جداسازی و شناسایی باکتری سرمادوست از روده سخت پوست گاماروس جدا شده از چشمه‌های آب سرد شهر سامان در استان چهارمحال و بختیاری وارزیابی آنزیم‌های مختلف آن

معصومه یوسف زاده[۱]، روح الله همتی[۲و۳*]، بهناز صفار[۱] و علیرضا نوری[۴]

[۱] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

[۲] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۳] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، پژوهشکده زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی صنعتی

[۴] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

باکتری‌های سرمادوست بدلیل توانایی در تولید آنزیم‌هایی که در دماهای پائین قادر به کاتالیز واکنش‌های بیوشیمیایی می‌باشند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از این رو در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی این باکتری‌ها صورت گرفته است. این پژوهش نیز با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کنندهٔ آنزیم‌های مقاوم به سرما از رودهٔ گونهٔ جدید سخت‌پوست گاماروس، ساکن چشمهٔ آب سرد ارتفاعات رشته کوه زاگرس واقع در استان چهارمحال و بختیاری ایران، صورت پذیرفت. ابتدا گاماروس‌ها جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، از روده آنها بصورت کاملاً استریل نمونه‌برداری صورت گرفت و پس از تهیهٔ رقت در محیط لوریا- برتانی آگار در دمای ۵°C دمادهی شد. کلونی‌های رشد یافته بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، آزمون‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفتند و در نهایت تعیین هویت مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن 16SrRNA انجام شد. سویهٔ بومی جدید شناسایی شده در این پژوهش با شمارهٔ دسترسی MK961220 در GenBank ثبت شد که متعلق به باکتری سرمادوست *Pseudomonas fragi* می‌باشد. طبق بررسی‌های صورت گرفته، این سویهٔ جدید توانایی تولید آنزیم‌های آمیلاز، زایلوز ایزومراز، کاتالاز، اکسیداز، سرین پروتئاز و لاکاز را دارد و حداکثر فعالیت آنزیم‌های بررسی شده در دمای 0 تا ۵°C می‌باشد. این پژوهش برای اولین بار در کشور بمنظور بررسی ظرفیت بالقوه و شناسایی منابع بومی تولید کنندهٔ آنزیم‌های صنعتی با کاربرد زیست فناوری انجام گرفته است. طبق بررسی‌های صورت گرفته این سویهٔ جدید می‌تواند بعنوان کاندید مناسبی برای تخلیص و تولید آنزیم‌های سرمادوست جهت استفاده در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های سرمادوست، سخت پوست گاماروس، باکتری *Pseudomonas fragi*، ژن 16SrRNA.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۲۳۲۴۴۰۱ ۹۸ ، پست الکترونیکی: roohullah.hemmati@sku.ac.ir

مقدمه

بخش وسیعی از سطح زمین دارای محیط‌های سرد بوده که زیستگاه میکروارگانیسم‌های سازگار به سرما، بنام سایکروفیل‌ها می‌باشند. بر اساس شرایط دمایی رشد، میکروارگانیسم‌ها به سه دسته ترموفیل، مزوفیل و سایکروفیل تقسیم می‌شوند (۲۵). بدلیل سهولت رشد باکتریها و مقاومتشان در فرآیندهای مختلف، یک افزایش تقاضا برای استفاده از بیوکاتالیست‌های میکروبی در کاربردهای صنعتی وجود دارد. امروزه اکثر آنزیم‌هایی که

در فرآیندهای صنعتی تولید می‌شوند، مزوفیل هستند. کاربرد آنزیم‌های مزوفیل، بدلیل پایداری کم آنها در برابر افزیش قدرت یونی، دما، و pH، محدود می‌شود (۳). علاوه بر این، ایجاد گرما جهت افزایش بازیابی تولیدات، در فرآیندهای صنعتی باکتری‌های مزوفیل، مقرون به صرفه نمی‌باشد. از این رو، آنزیم‌های جداشده از میکروارگانیسم-های سرمادوست می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنزیم-های مزوفیل باشند (۱۲). در چند دهۀ اخیر مشخص شده است که این میکروارگانیسم‌ها بدلیل تولید آنزیم‌های سازگار با سرما، مزایای اقتصادی و زیست‌محیطی بسیار مفیدی را نسبت به میکروارگانیسم‌های مزوفیل و ترموفیل از خود نشان می‌دهند (۳۷). آنزیم‌های سازگار با سرما بدلیل ویژگی‌های ساختمانی و کاتالیتیک در انجام واکنش‌ها در دماهای پائین نسبت به رقبای مزوفیل و ترموفیل از مزیت بیشتری برخودارند. این آنزیم‌ها با سرعتی بیش از دو برابر سرعت آنزیم‌های مزوفیل قادر به کاتالیز واکنش-های شیمیایی در دماهای سرد می‌باشند (۱۲ و ۱۷). سرمادوست‌ها به دو دستۀ باکتری‌های *Psychrophile*(سرمادوست اجباری) و *Psychrotroph*(سرمادوست اختیاری) تقسیم می‌شوند. اغلب باکتری‌های سرمادوست متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Vibrio*، *Cytophaga* و *Flavobacterium* هستند (۲).

مطالعات صورت گرفته در مورد باکتری‌های سرمادوست، توانایی آنها را در تولید آنزیم‌های مختلف مقاوم به سرما نظیر آمیلازها، سلولازها، پکتینازها، بتاگالاکتوزیدازها، اکسیدازها، پروتئینازها، لیپازها و غیره آشکار می‌سازد (۳۹). این باکتری‌ها بدلیل تولید آنزیم‌ها، متابولیت‌ها و ترکیبات جدید نظیر پروتئین‌های ضد یخ از پتانسیل بالایی برای کاربردهای بیوتکنولوژی برخوردارند (۵). توانایی بالقوه آنزیم‌های سرمادوست منجر به افزایش سرمایه‌گذاری در زمینه تحقیقات و توسعه استفاده از این آنزیم‌ها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی (نظیر پکتیناز، بتا گالاکتوزیداز)، صنایع شوینده (نظیر لیپاز، آمیلاز، سلولاز)، صنایع فرآوری گوشت (پروتئاز) و غیره می‌شود (۳۳ و ۳۹). علاوه بر این آنزیم‌های سرمادوست بطور موفقیت-آمیزی در زیست‌پالایی (نظیر اکسیدازها)، تغییر و تبدیلات زیستی (متیلاز و آمینوترانسفرازها) و نیز در زیست دارویی بطور وسیع بکار می‌روند و تحقیقات در این زمینه بطور روزافزونی در حال افزایش است (۳۹). با توجه به اهمیت آنزیم‌های سرمادوست و کاربرد وسیع آنها در صنایع، این پژوهش با هدف شناسایی باکتری‌های سرمادوست همزیست در روده سخت پوست گاماروس موجود در چشمۀ آب سرد ارتفاعات استان چهارمحال و بختیاری با کاربرد احتمالی در زیست فناوری و صنایع انجام شده است.

