۹۱ درصد فعالیت باقی‌مانده را طی ۲ ساعت حفظ کرد و افزایش زمان تیمار به ۶ ساعت حداکثر ۲۰ درصد افت فعالیت را موجب شد. ضمن اینکه جدایه منتخب در این تحقیق تحمل نمک ۶ درصد را نشان داد؛ بنابراین، این جدایه از لحاظ پایداری در دامنه وسیع pH می‌تواند شایان توجه قرار گیرد. طبق گزارشاتی، جدایه‌های باکتریایی نمک‌دوست برای تولید آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و گلوتامیناز از رسوبات در هند شناسایی و تعیین مشخصات شدند که فعالیت‌های ترکیبی هیدرولیتیک این جدایه‌های باکتریایی نمک‌دوست را می‌توان برای تبدیل زیستی مواد ارگانیک به محصولات مفید استفاده کرد (۲۰). در مطالعات دیگر حفظ فعالیت و پایداری اندوگلوکانازهای باکتری‌های جداسازی‌شده از چشمه‌های آب گرم و همچنین خصوصیات بیوشیمیایی یک اندوگلوکاناز جدید از خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز مقاوم به حرارت و نمک از متاژنوم چشمه‌های آب گرم تعیین شد (۲۱، ۲۲).

با توجه به پایداری و مقاومت اندوگلوکاناز مشتق از جدایه *باسیلوس* G362 در طیف گسترده‌ای از pH و تحمل‌پذیری به نمک ۶ درصد، می‌تواند به‌عنوان سویه نسبتاً هالوفیل (۲۳)، گزینه‌ای مناسب برای بهره‌برداری مستقیم و غیرمستقیم برای بهینه‌سازی و کاربرد در صنایع وابسته باشد (۱).

از سوی دیگر، تعیین توالی ژن *16S rRNA* و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک جدایه‌های منتخب از چشمه آب گرم گراب در شمال شرق ایران، هم‌ردیفی ۹۹ تا ۱۰۰ درصد این توالی با اطلاعات توالی‌های ذخیره‌شده در پایگاه داده GenBank و EzTaxon را آشکار کرد. آنالیز فیلوژنتیک برحسب هم‌ردیفی‌های آشکارشده برای تعیین ارتباط تکاملی و وابستگی جدایه منتخب G362 تعلق جدایه به گونه‌های باسیلوس را آشکار کرد (شکل ۸) که این نتایج در توافق با سایر تحقیقات در خصوص حضور غالب جنس *باسیلوس* در محیط‌های افراطی و سخت از لحاظ دما است (۱۶). به‌طور کلی باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* و *Thermus* بیشتر به‌عنوان هوازی، گرمادوست هتروتروف و در سیستم‌های حرارتی با pH خنثی تا قلیایی یافت می‌شوند

(۱۶) که این موضوع در ارتباط با برخی جدایه‌های حاصل از این تحقیق همخوانی دارد.

غربالگری باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ حرارت با قابلیت تولید سلولاز مقاوم به حرارت و pH و دستیابی به گونه‌های جدید برای افزودن به ذخایر ژنتیکی کشور، راهبردی در مسیر ایجاد بانک میکروبی و استفاده از آنها است که نتایج حاصل از این ارزیابی‌ها منجر به معرفی اندوگلوکاناز مقاوم به اسید و قلیا در محدوده pH ۴ تا ۱۰ حاصل از باسیلوس سویه G362 شد که می‌توان پس از همسانه‌سازی برای شناسایی ژن اختصاصی اندوگلوکاناز و ارزیابی قابلیت کاربردی آن به طریق مهندسی پروتئین بیشتر بررسی کرد.

سپاسگزاری

از همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به‌ویژه پژوهشکده زیست فناوری و مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران و همچنین دانشگاه فردوسی مشهد به‌ویژه پژوهشکده زیست فناوری صمیمانه تشکر می‌شود.

References

(1) Dadwal A, Sharma S, Satyanarayana T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. International Journal of Biological Macromolecules. 2021 Oct 1;188:226-44. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.024

(2) Chang CJ, Lee CC, Chan YT, Trudeau DL, Wu MH, Tsai CH, Yu SM, Ho TH, Wang AH, Hsiao CD, Arnold FH. Exploring the mechanism responsible for cellulase thermostability by structure-guided recombination. PLoS One. 2016 Mar 17;11(3):e0147485. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147485

(3) Azizi M, Hemmat J. Isolation of thermotolerant Isoptericola variabilis IDAH9 and optimization of its exoglucananse activity. Modares Journal of Biotechnology. 2016; 7 (2): 70-80. http://biot.modares.ac.ir/article-22-8467-en.html [In Persian].

(4) Nouri H, Sajjadi T, Azin M. (2017). Comparative production of cellulases by mutants of *Trichoderma parceramosume* PTCC5140. Biological Journal of Microorganism. 2017 Jun 22; *6* (22), 1-13. https://doi.org/10.22108/bjm.2017.21562 [In Persian].

