مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۷۷-۱۶۸

Original Article

جداسازی *باسیلوس سرئوس* تولید کننده α-آمیلاز از ریزوسفر درختان پرتقال

مهناز رمضانی*[۱]، علی ریاحی مدوار[۲]، موج خالقی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه زیست شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، [۳] استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: : باکتری های موجود در ناحیه ریزوسفر با محلول نمودن فسفات و تولید ترکیباتی از قبیل فیتوهورمون ها و ترشح آنزیم هایی مانند α-آمیلاز و کیتیناز به رشد گیاهان کمک می‌نمایند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی *باسیلوس*های تولید کننده α-آمیلاز از ریزوسفر درختان پرتقال و نیز ارزیابی تولید و فعالیت α-آمیلاز در حضور منابع مختلف کربن و دامنه های مختلف pH انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی به منظور جداسازی *باسیلوس* های تولید کننده α-آمیلاز از ریزوسفر باغات پرتقال دلفارد در استان کرمان انجام شد. پس از جمع آوری نمونه، به منظور جداسازی باکتری از محیط آگار حاوی نشاسته استفاده گردید. از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی تعیین توالی ناحیه 16S rRNA برای شناسایی دقیق سویه مورد نظر استفاده شد. به منظور بررسی فعالیت آمیلازی از تست سریع هیدرولیز نشاسته استفاده گردید. همچنین تولید آنزیم در حضور منابع مختلف کربن شامل گلوکز، فروکتوز و نشاسته مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: پس از شناسایی بیوشیمیایی و تعیین توالی سویه برتر تولید کننده آنزیم با عنوان *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3 با شماره دستیابی KC306945.1 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. همچنین نتایج نشان داد که نشاسته و گلوکز بیشترین اثر مثبت بر تولید آنزیم α-آمیلاز را در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر و فروکتوز بیشترین اثر را در غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر دارا می‌باشند.

نتیجه گیری: با توجه به کفایت مناسب تولید α-آمیلاز سویه جداشده در شرایط آزمایشگاهی، انجام مطالعات های گسترده تر در حد بالاتر به منظور شناسایی دقیق تر ویژگی های آنزیمی آن پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: α-آمیلاز، *باسیلوس سرئوس*، 16S rRNA، ریزوسفر.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۲

مقدمه

در سال های اخیر، توانایی میکروارگانیسم ها در تولید α-آمیلازها، موجب شناسایی میکروارگانیسم هایی با فعالیت آمیلولیتیک شده است (۳-۱). آمیلازها، گروهی از آنزیم های صنعتی می‌باشند که تقریباً ۲۵ درصد از کل آنزیم های تجاری مورد استفاده در فرآیندهای بیوتکنولوژی مانند تجزیه نشاسته، صنعت پاک کننده ها، مواد غذایی، کاغذ و پارچه را تشکیل می دهند (۴ و ۵). گیاهان، حیوانات و میکروب ها دارای منابع α-آمیلازی می‌باشند. امروزه ریزوسفر به دلیل دارا بودن تعداد زیادی از میکروارگانیسم های مفید، به عنوان مهم ترین منبع در

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۹۳۶۵۶۸۸۴۲۹ پست الکترونیک: mahnazramezani0@gmail.com