مواد و روشها

جداسازی گونۀ سخت‌پوست گاماروس از چشمۀ آب - سرد: چشمۀ آب سردی که در این پژوهش از آن نمونه برداری صورت گرفت در فاصله ۸۵ کیلومتری شهرکرد در ارتفاعات رشته کوه‌های زاگرس استان چهارمحال و بختیاری واقع شده است. دمای آب آن از ۵ °C تا ۱۵ °C در فصول سرد و گرم سال متغیر است. این نمونه‌ها پس از جمع آوری، توسط فلاسک در دمای۵°C به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتریهای سرمادوست از رودۀ گونۀ جدید سخت پوست گاماروس: ابتدا سطح گاماروس‌ها توسط الکل رقیق و نیز اشعه UV بطور کامل ضدعفونی و از رودۀ آنها به‌صورت کاملاً استریل نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها پس از تهیۀ رقت، در محیط لوریا-برتانی آگار در دمای ۴°C گرماگذاری شدند. در این دما فقط یک نوع کلونی رشد یافت که جهت اطمینان از خالص بودن، بصورت جداگانه به پلیت LB آگار منتقل و برای ۳-۴ بارمتوالی کشت داده شد. کلنی جداشده بر اساس ویژگی-های مورفولوژیکی، آزمون‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه

قرار گرفت و در نهایت تعیین هویت مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن 16SrRNA انجام شد.

بررسی خصوصیات مورفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی: خصوصیات ظاهری کلنی و خصوصیات ظاهری سلول، پس از رنگ‌آمیزی گرم توسط میکروسکوپ نوری بررسی و ثبت شد. بمنظور شناسایی نسبی و اولیهٔ سویهٔ جداشده، یکسری از آزمونهای بیوشیمیایی میکروبی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون مصرف سیترات، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، آزمون متیل رِد-وگس پروسکائر (MR-VP test)، آزمون سولفید-ایندول-تحرک (SIM test)، و هیدرولیز نشاسته، بر اساس کتاب سیستماتیک باکتری-شناسی برگی انجام شد (۴۰). در نهایت جهت تشخیص نهایی، شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن 16SrRNA صورت پذیرفت.

بررسی مولکولی باکتری جدا شده: برای این منظور از پلیت حاوی کشت خالص، یک کلنی تک برداشته و در ۱۰cc محیط LB مایع، در دمای ۵°C بمدت ۲۰ ساعت کشت داده شد. سپس محیط کشت نامبرده جهت رسوب-گیری در دور ۹۰۰۰ rpm بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از رسوب حاصل، برای استخراج DNA با استفاده از کیت Cell DNA Isolation kitتهیه شده از شرکت Gene All استفاده شد. برای اطمینان از صحت کار، محصول استخراج ژنوم توسط دستگاه الکتروفورز (BioRad) بر روی ژل ۱ درصد آگارز مشاهده شد. پس از استخراج ژنوم، ژن 16SrRNA با تکنیک PCR و با استفاده از پرایمرهای universal با نام‌های F و R تکثیر شد (۲۸ و ۲۹). آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از:

Primer F: 5' –GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'

Primer R:5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT -3'

اجزا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) عبارتند از: ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر Mgcl2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای پیش‌رو و معکوس (۱۰ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA Taq Polymerase که با آب تزریقی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۴°C بمدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخهٔ تکرارشونده شامل واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶°C بمدت ۱ دقیقه و سنتز در دمای ۷۲°C بمدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی نیز در دمای ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

جهت شناسایی نهایی باکتری مورد نظر، محصول حاصل از PCR بطول ۱۵۰۰ bp الکتروفورز و پس از تخلیص، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و بصورت دو طرفه خوانش تعیین توالی گردید. توالی حاصل، با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro ویرایش و توسط نرم افزار BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)، با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و نزدیک‌ترین سویه بر اساس توالی ژن 16SrRNA انتخاب شد.

تحلیل و رسم درخت فیلوژنتیک سویهٔ جدا شده: بمنظور بررسی ارتباط فیلوژنی میان سویهٔ جداسازی شده و توالی-های مشابه موجود در پایگاه داده، همردیفی توالی‌های 16SrRNA توسط نرم افزار Clustal W انجام شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA4 (۵۲) و الگوریتم Neibour-Joining(NJ) ترسیم شد (۲۰ و ۴۸). توالی بدست آمده از تحقیق حاضر در بانک ژنی NCBI ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز از سویه جداشده: بمنظور تأیید خاصیت هیدرولیزکنندگی نشاسته، تولید آمیلاز در پلیت آگار نشاسته‌دار مورد بررسی کیفی قرار گرفت (شکل

۷) و سنجش کمی فعالیت آن نیز براساس روش برنفلد (Bernfeld) و با استفاده از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک (DNS) صورت پذیرفت (۸). ابتدا سویهٔ جداشده در محیط LB براث بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۵°C کشت داده شد. سپس برای شکستن دیواره سلولی و رهاسازی آنزیم‌ها، محیط کشت روی یخ با قدرت ۸۰ پالس بمدت ۳۰ ثانیه و به تعداد ۱۳ بار سونیکیت شد. پس از سونیکیشن، محیط کشت با دور ۱۰۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و سوپ رویی که حاوی آنزیم بود برای سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز مورد استفاده قرارگرفت. بدین منظور، ۴۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاوی آنزیم به ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد محلول در ۱۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار بعنوان سوبسترا اضافه شد (pH= ۷). جهت انجام واکنش، مخلوط حاصل بمدت ۲ ساعت در دمای ۵ °C قرار داده شد. در مرحلهٔ بعد، واکنش آنزیمی با اضافه کردن یک میلی‌لیتر از معرف DNS به مخلوط و قراردادن آن بمدت ۵ دقیقه در آب جوش پایان یافت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید (۴۴).

