Archive of SID

جدا سازی تعدادی از باکتری‌های سلولولیتیک بومی و بررسی سیستم آنزیم سلولازی آنها برای تجزیه ضایعات لیگنو سلولزی

حسین صفاری[1]، احمد علی پوربابایی، احمد اصغرزاده و حسین بشارتی

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **hosaffary@yahoo.com**

دانشیار گروه مهندسی و علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران؛ **pourbabaei@ut.ac.ir**

دانشیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ، ایران؛ **a_asgharzadeh_2000@yahoo.com**

استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛

besharati1350@yahoo.com

دریافت: **97/7/11** و پذیرش: **97/12/20**

چکیده

باکتری‌های سلولولیتیک با داشتن سیستم آنزیم سلولازی نقش مهمی در تجزیه ضایعات لیگنوسلولزی و تسریع فرایند کمپوست سازی دارند. به همین منظور تحقیقی روی تعدادی از باکتری‌های سلولولیتیک در بخش تحقیقات بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شد. پس از نمونه‌برداری از منابع مختلف بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی جدایه‌ها و آزمون اولیه سلولولیتیک بودن باکتری‌ها روی محیط اختصاصی B.H.M اقدام و تعداد 28 جدایه با قدرت سلولازی جداسازی و خالص سازی شد. کشت نقطه‌ای روی محیط کشت اختصاصی و مشاهده قطر هاله به عنوان شاخص سلولولیتیک بودن جدایه‌ها منجر به تفکیک 12 جدایه با هاله بزرگ‌شد. بیشترین قطر هاله از جدایه MAL به میزان 31 میلیمتر و کمترین قطر هاله از جدایه HSE به میزان هشت میلیمتر بود. بیشترین نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه TER و کمترین نسبت در جدایه CPL مشاهده شد. اندازه‌گیری تولید آنزیم‌های سه گانه سلولازی اندو گلوکاناز، بتا گلوکزیداز و اگزوگلوکاناز 12 جدایه منتخب از 28 جدایه با توان سلولازی نشان داد که کمترین مقدار اندوگلوکاناز در جدایه SAD به میزان 0/17 و بیشترین مقدار از جدایه NTL به میزان 2/55 واحد آنزیمی بود. بیشترین فعالیت آنزیمی بتا گلوکزیداز مربوط به جدایه NTT به میزان 0/31 واحد آنزیمی و اگزوگلوکاناز در جدایه HPN به میزان 0/35 واحد آنزیمی و کمترین میزان در جدایه BSB به میزان 0/18 واحد آنزیمی اندازه گیری شد. تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بین فعالیت جدایه با بیشترین و کمترین فعالیت سه گانه سلولازی به ویژه آنزیم اندوگلوکاناز از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. بین قدرت سلولازی با ترکیب آنزیمی ارتباط مستقیم می‌باشد به نحوی که جدایه NTT علاوه بر تولید بیشترین فعالیت آنزیم بتا گلوکزیداز و مجموع فعالیت سه آنزیم (3/21 واحد آنزیمی) از نظر تولید اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز به ترتیب در رده دوم و سوم قرار گرفت و با نام *Bacillus methyltrophicus* شناسایی و ثبت شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم سلولاز، باکتری، هیدرولیز آنزیمی، ضایعات لیگنوسلولزی

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج – بلوار امام خمینی مشکین دشت- جنب کانال آب- موسسه تحقیقات خاک و آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اولین تحقیق برروی تجزیه میکربی سلولز به حدود سه دهه قبل توسط استوارد و همکاران (1976) بر روی محیط های مختلف کربنی انجام شد. آنزیمهای تجزیه کننده سلولز به وسیله تعداد زیادی از ریزجانداران از قبیل باکتری‌ها ساخته می شود. هیدرولیز آنزیمی سلولز طبیعی توسط دسته ای از آنزیم ها کاتالیز می‌شود که به طریقه سینرژیسم با هم عمل می‌کنند. سیستم آنزیمی تجزیه کننده سلولز ریزجانداران مختلف اغلب با هم متفاوت هستند. برخی از ریزجانداران مقادیر زیادی از آنزیم های تجزیه کننده سلولز را به محیط کشت خود ترشح می‌کنند، در حالی که دسته دیگر با وجود رشد روی سلولز هیچ آنزیمی و یا مقدار کمی آنزیم به محیط ترشح می‌نمایند (اناری و همکاران، 1983). برای راه‌اندازی یک فرآیند میکروبی جهت هیدرولیز سلولز، نخستین مسئله‌ای که حائز اهمیت می‌باشد، جداکردن ریزجانداران به عنوان بیوکاتالیست‌های مورد نیاز، از محیط زیست طبیعی آنها است. روشهای مختلفی برای ارزیابی هیدرولیز میکروبی سلولز طراحی و اجرا گردیده‌اند، اما مشکلی که همه این روش‌ها با آن مواجه بوده‌اند، تنوع سیستم‌های آنزیمی مربوطه در بین ریزجانداران متفاوت، حضور آنزیم‌های مختلف برای هیدرولیز که هرکدام بخش خاصی از فرایند را عهده‌دار هستند و بالاخره مسئله القاء و مهار این آنزیم ها تحت شرایط محیطی مختلف می‌باشد (کلوپ فل، 1988).