جداسازی و انتخاب باکتری ها با فعالیت کنترل زیستی شناخته شده است (۶). ریزوسفر به قسمتی از خاک اطلاق می‌گردد که در تماس مستقیم با ریشه قرار دارد. مطالعه میکروارگانیسم های مرتبط با گیاهان، اهمیت زیادی در توسعه کشاورزی و کاربردهای بیوتکنولوژی دارد. این میکروارگانیسم ها با تولید آنتی بیوتیک، محلول کردن فسفات و تولید آنزیم های تجزیه کننده از قبیل پروتئاز، آمیلاز و سلولاز نقش مهمی در رشد گیاهان ایفا می‌نمایند (۷). با توجه به قیمت پایین و دست ورزی ژنتیکی آسان تر میکروارگانیسم‌ها، استفاده از آن‌ها در تولید α-آمیلازها بسیار مناسب می‌باشد. مطالعات نشان داده است که بیشتر باکتری ها و قارچ های رشته ای به دلیل تولید α-آمیلاز قادر به تجزیه گسترده نشاسته می‌باشند (۲). امروزه مهم‌ترین آمیلازهای تجزیه کننده نشاسته از جنس *باسیلوس* (*Bacillus*) استخراج شده است (۸). هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی *باسیلوس‌های* تولید کننده α-آمیلاز از ریزوسفر درختان پرتقال و نیز ارزیابی تولید و فعالیت α- آمیلاز در حضور منابع مختلف کربن و دامنه‌های مختلف pH بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه: نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه از خاک باغات پرتقال دلفارد از توابع شهرستان جیرفت در استان کرمان جمع آوری گردید. به منظور جمع آوری نمونه از ناحیه ریزوسفر، ابتدا ۵ سانتی متر از سطح خاک کنار زده شد. سپس نمونه‌های خاک مربوط به عمق ۱۵ سانتی متری اطراف ریشه درون ظروف پلاستیکی قرار داده شدند و تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

ب) جداسازی باسیلوس ها: در ابتدا یک گرم از خاک جمع آوری شده به ۱۰ میلی‌لیتر آب استریل اضافه و مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی جمع آوری و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از تهیه رقت تا $^{-2}$ ۱۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بر روی محیط کشت آگار حاوی نشاسته (۸ گرم نوترینت آگار، ۱۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم نشاسته) کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری گردید.

ج) سنجش تولید آنزیم α-آمیلاز: به منظور سنجش سریع تولید α-آمیلاز به واسطه هیدرولیز نشاسته، محلول لوگل بر روی کلنی های موجود در محیط کشت آگار حاوی نشاسته ریخته شد (۹). سپس کلنی هایی که هاله بیشتری را تشکیل دادند انتخاب و مورد ارزیابی‌های بعدی قرار گرفتند.

د) ترسیم منحنی رشد: پس از کشت باکتری بر روی محیط نوترینت براث در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-Visible ، مدل Cary 50 استرالیا) در هر ۴ ساعت یک بار بعد از کشت اندازه گیری و منحنی رشد سویه جداسازی شده رسم گردید.

ه) شناسایی مولکولی باکتری جداسازی شده: به منظور استخراج DNA باکتری، ابتدا چند کلنی از آن در محیط نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس استخراج کامل DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Vivantis) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

و) تکثیر ژن 16S rRNA: برای این منظور از پرایمرهای پیشرو 5´-A G T T G A T C C T G G C T C A G -3´ و معکوس 5´- GGCTTACCTTGTTACGAC-3´ استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برمایند منتقل و

الکتروفورز گردید.

ز) تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیک 16S rRNA: تعیین توالی قطعه حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. توالی های به دست آمده با کل ژنوم باکتری ها در NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) هم ردیف گردید. آنالیز فیلوژنتیک به وسیله برنامه TV Finch، Gene runner و درخت فیلوژنتیک با استفاد از نرم افزار MEGA5 ترسیم شد. توالی حاصله در بانک جهانی ژن (Gene Bank) ثبت گردید.

ح) تعیین خصوصیات فنوتیپی سویه باسیلوس: خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده بر اساس روش های معرفی شده در کتاب باکتری شناسی سیستماتیک برگی مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). شکل و رنگ کلنی ها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، بر روی محیط کشت نوترینت آگار مشخص گردید. همچنین به منظور ارزیابی ویژگی های بیوشیمیایی این سویه، کلنی ها بر روی محیط های اختصاصی از جمله Egg Yolk Agar، نوترینت نیمه جامد و بلاد آگار کشت داده شدند. سپس تغییرات حاصله پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

ط) pH بهینه رشد: به منظور تعیین pH بهینه رشد باکتری جداسازی شده، از محیط کشت نوترینت براث با دامنه های مختلف pH (۴/۵، ۶، ۷ و ۸) استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