سنجش فعالیت آنزیم زایلوز ایزومراز از سویهٔ جدا شده: زایلوز ایزومراز آنزیم مهمی است که ایزومریزاسیون برگشت‌پذیر گلوکز به فروکتوز و زایلوز به زایلولوز را کاتالیز می‌کند و در تولید صنعتی شربت فروکتوز با درصد شیرینی بالاتر از ساکارز مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر استفادهٔ این آنزیم در صنایع غذایی، بدلیل کاربردهای بالقوهٔ آن در صنعت سوخت‌های زیستی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۳). بدلیل اهمیت موضوع، تولید این آنزیم مهم در سویهٔ جدید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تولید آنزیم زایلوز ایزومراز بوسیله تست سیلوانف تصدیق شد (۳۴ و ۴۶). بدین منظور ابتدا سویهٔ جدا شده در محیط LB براث کشت داده شد. در مرحلهٔ بعد برای رهاسازی آنزیم، محیط کشت با شرایط عنوان شده در بالا سونیکیت شد. سپس برای بررسی فعالیت آنزیم زایلوز ایزومراز، پس از سانتریفیوژ محیط سونیکیت شده در دور ۱۰۰۰۰rpm بمدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C، ۵ میلی لیتر از سوپ رویی برداشته و به آن ۵ میلی لیتر سوبسترای گلوکز ۱ مولار اضافه شد. پس از قرار دادن مخلوط حاصل روی یخ، در زمانهای صفر، ۲، ۴، ۶ ساعت، یک میلی لیتر از آن را برداشته و با اضافه کردن یک میلی‌لیتر از معرف سیلوانف و قراردادن مخلوط بمدت ۵ دقیقه در آب جوش واکنش آنزیمی پایان یافت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰nm قرائت گردید (۱۸).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از سویه جدا شده: کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات از باکتریها گرفته تا گیاهان و جانوران یافت می‌شود و وظیفهٔ محافظت از سلول در برابر تخریب اکسیداتیو آب اکسیژنه را بر عهده دارد. این آنزیم، آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (۱۴). کاتالاز دارای بالاترین Turn over در بین آنزیم‌ها می‌باشد؛ زیرا هر مولکول آنزیم قادر به تجزیهٔ بیش از یک میلیون مولکول پراکسید هیدروژن است (۲۱). بدلیل اهمیت کاتالاز بعنوان یکی از آنزیم‌های مهم در زمینه‌های مختلف صنعتی و بیوتکنولوژی و کشاورزی از جمله زیست پالایی و صنایع غذایی و غیره (۳۰ و ۳۵)، در پژوهش حاضر کیفیت این آنزیم در سویهٔ جدا شده مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش بر طبق دستورالعمل مندرج در مقالات پیشین با کمی تغییر صورت پذیرفت (۲۷). بدین منظور پس از کشت باکتری و سونیکیت روی یخ، محلول رویی توسط سانتریفیوژ جدا شد. سپس ۴ لام یا لوله با اندازه یکسان برداشته و درون هر یک مقدار یکسانی از پراکسید هیدروژن (۳۰۰ میکرولیتر) ریخته شد (البته یکی از لوله‌ها برای کنترل منفی است). لوله‌ها را در دماهای مختلف مورد نظر قرارداده تا پراکسید به دمای مورد نظر برسد. سپس به هر لوله، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با همان دما اضافه شده و پس از گذشت زمان ۳ دقیقه، کیفیت تشکیل حباب در لوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش فعالیت آنزیم در دماهای ۵°C

و ۱۰ °C و ۱۵ °C بررسی شد و نتایج حاصل از آن در بخش مربوطه ارائه گردید.

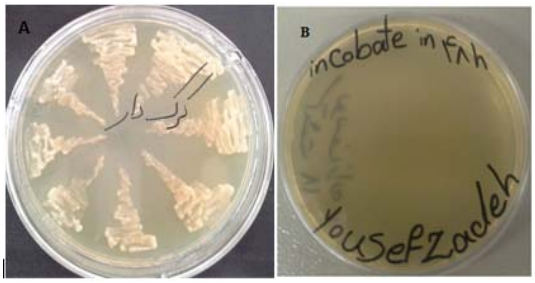
ارزیابی فعالیت آنزیم اکسیداز از سویه جدا شده: باکتری‌ها اصولاً به دو روش انرژی تولید می‌کنند یا با تخمیر یا با اکسیداسیون مواد آلی که این گروه از باکتریها آنزیم اکسیداز دارند و اصطلاحاً اکسیداز مثبت هستند. اکسیدازها برداشت هیدروژن از سوبسترا را کاتالیز می‌کنند اما از اکسیژن فقط بعنوان گیرندهٔ هیدروژن استفاده می‌کنند (۱۹ و ۳۶). اگر باکتری دارای آنزیم اکسیداز باشد (مانند *Pseudomonas* یا *Gonococcal*) در صورت مجاورت با سوبستراهایی مانند تترا متیل پی فنیلین دی آمین و یا معرف کواکس به رنگ بنفش تغییر رنگ می‌دهد و اگر اکسیداز منفی باشد (مانند آسینتوباکتر) تغییر رنگ نداریم. در این پژوهش فعالیت آنزیم اکسیداز بر اساس روش ارائه شده در مقالات بشرح زیر ارزیابی شد (۳۱). ابتدا مقداری از سوپ رویی کشت سونیکیت شده روی کیتی که حاوی سوبستراست ریخته می‌شود، تغییر رنگ کیت نشان‌دهندهٔ وجود آنزیم اکسیداز می‌باشد (۷ و ۵۰).

ارزیابی فعالیت آنزیم سرین پروتئاز از سویه جدا شده: تنها ۸ درصد از آنزیم‌های صنعتی از منابع گیاهی و ۴ درصد آن از منابع جانوری تولید می‌شوند و مابقی خاستگاه میکروبی دارند (۱۰). میکروارگانیسم‌ها از مهم‌ترین و عمده‌ترین منابع تولید آنزیم‌ها بوده که بیشتر آنها متعلق به جنس باسیلوس‌ها و سودوموناس‌ها هستند (۶ و ۹). از بین آنزیم‌های باکتریایی، پروتئازها بدلیل کاربرد وسیعشان در صنایع مختلف، بسیار مورد توجه قرار می‌گیرند (۳۲ و ۴۵). در میان پروتئازها، سرین پروتئازها بعلت پایداری و فعالیت در pH بالا نقش مهمی در دناتوره کردن پروتئین‌ها در محیط قلیایی بازی می‌کنند و کاربرد وسیعی در صنایع دارند (۲۳).