(5) Seo JK, Park TS, Kwon IH, Piao MY, Lee CH, Ha JK. Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of Bacillus licheniformis JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2013 Jan; 26(1):50-8. https://doi.org/10.5713%2Fajas.2012.12506

(6) Alrumman S, Mostafa YS, Al-Qahtani S, Taha TH. Hydrolytic enzyme production by thermophilic bacteria isolated from Saudi hot springs. Open life sciences. 2018 Dec 5;13(1):470-80. https://doi.org/10.1515/biol-2018-0056

(7) Azizi M, Hemmat J, Seifati SM, Torktaz I, Karimi S. Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9. Brazilian Journal of Microbiology. 2015 Oct;46:1225-34. https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140846

(8) Diba H, Hemmat J, Vaez M, Amoozegar MA. Screening of bacteria producing acid-stable and thermostable endo4 , 1 -β-glucanase from hot springs of North and Northwest of Iran. Microbiology, Metabolites and Biotechnology. 2018 Nov 1;1(1):23-30. https://doi.org/10.22104/armmt.2018.2672.1012

(9) hKadka S, Khadka D, Poudel RC, Bhandari M, Baidya P, Sijapati J, Maharjan J. Production optimization and biochemical characterization of cellulase from geobacillus sp. KP43 isolated from hot spring water of Nepal. BioMed Research International. 2022 May 12;2022. https://doi.org/10.1155/2022/6840409

(10) Yadav P, Korpole S, Prasad GS, Sahni G, Maharjan J, Sreerama L, Bhattarai T. Morphological, enzymatic screening, and phylogenetic analysis of thermophilic bacilli isolated from five hot springs of Myagdi, Nepal. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2018 Apr 5;6(3):1-8. http://dx.doi.org/10.7324/JABB.2018.60301

(11) Singh N, Puri M, Tuli DK, Gupta RP, Barrow CJ, Mathur AS. Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate Thermoanaerobacter sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring. Biomass and bioenergy. 2018 Sep 1;116:122-30. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.05.009

(12) Sharma N, Sharma N. Cost effective production of cellulase and xylanase enzymes by Myceliophthora thermophila SH1 using lignocellulosic forest waste and bioconversion of alkaline hydrogen peroxide pretreated P. deltoides wood to bioethanol under SHF. J. Agroaliment. Processes Technol. 2013;19:419-28. https://journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/19172L67_Vol_19(4)_2013_419-428.pdf

(13) Orlygsson J, Sigurbjornsdottir MA, Bakken HE. Bioprospecting thermophilic ethanol and hydrogen producing bacteria from hot springs in Iceland. Icelandic Agricultural Sciences. 2010(23):73-85. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20113019999

(14) Singh S, Shukla L, Nain L, Khare S. Detection and characterization of new thermostable endoglucanase from Aspergillus awamori strain F 18. Journal of Mycology and Plant Pathology. 2011 Mar 5;41(1):97-103. https://B2n.ir/u20831

(15) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 1959 Mar 1;31(3):426-8. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

(16) Sahay H, Yadav AN, Singh AK, Singh S, Kaushik R, Saxena AK. Hot springs of Indian Himalayas: Potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. 3 Biotech. 2017 Jun;7:1-1. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0762-1

(17) Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012 Mar;62(Pt_3):716-21. https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0

(18) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution. 2018 Jun;35(6):1547. https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmsy096

(19) Zainudin MH, Mustapha NA, Hassan MA, Bahrin EK, Tokura M, Yasueda H, Shirai Y. A highly thermostable crude endoglucanase produced by a newly isolated Thermobifida fusca strain UPMC 901. Scientific reports. 2019 Sep 19;9(1):13526. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50126-y

(20) Gupta S, Sharma P, Dev K, Sourirajan A. Halophilic bacteria of Lunsu produce an array of industrially important enzymes with salt tolerant activity. *Biochemistry Research International*. 2016 Dec 1;2016:389-98. https://doi.org/10.1155/2016/9237418

(21) Joshi N, Kaushal G, Singh SP. Biochemical characterization of a novel thermo-halo-tolerant GH5 endoglucanase from a thermal spring metagenome. *Journal of Biotechnology and Bioengineering.* 2021; 2021 Apr;118(4):1531-44. https://doi.org/10.1002/bit.27668

(22) Zarafeta D, Kissas D, Sayer C, Gudbergsdottir SR, Ladoukakis E, Isupov MN, Chatziioannou A, Peng X, Littlechild JA, Skretas G, Kolisis FN. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. PLoS One. 2016 Jan 7;11(1):e0146454. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146454

(23) Kumar S, Karan R, Kapoor S, Singh SP, Khare SK. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. Brazilian Journal of Microbiology. 2012 Oct 1;43(4):1595.-603. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400044

[1]. Dinitrosalicylic acid (DNS)
[2]. *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9