ی) سنجش فعالیت آنزیم α-آمیلاز: برای این منظور از روش دی نیتروسالیسیلیک اسید، بر مبنای اندازه گیری مقدار قند تشکیل شده پس از هیدرولیز آنزیمی نشاسته استفاده گردید (۱۱). ابتدا ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری با دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته یک درصد حل شده در محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات (حاوی ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم) با pH ۷ اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. به منظور پایان یافتن واکنش، یک میلی‌لیتر از ۳ و ۵ دی نیترو سالسیلیک اسید به مخلوط یاد شده افزوده و ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، تغییر رنگ محیط در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری گردید. منحنی استاندارد مالتوز بر اساس غلظت های مختلف مالتوز ترسیم شد. بر اساس روش برنفلید (Brenfled) یک واحد (U) از فعالیت α-آمیلاز به عنوان تعداد میکرو مول های مالتوز تجزیه شده به وسیله یک میلی لیتر از محلول آنزیم در یک دقیقه تعریف گردید (۱۲).

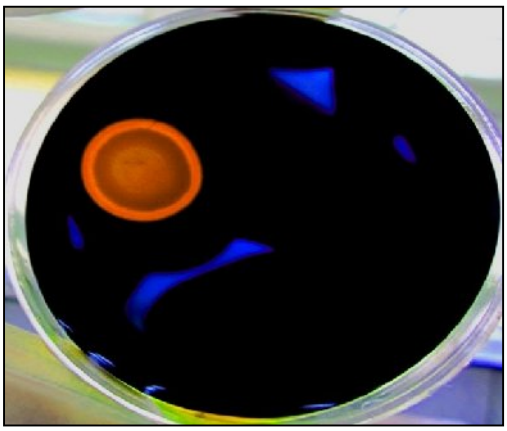
ک) اثر منابع مختلف کربن و pH بر تولید آنزیم α-آمیلاز: برای این منظور از منابع مختلف کربن شامل گلوکز، فروکتوز و نشاسته در غلظت های صفر (به عنوان شاهد) ، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر استفاده گردید. همچنین به منظور بررسی تولید آنزیم α-آمیلاز، از محیط نوترینت براث حاوی نشاسته (۸ گرم نوترینت آگار و ۱۰ گرم نشاسته) در دامنه های مختلف pH (۴/۵، ۶، ۷ و ۸) استفاده شد.

ل) آنالیز داده ها: تمامی آزمایشات با سه تکرار مستقل انجام و آنالیز داده ها با استفاده از آزمون دانکن (Duncan) و ضریب اطمینان ۵ درصد با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS مورد تجزیه یک عاملی قرار گرفتند.

یافته ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری دارای فعالیت α-آمیلازی: پس از اضافه نمودن لوگل به محیط کشت جامد باکتری مشاهده هاله ای به قطر سه میلی متر به عنوان سنجش کمی تولید α-آمیلاز در نظر گرفته شد (شکل ۱). پس از تعیین توالی قطعه حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA و آنالیز داده ها، سویه جداسازی شده به عنوان *Bacillus cereus* MR-R3 با شماره KC306945.1 در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

ب) آنالیز توالی و رسم درخت فیلوژنیک باسیلوس: به منظور شناسایی دقیق تر جدایه، توالی‌های 16S rRNA به صورت



شکل ۱: سنجش سریع تولید آنزیم α-آمیلاز از *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3، شفافیت اطراف هاله نشان دهنده تست مثبت است.