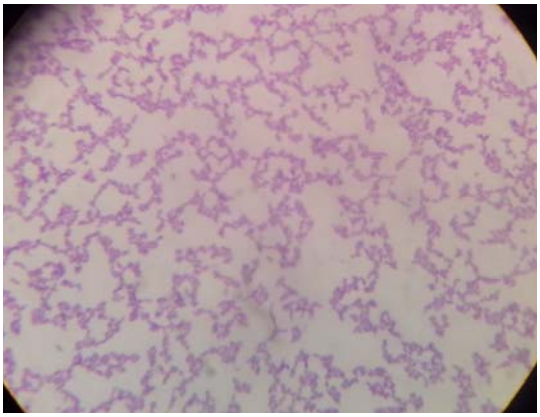
بررسی‌های صورت گرفته در سال ۲۰۱۶ بر روی گونه‌های مختلف سودوموناس نشان داد، برخی ازگونه‌ها توانایی تولید آنزیم سرین پروتئاز را داشته که در دماهای مختلف فعالیت متفاوتی را نشان می‌دهند (۴). در پژوهش حاضر بررسی کمّی وجود این آنزیم در دماهای مختلف طبق دستورالعمل موجود در مقالات پیشین با اندکی تغییرات (۱۱ و ۲۲) صورت گرفت. بدین منظور پس از کشت باکتری و سونیکیت روی یخ، توسط سانتریفیوژ، محلول رویی جدا شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول BSA ۱ درصد بعنوان سوبسترا بهمراه ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات در داخل لوله آزمایش با هم مخلوط و همراه با لولهٔ بلانک (نمونهٔ کنترل) که شامل همهٔ مواد بجز محلول رویی بود، بمدت ۱۰ دقیقه در داخل یخچال قرار داده شد و سپس جذب در ۲۸۰ nm قرائت گردید. در مرحلهٔ بعد برای بررسی اثر مهارکنندهٔ PMSF بر فعالیت آنزیم، در آزمایشی مشابه، ابتدا محلول رویی با مهارکننده PMSF مخلوط سپس به محلول واکنش اضافه شد و پس از گذشت زمان‌های مختلف جذب در ۲۸۰ nm قرائت شد. در تحقیق حاضر زمان و دماهای متفاوتی برای بررسی فعالیت این آنزیم انتخاب و نتایج آن در بخش مربوطه ارائه گردید.

نتایج

باکتری سرمادوست از رودهٔ گونهٔ جدید سخت پوست گاماروس بومی چشمه آب سرد کوههای زاگرس جداسازی شد. رشد بهینهٔ این باکتری در دمای ۵°C و کمتر بود و در دمای ۳۷°C هیچگونه رشدی از خود نشان نداد (شکل ۱). از لحاظ مورفولوژی در زیر میکروسکوپ به شکل کوکوباسیل گرم منفی دیده شد (شکل ۲). نتایج مربوط به آزمونهای بیوشیمیایی این سویه بومی نیز در جدول ۱ ارائه شده است.



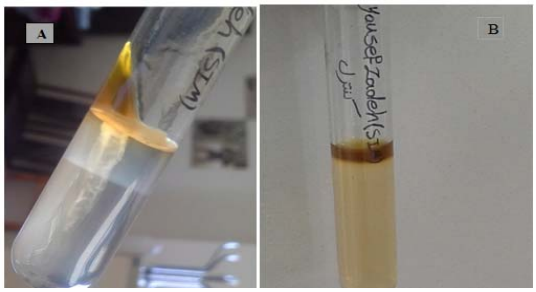
شکل ۱- (A) پلیت کشت داده شده در دمای ۵ °C و (B) پلیت انکوبه شده در دمای ۳۷°C.



شکل ۲- گستره سویه جداشده در زیر میکروسکوپ.

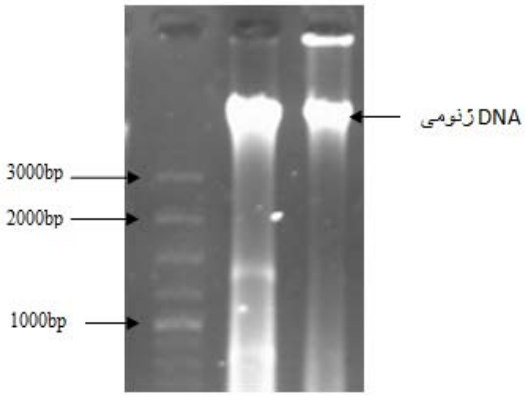
جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری استخراج شده از روده گاماروس

Morphology	Gram stain	Catalase test	Oxidase test	Motility	Starch hydrolysis	Citrate	Glucose	VP test	H2S	Indole	Growth at 30°C
cocobacil	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

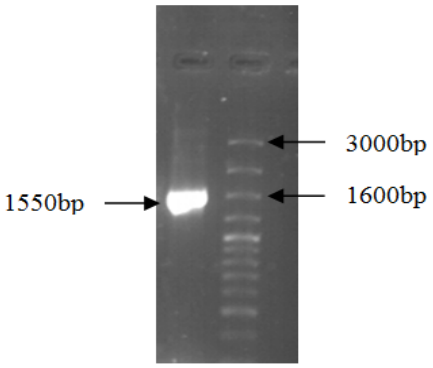


شکل ۳- (A) تست مربوط به حرکت سویهٔ جداشده و (B) نمونهٔ کنترل منفی .

استخراج ژنوم باکتری و انجام PCR جهت تکثیر قطعه 16SrRNA: ابتدا ژنوم باکتری استخراج شد (شکل ۴). سپس بمنظور شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده، تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت پذیرفت (شکل ۵). ژن تکثیری توسط شرکت ماکروژن از دو طرف خوانش گردید. نتایج حاصل از BLAST توالی بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، شباهت ۹۹/۶۴ درصدی این سویهٔ جدید به باکتری *Pseudomonas Fragi* را نشان داد که با شمارهٔ دسترسی MK961220 در GenBank ثبت شد (جدول ۲).



شکل ۴- محصول استخراج DNA ژنومی سویهٔ جدا شده همراه با مارکر ۱۰۰bp.



شکل ۵- محصول PCR ژن 16SrRNA درسویهٔ جدا شده همراه با مارکر ۱۰۰bp.

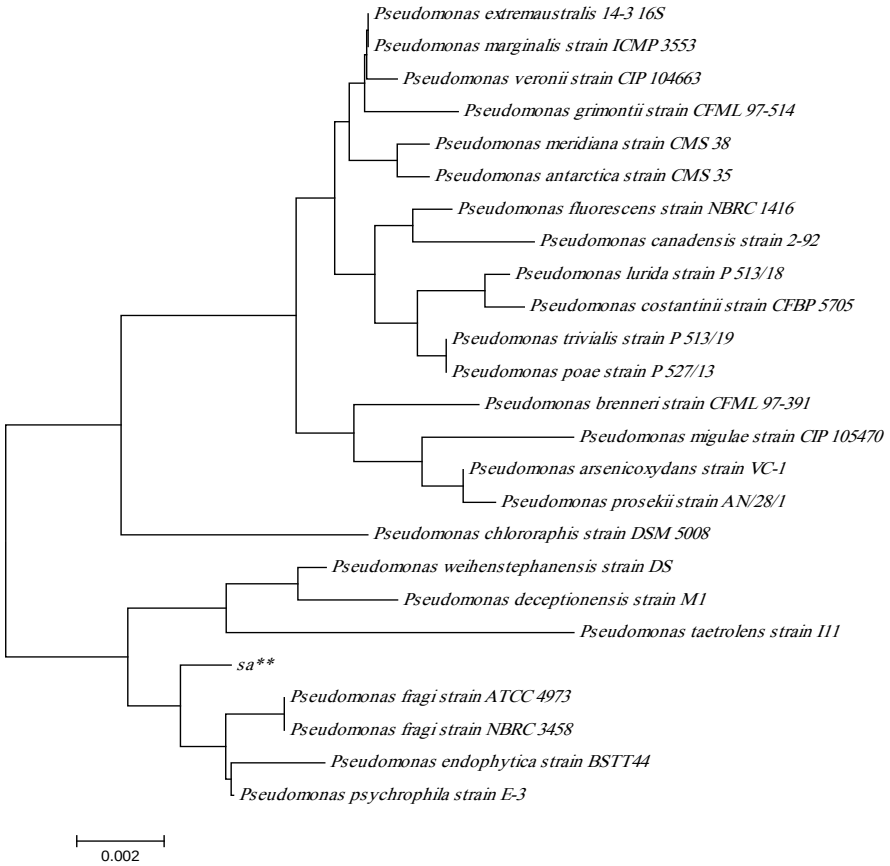
جدول ۲- شناسایی مولکولی سویهٔ جداسازی شده بر اساس مقایسه توالی ژن 16SrRNA با سویه‌های معتبر در بانک اطلاعاتی ژنوم

شماره دسترسی **	نام سویه	درصد شباهت
MK961220	*Pseudomonas fragi*	99/64

**** شماره دسترسی، توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعات ژنوم NCBI می‌باشد.**

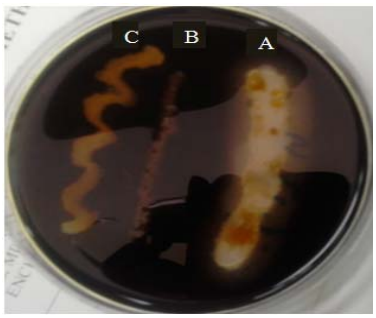
نتایج تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که جنس‌های *Pseudomonas*، *Azospirillum* و *Bacillus* از جمله میکروارگانیسم‌های تجاری بشمار می‌روند؛ یعنی نسبت به جنس‌های دیگر بطور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند و آنزیم‌های موجود در آنها بصورت نوترکیب بمیزان وسیع در صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). در تحقیق حاضر نیز سویهٔ شناسایی شده، متعلق به جنس *Pseudomonas* می‌باشد که در تحقیقات متعدد نقش‌های زیادی برای این جنس مطرح شده است (۹).

بمنظور بررسی رابطهٔ فیلوژنتیکی میان سویهٔ شناسایی شده با نمونه‌های بدست آمده از BLAST، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA4 و روش Neibour-Joining (NJ) (۱۹) رسم شد. نتایج حاصل از درخت فیلوژنی نشان می‌دهد که سویه مورد مطالعه (sa**) با باکتری *Pseudomonas fragi* در یک کلاد خواهری قرار گرفته است (شکل ۶). توالی بدست آمده از تحقیق حاضر در بانک ژنی NCBI ثبت شد.



شکل ۶- درخت فیلوژنی باکتری شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش(Neibour-Joining (NJ. باکتری جداشده با ستاره مشخص شده است.

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز: همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود هاله تشکیل شده در اطراف کلنی مورد نظر بیانگر توانایی تولید آنزیم آمیلاز توسط ایزوله جداشده می‌باشد و با توجه به نتایج تکمیلی بدست آمده از بررسی کمّی که با استفاده از روش بنفیلد در طول موج ۵۴۰nm و در دماهای $0^{\circ}C$ و $12^{\circ}C$ صورت پذیرفت، این باکتری از توانایی بالایی برای تولید این آنزیم برخوردار است (شکل ۸ و جدول ۳). بر اساس نتایج حاصله، میزان فعالیت این آنزیم در دمای صفر درجه بیشتر از فعالیت آن در دمای ۱۲ درجه می‌باشد.



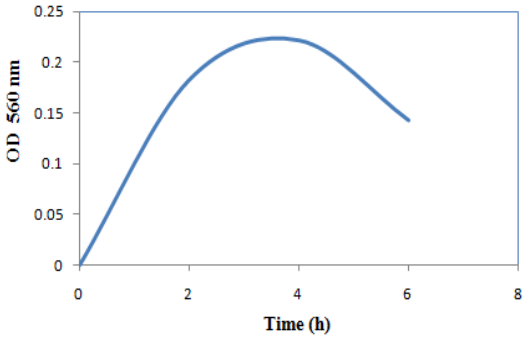
شکل ۷- (A) بررسی کیفی آنزیم آمیلاز تولید شده توسط سویه مورد مطالعه و (B و C) نمونه‌های کنترل فاقد آنزیم آمیلاز.

شکل ۸- بررسی کمی آنزیم آمیلاز تولید شده توسط سویه مورد مطالعه، سمت راست میکروتیوب حاوی آنزیم وسمت چپ شاهد.

جدول ۳- نتایج بررسی کمّی فعالیت آنزیم آمیلاز

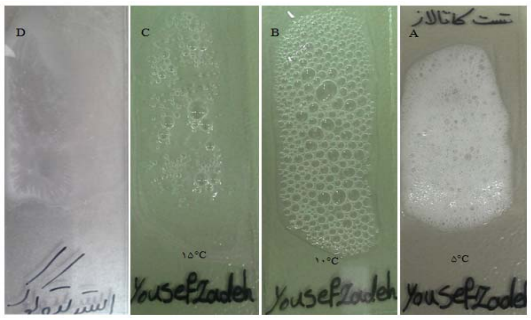
دما ($^{\circ}C$)	جذب (۵۴۰nm)
روی یخ (صفر درجه)	۰/۴۷۸
۱۲ درجه	۰/۲۸۱

سنجش فعالیت آنزیم زایلوز ایزومراز: بررسی کمّی آنزیم زایلوز ایزومراز با سوبسترای گلوکز ۱ مولار و معرف سلیوانف انجام شد (۸). ایجاد رنگ قرمز نشاندهندهٔ وجود فروکتوز بدلیل حضور آنزیم زایلوز ایزومراز می‌باشد. شدت رنگ در طول موج ۵۶۰ nm در ۴ تکرار قرائت گردید. با توجه به نتایج، بیشترین فعالیت آنزیم بعد از ۴ ساعت بدست آمد که نمودار آن در شکل ۹ نشان داده شده است.