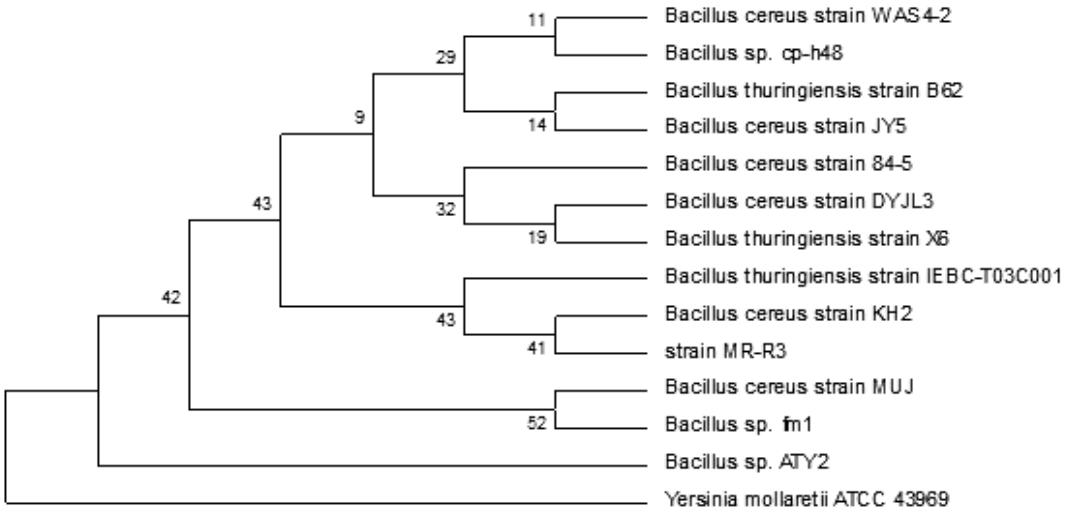
محدود تعیین توالی گردیدند. درخت فیلوژنتیک مربوط به این سویه بر اساس مقایسه توالی های 16S rRNA چندین گونه و سویه مختلف *باسیلوس* بر مبنای روش Neighbor-joining ترسیم شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که سویه جداسازی شده در این مطالعه با باکتری *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) سویه KH2 در یک شاخه قرار دارد و از ۱۰۰۰ بار تکرار با ارزش Bootstrap، ۴۱ بار این دو سویه در یک شاخه قرار گرفتند.

ج) آزمون های بیوشیمیایی: پس از ارزیابی آزمون های بیوشیمیایی مشخص گردید که سویه جداسازی شده گرم مثبت، متحرک، کاتالاز، لستیناز و همولیز مثبت می باشد. همچنین باکتری ها در زیر میکروسکوپ به شکل میله ای و دارای کلنی هایی به شکل دندانه نامنظم بودند.

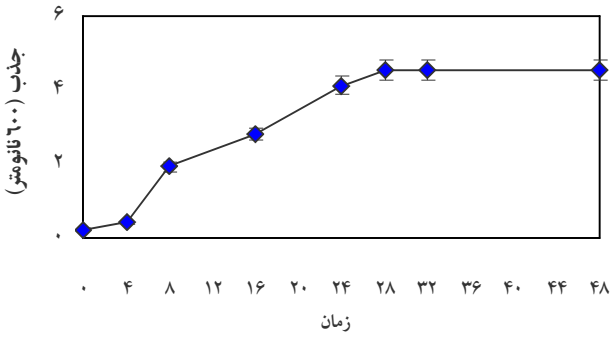
د) منحنی رشد: همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، سویه *باسیلوس* جداسازی شده در ساعت های ابتدایی رشد و حدود ۴ ساعت پس از کشت به فاز لگاریتمی رسید. سویه مورد بررسی پس از ۲۴ ساعت با پایان فاز لگاریتمی وارد فاز سکون گردید.

ه) pH بهینه رشد: نتایج به دست آمده نشان داد که *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3 در pH ۸ بیشترین میزان رشد را دارد اما با کاهش pH، رشد آن نیز کاهش یافت (شکل ۴).

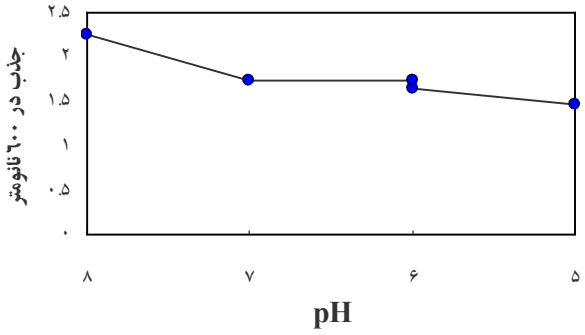
و) اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم α-آمیلاز: با افزایش غلظت گلوکز در محیط، فعالیت آنزیم α-آمیلاز نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم، در بالاترین غلظت گلوکز مورد استفاده مشاهده گردید. همچنین فعالیت آنزیم α-آمیلاز در حضور پایین ترین غلظت



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3 رسم شده با روش Neighbor-joinin. اعداد روی هر شاخه نشان دهنده ارزش Bootstrap و تعیین شده از هر ۱۰۰۰ بار تکرار با سطح زیر نمودار ۰/۵ درصد می باشند. *Yersinia mollaretii* ATCC43969 به عنوان گروه خارجی (Outgroup) در نظر گرفته شد.