شکل ۹- تعیین زمان بهینه برای فعالیت آنزیم در دمای صفر درجه.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از سویه جدا شده: طبق نتایج مشاهده شده در شکل ۱۰، این سویه جدید از توانایی تولید میزان بالایی از آنزیم کاتالاز برخوردار بوده که فعالیت آن در دماهای پایین بیشتر از فعالیت آن در دماهای بالا است.



شکل ۱۰- ارزیابی کیفی آنزیم کاتالاز و بررسی فعالیت آن در دماهای مختلف.

A و B و C بترتیب نشاندهندهٔ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سویهٔ جدا شده در دماهای ۵ و ۱۰ و ۱۵ درجه می‌باشد در حضور استرپتوکوک بعنوان کنترل منفی برای تولید آنزیم کاتالاز(D).

سنجش فعالیت آنزیم اکسیداز از سویه جدا شده: بمنظور سنجش فعالیت آنزیم اکسیداز بصورت کیفی از کیت

استفاده شد که رنگ آبی مایل به بنفش نشاندهندهٔ وجود آنزیم اکسیداز می‌باشد (شکل ۱۱).

شکل ۱۱- ارزیابی کیفی آنزیم اکسیداز

ارزیابی فعالیت آنزیم سرین پروتئاز از سویهٔ جدا شده: نتایج آزمون ارزیابی تولید آنزیم سرین پروتئاز در این پژوهش نشان داد که سویه شناسایی شده از توانایی تولید این آنزیم برخوردار است (جدول ۴). طبق نتایج بدست آمده این آنزیم در دماهای پایین نظیر ۵°C پایدارتر از دماهای بالا نظیر ۱۲°C می‌باشد. بطوری که در دمای ۱۲ درجه بعد از گذشت ۲۰ دقیقه فعالیت آنزیم کاهش یافته در حالی که در دمای ۵ درجه، با گذشت این زمان فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. همچنین نتایج موجود در در جدول ۵ نشان می‌دهد که افزودن بازدارنده PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلوراید) سبب مهار آنزیم سرین پروتئاز شده است.

جدول ۴- نتایج مربوط به وجود آنزیم سرین پروتئاز از سویه جدا شده

دما	پس از گذشت ۱۰ دقیقه	پس از گذشت ۲۰ دقیقه
۵°C	۰/۷۵۱	۰/۹۳
۱۲°C	۰/۸۶	۰/۶۵

جدول ۵- نتایج مربوط به مهار آنزیم سرین پروتئاز با بازدارنده PMSF

پس از گذشت ۱۰ دقیقه	پس از گذشت ۲۰ دقیقه
۰/۲۵	۰/۰۳

بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر بدلیل اهمیت قابل توجه میکروارگانیسم-های سرمادوست، با هدف دستیابی به آنزیم‌های فعال در سرما، توجه ویژه‌ای به اکوسیستم‌های سرد و میکروارگانیسم‌های آن شده است (۱۷). تولید این آنزیم‌ها از نظر بیوتکنولوژی بسیار مفید و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه می‌باشد (۴۲). افزون بر این با افزایش دما می‌توان این آنزیم‌ها را غیر فعال نمود و به همین دلیل در مقایسه با انواع مزوفیل و ترموفیل آلودگی زیست محیطی ایجاد نمی‌کنند. **با** مطالعات صورت گرفته در مورد باکتری-های سرمادوست، توانایی آنها در تولید آنزیم‌های مختلفی نظیر آمیلازها، سلولازها، پکتینازها، بتاگالاکتوزیدازها، اکسیدازها، پروتئینازها، لیپازها و غیره اثبات شده است (۳۹). نتایج بررسی وجود آنزیم‌های مختلف از سویه بومی شناسایی شده در پژوهش حاضر و کاربردهای آن نیز در جدول ۶ خلاصه شده است.

بدلیل اهمیت این موضوع، در این مطالعه باکتری جداشده از روده سخت پوست گاماروس ساکن چشمه‌های آب سرد ارتفاعات زاگرس استان چهارمحال بمنظور توانایی تولید آنزیم‌های سرمادوست با پتانسیل بیوتکنولوژی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به بومی و جدید بودن گونه سخت پوست، پژوهش کنونی برای نخستین بار انجام شده است. شناسایی مولکولی این باکتری همولوژی ۹۹/۶۴ درصدی آن را با جنس *Pseudomonas* نشان داد که این نتایج با تست‌های بیوشیمایی صورت گرفته تطابق دارد. طبق گزارش اخیر در سال ۲۰۱۹ ریزوباکتر sp *Pseudomonas* از ریزوسفر گیاهان بدست آمد که بصورت همزیست با گیاه و تولید متابولیت‌های محرک رشد سبب افزایش رشد گیاه ونیز افزایش جوانه زنی دانه می‌شود (۴۳).

جدول ۶- نتایج بررسی وجود آنزیم‌های مختلف از سویه بومی شناسایی شده

آنزیم‌ها	کاربردها	تولید در سویهٔ جداشده
آمیلاز	در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، دارویی، نساجی، کاغذ، شوینده و غیره (۴۷ و ۵۱)	+
سرین پروتئاز	شوینده، صنایع لبنی، نساجی، تولید چرم، صنایع دارویی مثل پمادها و محلولهای شتشو (۴۹)	+
زایلوز ایزومراز	صنایع غذایی، نوشیدنی‌ها، صنایع نانوایی، تولید شربت فروکتوز، سوخت زیستی و غیره (۱۳)	+
کاتالاز	تهیه اسفنج، صنایع لبنی، شوینده‌ها، صنایع غذایی، زیست پالایی و غیره (۲۱ و ۵۱)	+
پراکسیداز	معرف برای تشخیص و تعیین گلوکز خون و ادرار، تعیین مقدار اتانول در مایعات بیولوژیک، تصفیه فاضلاب‌ها، دخالت در سنتز ترکیبات آروماتیکی مختلف و حذف فنولها و پراکسیدها از مواد زائد صنعتی (۱ و ۲۴)	+
لاکاز	در صنایع مختلف و نیز طیف وسیعی از فرآیندهای شیمیایی، نظیر رنگبری در صنعت نساجی، سفید کردن خمیر کاغذ، سمیت زدایی از پساب، پالایش زیستی، صنایع غذایی، تولید مواد آلی از سوبسترای فنولی و آمینی، پیل‌های سوختی، زیست نانو فناوری و غیره (۱۵ و ۲۶)	+