شکل ۳: منحنی رشد *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3.



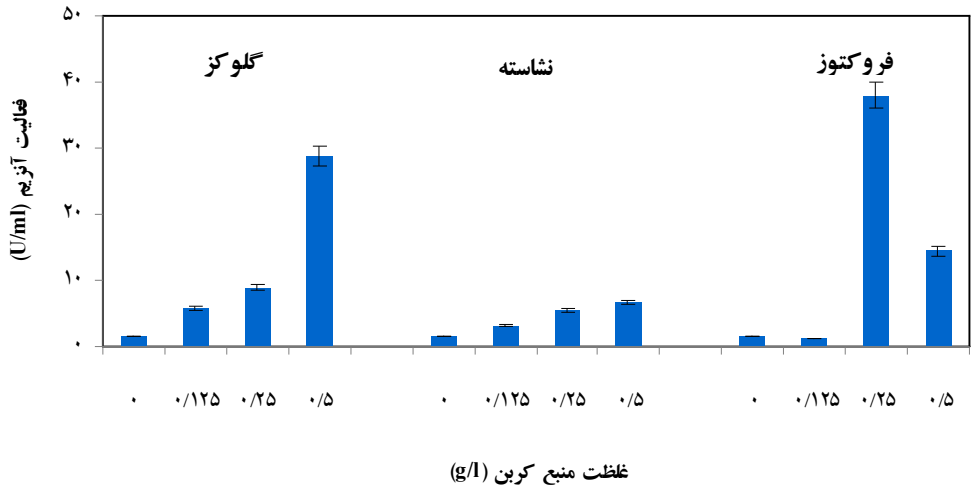
شکل ۴: منحنی pH بهینه رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3.

فروکتوز (۰/۱۲۵ گرم بر لیتر) مشابه نمونه شاهد بود. اما با افزایش غلظت این قند در محیط، فعالیت آنزیم به طور معنی داری نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر این ماده مشاهده گردید. با این وجود، با افزایش غلظت فروکتوز در محیط، فعالیت آنزیم نسبت به غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر کاهش یافت. همچنین افزایش معنی دار فعالیت آنزیم α-آمیلاز نسبت به نمونه شاهد، هماهنگ با افزایش غلظت نشاسته در محیط مشاهده گردید (شکل ۵).

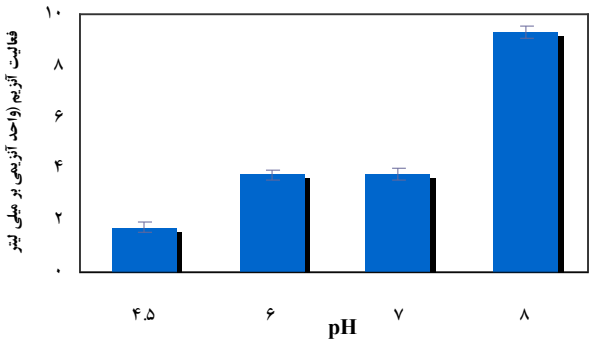
ز) اثر pH بر تولید آنزیم α-آمیلاز: با افزایش pH، تولید آنزیم α-آمیلاز افزایش یافت به طوری که در pH ۸ بیشترین تولید آنزیم مشاهده شد (شکل ۶).

بحث

در پژوهش های مختلف اثرات مفید *باسیلوس‌های* موجود در ناحیه ریزوسفر در افزایش رشد گیاهان به اثبات رسیده است (۳). خانواده *باسیلاسه* (*Bacillacea*) دارای بیش از ۳۰ جنس و گونه می باشد. باکتری های موجود در این جنس به دلیل ترشح آنزیم های مختلف و تشکیل اسپور در خاک و مواد غذایی، از اهمیت بالایی برخوردار می باشند (۱۰). در مطالعه حاضر، شناسایی سویه *باسیلوس* جداسازی شده از ناحیه ریزوسفر باغات پرتقال بر اساس تست های میکروبی، بیوشیمیایی و



شکل ۵: اثر غلظت های مختلف گلوکز، فروکتوز و نشاسته بر فعالیت آنزیم α-آمیلاز باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3.



شکل ۶: اثر pH بر تولید آنزیم α-آمیلاز توسط *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3.

مولکولی انجام گرفت. پس از ارزیابی تست های بیوشیمیایی و مقایسه نتایج با کتاب باکتریولوژی سیستماتیک برگی، سویه جداسازی شده با خصوصیات *باسیلوس سرئوس* مطابقت داشت (۱۰). پس از شناسایی و رسم درخت فیلوژنتیک، مشخص گردید که سویه MR-R3 به همراه باکتری *باسیلوس سرئوس* سویه KH2 در یک شاخه قرار می گیرد. این جدایه با عنوان *باسیلوس سرئوس* سویه MR-R3 با شماره دسترسی KC306945.1 در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

نشاسته، پلی مری از گلوکز می باشد که به وسیله گیاهان تولید می گردد. گیاهان بخش کمی از نشاسته ترشح شده را از طریق ریشه و بافت مرده به درون خاک منتقل می‌نمایند. این ترکیب به وسیله آنزیم آمیلاز تولید شده توسط باکتری های خاک، تجزیه می گردد (۱۳). یکی از مهم ترین جنس های ترشح کننده آنزیم آمیلاز *باسیلوس ها* می باشند (۱۴). مطالعات نشان داده است که مقدار و ماهیت منبع کربن، نقش مهمی در رشد و تولید آنزیم های خارج سلولی ایفا می‌نماید (۱۵). در مطالعه حاضر، تأثیر سه منبع کربن شامل گلوکز، نشاسته و فروکتوز بر تولید آنزیم α-آمیلاز توسط سویه جداسازی شده، مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جایی که این ترکیبات بر تولید آنزیم α-آمیلاز اثر می گذارند، از این‌رو تغییر در فعالیت این آنزیم می تواند بیانگر تولید آنزیم در تیمار با این ترکیبات باشد (۱۶). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت گلوکز و نشاسته در محیط، تولید α-آمیلاز افزایش می یابد و بیشترین میزان تولید در بالاترین غلظت مورد استفاده مشاهده گردید. تولید α-آمیلاز در حضور گلوکز در بالاترین غلظت بیش از ۱۴ برابر افزایش یافت، اما در این شرایط تیمار با نشاسته موجب افزایش سه برابری فعالیتآنزیم گردید. تأثیر غلظت گلوکز بر تولید آنزیم α-آمیلاز به عنوان یک محرک و همچنین یک مهار کننده در مطالعات مختلف گزارش شده است. هسلتین (Heseltine) و همکاران در سال ۱۹۹۶ اثبات کردند که غلظت کم گلوکز در محیط کشت باکتری، اثر افزایشی بر فعالیت α-آمیلاز دارد (۱۷). در مقابل، نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت گلوکز در محیط، تولید این آنزیم مهار می گردد (۲۰-۱۸). بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت های گلوکز مورد استفاده در این پژوهش، که اثر تحریکی بر تولید این آنزیم نداشته اند، کم تر از نیاز باکتری باشند. همچنین به نظر می رسد که غلظت‌های مورد استفاده این قند موجب مصرف سریع آن ها توسط این سویه شده است. به طوری که باکتری به منظور به دست آوردن قند بیشتر، مقدار بیشتری آنزیم تولید کرده است. یافته‌های مولیمانی (Mulimani) و پاتیل (Patil) در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد که میزان نشاسته محیط به عنوان یک محرک در بیان ژن α-آمیلاز دخالت می نماید (۲۱). از طرفی مطالعات نشان داده است که نشاسته محلول، می تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب موجب افزایش فعالیت α-آمیلاز در باکتری *باسیلوس استئاروترموفیلوس* (*B. stearothermophilus*) شود (۲۲). بنابراین به نظر می رسد در پژوهش حاضر، تأثیر کم‌تر نشاسته بر تولید این آنزیم در مقایسه با تأثیر گلوکز، به دلیل کاهش ورود آن به داخل باکتری به دلیل ماهیت پلیمری و کاهش حلالیت آن باشد.