از این رو ما فرض کردیم که احتمالاً این سویه نیز بصورت همزیست در ریشه گیاهان قرار دارد و پس از خورده شدن ریشه گیاهان توسط سخت پوست گاماروس، وارد دستگاه گوارش این سخت پوست شده است. اگر این فرض درست باشد، بر اساس رژیم غذایی سلولزی و پروتئینی گاماروس، شاید بتوان از این سویه جدید برای تحریک جوانه‌زنی دانه‌ها و بذرها در مناطق سردسیر کشور نیز بهره برد. البته تحقیقاتی در این زمینه و استفاده از این سویه جدید و بررسی تأثیر آن در رشد گیاه در حال انجام است. رشد بهینه ایزوله جدا شده این تحقیق در دماهای پایین با نتایج بدست آمده از تحقیقات Gavali, J., & Pathak, A. در سال ۲۰۱۵ مطابقت دارد. این محققان نیز توانستند از یخچال‌های طبیعی، سویه‌ای را جداسازی کنند که رشد بهینه آن در دمای ۵ °C بود (۴۱). البته، علیرغم گزارش آنها مبنی بر عدم توانایی مصرف ایزوله جداشده از نشاسته، در تحقیق حاضر سویه جدید بدلیل تولید آنزیم آمیلاز فعال، توانایی مصرف نشاسته را داشته و آزمایشات کیفی و کمی چندین بار تکرار شدند تا نتایج تأیید شوند. با وجود اینکه اطلاعات زیادی در مورد آنزیم‌های موجود در *Pseudomonas fragi* در دست نیست ولی زنوم کامل دو سویه از آن بنام‌های A22 و B25 توسط Wang, Q و همکارانش تعیین توالی شده است (۵۳) و توالی ژن‌های مختلف آن از جمله ژن تولید کننده آنزیم آمیلاز در Gene bank ثبت شده است. در خصوص آنزیم پروتئاز *Pseudomonas fragi* نیز گزارش‌های محدودی ارائه شده است. در گزارشی Noreau و همکارانش در سال ۱۹۷۹ این آنزیم را جداسازی کرده‌اند (۳۸). در پژوهش حاضر نیز نتایج، بیانگر تولید این آنزیم توسط سویه جدید می-باشد که جهت کسب جزئیات بیشتر تحقیقات بیشتری نیاز است. این سویه همچنین قادر به تولید زایلوز ایزمراز است که در صنایع تولید آبمیوه مصرف زیادی دارد و با توجه به اینکه ژن تولید کننده این آنزیم از *Pseudomonas fragi* در Gene bank موجود می‌باشد، امکان تحقیق جامعی راجع به آن فراهم شده است. در این پژوهش ما وجود این آنزیم را در سویه جدید بررسی نمودیم. ناگفته نماند تنها از سر کنجکاوی این سویه جدید را روی پلیت حاوی متیلن بلو و در حضور سویه لاکاز منفی کشت دادیم و مشاهده کردیم که بخوبی رشد کرد و حدس می‌زنیم که این سویه جدید توانایی حذف آلاینده‌ها را نیز داشته باشد. همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده شد این سویهٔ جدید همچنین از پتانسیل بالایی برای تولید آنزیم کاتالاز سرمادوست برخوردار است که کاربرد وسیع در صنایع مختلف دارد. در پژوهشی که توسط Pathak, A و Gavali, J ارائه شده، تنها به حضور و عدم حضور کاتالاز در *Pseudomonas fragi*

اشاره شد و بررسی کیفی و کمی از آنزیم کاتالاز جهت مقایسه ارائه نشده است (۴۱). در مورد دیگر آنزیم‌ها نیز وضع به همین منوال است. البته در مورد گونه‌های دیگر *Pseudomonas* نظیر *fluorescens* و *aeruginosa* تحقیقات بیشتری انجام شده است؛ ولی علیرغم اهمیت آنزیم‌های سرمادوست و کاربرد وسیعشان در صنایع مختلف، متأسفانه هنوز پژوهش‌های زیادی در مورد آنزیم-های *Pseudomonas fragi* صورت نگرفته است. نظر به اینکه سویهٔ جدید، بومی کشورمان ایران می‌باشد و با توجه به پتانسیل بالای آن در تولید آنزیم‌های سرمادوست که در دماهای بسیار پایین قادر به فعالیت می‌باشند، این سویه کاندید بسیار مناسبی جهت تخلیص آنزیم به فرم طبیعی یا تولید آنزیم‌های سرمادوست نوترکیب جهت استفاده در صنایع مختلف می‌باشد و استفاده از این آنزیم‌ها در صنایع، موجب افزایش کیفیت محصولات شده و با ایجاد ارزش افزوده، افزایش درآمد را برای شرکت‌های مربوطه در پی خواهد داشت.

منابع

1- Agarwal, S., Gupta, K. K., Chaturvedi, V. K., Kushwaha, A., Chaurasia, P. K., & Singh, M. P. (2018). The Potential Application of Peroxidase Enzyme for the Treatment of Industry Wastes، In Research Advancements in Pharmaceutical, Nutritional, and Industrial Enzymology . 278-293.

2- Amico S.D., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life.Embo Rep.7:385–389.

3- Amico S, Gerday C, Feller G (2001) Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. J Biol Chem 276: 25791-25796.

4- Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Lucchini, R., Novelli, E., & Cardazzo, B. (2016). Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: preliminary results. Italian journal of food safety, 5(4).

5- Antikainen, M. and Griffith, M. (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. Plant Physiology 99: 423-432.

6- Archer, D. B. (1994). Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, 373-393.

7- Atlas, R. M., & Snyder, J. W. (2006). Handbook of media for clinical microbiology. CRC Press.

8- Bernfeld, P.,(1955). Amylases, α and β.Methods in Enzymology 1: Academic Press; pp. 149-589.

9- Bommarius, A. S., & Riebel-Bommarius, B. R. (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. John Wiley & Sons.

10- Bornscheuer, U. T., & Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. Current opinion in chemical biology, 5(2), 137-143.

11- Caballero, A.R., Moreau, J.M., Engel, L.S., Marquart, M.E., Hill, J.M., and O'Callaghan, R.J. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. Anal Biochem 290: 330– 337.

12- Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrewss D, Sowers KR (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. Curr Opin Biotechnol 13: 253–261.

13- Chanitnun, K., & Pinphanichakarn, P. (2012). Glucose (xylose) isomerase production by *Streptomyces sp*. CH7 grown on agricultural residues. Brazilian Journal of Microbiology, 43(3), 1084-1093.

14- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61(2), 192-208.

15- Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology advances, 24(5), 500-513.

16- D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, et al. (2002) Molecular basis of cold adaptation. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 357: 917-925.

17- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO reports, 7(4), 385-389.

18- Dische Z, Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. The Journal of Biological Chemistry. 1951;192(2):583-587.

19- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (1998). Diagnostic microbiology (pp. 355-61).

20- Gascuel, O., & Steel, M. (2006). Neighbor-joining revealed. Molecular biology and evolution, 23(11), 1997-2000.

21- Goodsell, D. S. (2004). Catalase. Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank.

22- Guedes, H. L., Neto, J. M. R., Fonseca, M. A., Salles, C. M., Rossi-Bergmann, B., & De-Simone, G. (2007). Identification of serine proteases from *Leishmania braziliensis*. Zeitschrift für Naturforschung C, 62(5-6), 373-381.

23- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. Process Biochemistry, 44(1), 29-35.

24- Hamid, M. (2009). Potential applications of peroxidases. Food chemistry, 115(4), 1177-1186.

25- Herla, K. K., Ghosh, M., Kumar, P. S., & Sambasiva Rao, K. R. S. (2011). Psychrozymes-the next generation industrial enzymes. J Marine Sci Res Development, 1(2).

26- Imran, M., Asad, M. J., Hadri, S. H., & Mehmood, S. (2012). Production and industrial applications of laccase enzyme. Journal of Cell & Molecular Biology, 10(1).

27- Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K. I., Hironaka, I., Kamata, Y & Mizunoe, Y. (2013). A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. Scientific reports, 3, 3081.

28- James, Greg (15 May 2018). "Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene". PCR for Clinical Microbiology. Springer, Dordrecht. pp. 209–214. doi:10.1007/978-90-481-9039-3_28. ISBN 978-90-481-9038-6.

29- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW (June 2006). "Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China". Applied and Environmental Microbiology. 72 (6): 3832–45.

30- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 16, 192-199.

31- Kovács, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178:703.

32- Kumar C, Takagi H. (1999), Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnol Adv*; 17(7): 561–94.

33- Kumar, P. S., Ghosh, M., Pulicherla, K. K., & Rao, K. R. S. S. (2011). Cold active enzymes from the marine psychrophiles: biotechnological perspective. Advanced Biotechnol, 10, 16-20.

34- Lee, S. M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2012). Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 78(16), 5708-5716.

35- Luhova, L., Lebeda, A., Hedererova, D., & Pec, P. (2003). Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of Pisum sativum L. under different light conditions. Plant soil and environment, 49(4), 151-157.

36- MacFaddin JF. Biochemical tests for Identification of medical Bacteria . 3rd ed . Philadelphia: lippincott Williams and wilkins, 2000 .P: 368-77.

37- Margesin R, Feller G, Gerday C, Russell N (2002) Cold-Adapted Microorganisms: Adaptation Strategies and Biotechnological Potential. In: The Encyclopedia of Environmental Microbiology G. Bitton (Ed.) John Wiley & Sons New York 2: 871-885.

38- Noreau, J. E. A. N., & Drapeau, G. R. (1979). Isolation and properties of the protease from the wild-type and mutant strains of *Pseudomonas fragi*. Journal of bacteriology, 140(3), 911-916

39- Okuyama H. et al. (1998) Cold-adapted microorganisms for use in food biotechnology. In: Margesin R., Schinner F. (eds.): Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms. Berlin: 101-117.

40- Parte, A. (2012). Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The actinobacteria. Springer Science & Business Media.

41- Pathak, A, & Gavali, J (2015). Isolation and Identification Of Cold Active Amylase Producer From Gastro Intestinal Tract Of Channa Striata. Current Trends in Aquaculture, 53.

42- Pulicherla, K. K., Ghosh, M., Kumar, P. S., & Sambasiva Rao, K. R. S. (2011). Psychrozymes-the next generation industrial enzymes. J Marine Sci Res Development, 1(2).

43- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A & Chebli, B. (2019). Applications of new rhizobacteria Pseudomonas isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. Scientific reports, 9(1), 1-10.

44- Ramian, P., Arabi, M., & Hemmati, R. (2018). Novel Amylase in Coelomic Fluid and Body Extract from the Earthworm *Allolobophora Chlorotica*. Biomacromolecular Journal, 4(1), 35-45.

45- Rao M, Tanksala A, Ghatge M, Deshpande V.(1998), Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev; 62(3): 597-635.

46- Ravikumar, S., Vikramathithan, J., & Srikumar, K. (2011). Purification and characterization of a novel thermostable xylose isomerase from *Opuntia vulgaris* mill. Applied biochemistry and biotechnology, 164(5), 593-603.

47- Saini, R., Saini, H. S., & Dahiya, A. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *J.* Pharmacogn. Phytochem, *6*(4), 1865-1871.

48- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, *4*(4), 406-425.

49- Sawant, R., & Nagendran, S. (2014). Protease: an enzyme with multiple industrial applications. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(6), 568-579.

50- Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol.

51- Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., & Puri, M. (2017). Types, Structure, Applications and Future Outlook. Microbial Enzyme Technology in Food Applications, 241.

52- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution, 24(8), pp.1596-1599.

53- Wang, Q & Mei, Y., Sun, Y., He, J., Sun, Y., Shao, W. (2012). Genome sequences of *Pseudomonas fragi* strains A22 and B25.

Isolation, identification and evaluation of enzymes of a new psychrophilic bacterium from the intestine of Crustacean *Gammarus sp* collected from cold springs of Saman (Chahrmahal va Bakhtiari)

Yousefzadeh M.[1], Hemmati R.[2,3]*, Saffar B.[1] and Noori A.[4]

[1]Dept. of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Sharekord, I.R. of Iran.

[2]Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Sharekord, I.R. of Iran.

[3] Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Sharekord, I.R. of Iran.

[4]Dept. of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Psychrophilic bacteria are useful in biotechnology due to their ability to produce different enzymes capable of catalyzing biochemical reactions at low temperatures. Therefore, many studies have been done on these bacteria in recent years. The aim of this study was to isolate and identify the bacteria producing cold-adapted enzymes from the intestine of the new species of crustacean *Gammarus* species living in cold water spring of Saman in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. The *Gammarus* samples were collected from cold spring of Saman. After transfer to the laboratory, bacteria were collected from the intestines in sterile condition. Then after, bacteria were cultured on the LB media and incubated at 5˚C temperature. Grown colonies were studied based on morphological characteristics, biochemical tests, and finally molecular identification was performed based on 16SrRNA sequence determination. A native strain of psychrophilic bacteria was isolated and identified, deposited with GenBank accession number MK961220. More experiments show that the new strain is capable of producing amylase, xylose isomerase, catalase, oxidase, and serine protease and laccase enzymes. The maximum activity and stability of most of the investigated enzymes were assayed at 5˚C. This study was conducted for the first time in the country to investigate the potential and some properties of extracellular enzymes produced by the new psychrophilic strain. According to our research, this strain can be considered as a suitable candidate for the production of cold adapted enzymes which are widely used in various industries.

Key words: Psychrophile; *Gammarus*; 16SrRNA; enzyme; *Pseudomonas fragi*