در مطالعه جاری، پایین ترین غلظت مورد استفاده فروکتوز اثری بر تولید α-آمیلاز نداشت. اما در حضور غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر فروکتوز، تولید آنزیم بیش از ۱۸ برابر افزایش یافت که بیش از سایر محرک های زیستی(Elictors) می‌باشد. نتایج به دست آمده در این پژوهش با یافته‌های دهارانی (Dharani) و همکاران در سال ۲۰۰۵ مبنی بر اثر مثبت فروکتوز بر روی فعالیت α -آمیلاز در باکتری *Bacillus licheniformis* SPT 27

مطابقت دارد (۲۳). با افزایش غلظت قند تا ۰/۵ گرم بر لیتر در محیط، تولید آنزیم کاهش می یابد. با این حال تولید α- آمیلاز در حضور این غلظت نیز بیش از پنج برابر حالت شاهد می باشد. در ارتباط با کاهش فعالیت آنزیم پیشنهاد می‌گردد که افزایش غلظت فروکتوز اثر منفی بر تولید آنزیم α- آمیلاز داشته باشد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه بونوکو (Buonocove) و همکاران در سال ۱۹۷۶ مطابقت دارد. آن ها نشان دادند که تجمع قندها به صورت فیدبک منفی موجب سرکوب فعالیت آنزیم α- آمیلاز می گردد (۲۴).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که pH مناسب برای تولید آنزیم α- آمیلاز (pH ۸) یعنی pH بهینه رشد باکتری می باشد. این مشاهده با گزارش های منتشر شده توسط یوتونگ (Utong) و همکاران در سال ۲۰۰۶ هم‌خوانی دارد. نتایج آن ها نشان داد که باکتری *Bacillus sphericus* قادر به تولید آمیلاز در دامنه pH ۶ تا ۹ می‌باشد (۲۶). بنابراین به نظر می‌رسد که تولید α- آمیلاز، به پایداری و رشد باکتری در آن pH بستگی دارد.

نتیجه گیری

از آن‌جایی که سویه جداسازی شده از خاک باغات درختان پرتقال، قادر به ترشح آنزیم α-آمیلاز می‌باشد و همچنین قابلیت محلول نمودن فسفات را نیز دارد (نتایج آورده نشده است)، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این سویه می‌تواند در صنعت و کشاورزی اهمیت قابل توجهی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان به دلیل حمایت های مالی و همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Pandey P, Nigam CR, Soccol VT, Soccol D, Singh R. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem. 2000; 31(2): 135-152.
2. Abu EA, Ado SA, James DB. Starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on Sorghum pomace. Afr J Biotechnol. 2005; 4(8): 785-790.
3. Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu MP. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 160(4): 988-1003.
4. Oudjeriouat N, Moraiau Y, Santimone M, Svenssen B, Marchis-Mouren G. Desseaux V. On the mechanism of amylase: A carbon and cyclodextrin inhibition of barley amylase isoenzymes. Eur Biochem FEBS. 2003; 270: 3871-3879.
5. Oliveira AN, Oliveira LA, Andrade JS, Junior AF. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. Brazil J Microbiol. 2007; 38(2): 208-216.
6. Raaijmakers JM, Paulitz CT, Steinberg C, Alabouvette C, Moe¨nne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil. 2009; 321: 341-361.
7. Bloemberg GV, Lugtenberg JJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr Opin Plant Biol. 2001; 4(4): 343-350.

8. Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Nigam P. Solid state fermentation in biotechnology. JBM. 2001; 34(6): 405-423.

9. Fuwa H. A new method of micro-determination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. J Biochem. 1954; 41: 583-603.

10. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bacilli*. In Williams BW and Aidan CP 2th ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology .USA. Baltimore. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 2009; pp: 21-68.

11. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31(3): 426-428.

12. Krishna C, Chandrasekaran M. Banana waste as substrate for amylase production by *Bacillus.subtilis* (CBTK-106) under solid state fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 1996; 46(2): 106-111.

13. Robyt JF. Biodegradation. In Charles RC. Essentials of Carbohydrate Chemistry.1. 0-387-94951. Boston. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg. 1998; pp: 331-333.

14. Van der Marc JEC, Van der M, Bart-van der V, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the a-amylase family. J Biotechnol. 2002; 94(2)*:* 137-155.

15. Bozic N, Ruiz2 J, Santin Jl, Vujcic Z. Optimization of the growth and α-amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. J Serb Chem Soc. 2011; 76(7): 965-972.

16. Anto H, Trivedi U, Patel K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC1305 using solid state fermentation. Food Technol Biotechnol. 2006; 44(2): 241-245.

17. Heseltine C, Rolfs Meier M, Blum P. The glucose effect and regulation of α-amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J Bacteriol. 1996; 178(4): 945-950.

18. Srivastava R, Baruah JN. Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Appl Environ Microbiol. 1986; 52(1): 179-184.

19. Brown SH, Costantino HR, Kelly RM. Characterization of amylolytic enzyme activities associated with hyperthermophilic archibacterium, *Pyrococus furiosus*. Appl Environ Microbiol. 1990; 56(7): 1985-1991.

20. Haseltine C, Rolfsmeier M, Blum P. The glucose effect and regulation of a-amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J Bacteriol. 1996; 178(4): 945-950.

21. Mulimani VH, Patil GN. α-amylase production by solid state fermentation: A new practical approach to biotechnology courses. Biochem Educe. 2000; 28(3): 161-163.

22. Fukumoto J, Yamamoto T, Tsuru D. Effect of carbon sources and base analogues of nucleic acid on the formation of bacterial amylase. Nature. 1957; 180(4583): 438-439.

23. Dharani-Aiyer PV .Effect of C: N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. Afr J Biotech. 2005; 3(10): 519-522.

24. Buonocore V, Caporale C, De Rosa M, Gambacorta A. A stable inducible thermoacidophilic α-amylase from *Bacillus acidocaladarius*. J Bacteriol. 1976; 128(2): 515-521.

25. Shafaat S, Akram M, Rehman A. Isolation and characterization of a thermostable-amylase from *Bacillus subtilis*. Afr J Microbiol Res. 2011; 5(20): 3334-3338.

26. Utong J, Al-Quadan F, Akel H. Effects of various growth conditions on the production of extracellular amylase from thermotolerant *Bacillus* sp isolated from hot spring in Jordan. J Biol Sci. 2006; 6(3): 621-625.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Isolation of orange orchards rhizosphere *Bacillus cereus* by the ability of α-amylase secretion

Mahnaz Ramezani[1], Ali Riahi-Madvar[2], Mooj Khaleghi[3]

[1]M.Sc., Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Rhizosphere bacteria assist growth of plants via dissolving phosphate, production of special compounds such as phytohormones and release of hydrolytic enzymes such as a-amylase and kitinase. This study aimed to isolate and to identify a a-amylase *producing* bacillus in rhizosphere of orange orchards and to investigate microbial activity to enzyme production in presence of different source of carbon ranges.

Materials and Methods: This study was conducted in order to isolation of a-amylase bacilli from rhizosphere of orange orchards located at Kerman province, Iran. After sample collection, bacteria were isolated by growing on starch agar. Several molecular (based on 16SrRNA) and biochemical methods were used to identify bacterial species. The starch rapid hydrolysis test was used to investigate amylase activity of the isolates. Additionally, the enzyme production level was studied in the presence of several carbon sources include glucose, fructose and starch ranges.

Results: Molecular and biochemical analysis showed that isolated bacterium is a strain of *Bacillus cereus* named as *Bacillus cereus* MR-R3 and recorded in GeneBank under accession number of KC306945.1. Moreover, results showed that starch and glucose have the highest positive effects on alpha amylase production in the presence of 0.5 g/l and fructose have the highest effect in the presence of 0.25 g/l.

Conclusion: Isolation and identification of orange orchards rhizospher-derived *bacillus* species considering their ability to produce a-amylase and phosphate solvation showed that the presence of this species in this region is very important. Moreover, increase in production of the enzyme after treatment with different carbon sources can be related to their gene expression induction effects.

Keywords: α-amylase, *Bacillus cereus*, 16S rRNA, Rhizospher.

Correspondance to: Mahnaz Ramezani

Tel: +989365688429

E-mail: mahnazramezani0@gmail.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 168-177.