ارزیابی مستقیم فعالیت تجزیه کنندگی سلولز گونه های کشت داده شده اغلب شامل اندازه‌گیری تعیین میزان فعالیت تجزیه کنندگی سلولز را می‌توان با اندازه‌گیری قطر هاله‌های ایجاد شده به دست آورد. هنکین و آناگ نوستاکیس(1977) در محیط جامد حاوی سلولز، اطراف کلنی باکتری‌ها هاله‌های شفافی مشاهده کردند. دیگر محققین، در محیط حاوی کربوکسی متیل سلولز به عنوان منبع کربن، برای بهتر رؤیت کردن هاله اطراف کلنی‌ها از محلول کنگو رد (Congo red) استفاده نمودند. اندوگلوکانازها به صورت تصادفی در مکان‌های غیرکریستالی زنجیره پلی ساکاریدی سلولز برش ایجاد می‌کنند و منجربه تولید الیگوساکاریدهایی با طول‌های مختلف و در نتیجه زنجیره‌هایی با پایانه‌های جدید می‌شوند(لیند و همکاران، 2002). همچنین این آنزیم می‌تواند پیوند اندو یک و چهار دی گلیکوزیدی در سلولز، لچینن و بتا-گلوکان را به صورت تصادفی هیدرولیز کند (سادهو و مایتی، 2013). اگزوگلوکونازها با انجام فرآیند تجزیه بر پایانه کاهیده شده یا کاهیده نشده زنجیرهای پلی ساکاریدی سلولز منجربه تولید گلوکز و سلوبیوز می‌شود. بتا- گلوکوزیدازها محلول‌های سلودکسترین و سلوبیوز را به گلوکز هیدرولیز می‌کنند (لیند و همکاران، 2002).

در مقایسه با سلولازهای قارچی، سلولازهای باکتریایی معمولاً ثبات حرارتی بیشتری دارند. همچنین باکتری‌ها سرعت رشد بیشتری داشته، قادربه استفاده از منابع ارزان قیمت کربن و نیتروژن به منظور رشد بوده و با تراکم سلولی بسیار بالا، قادر به ترشح میزان بالایی از آنزیم هستند. علاوه بر این سیستم بیان ژن و دست کاری ژنتیکی باکتری‌ها راحت‌تر بوده و افزایش بیان سلولاز در باکتری‌ها نسبت به سلولازهای قارچی عملی تر و ساده تر است (لی و همکاران، 2008). نکته مشترکی که در تمامی روش‌های جداسازی ریزجانداران تجزیه کننده سلولز به چشم می‌خورد، استفاده از یک محیط معدنی پایه با منبع نیتروژن به همراه سلولز به عنوان منبع عمده یا تنها منبع کربنی می‌باشد. علت این امر آن است که آنزیم‌های میکروبی تجزیه کننده سلولز عمدتاً القاء پذیر بوده و تنها در شرایطی با مقادیر قابل تشخیص تولید می‌شوند که سلولز یا مشتقات آن و یا برخی از مونو یا دی ساکاریدها منبع اصلی کربن محیط باشند که این بر خلاف آنزیم‌های دائمی (مانند آمیلازها) است که همواره توسط ریزجانداران تولید می‌شود (مانتنی کورت و اولیق، 1977) .

هیدرولیز آنزیمی سلولز کریستالی طبیعی یک فرایند کاملاً پیچیده است که برای انجام آن مشارکت چند آنزیم منفرد ضروری است. آنزیم‌های تشکیل دهنده سیستم سلولاز اصولاً بر سه دسته کلی تقسیم می‌شوند. این آنزیم‌ها شامل بتا یک و چهار اندو گلوکاناز[1] بتا یک و چهار اگزو گلوکاناز[2] و بتا یک و چهار گلوکوزیداز[3] می‌باشد. گفته می‌شود که سیستم سلولولیتیک باکتری‌ها ساده تر از قارچ‌هاست زیرا باکتریها تنها آنزیم‌های اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز را تولید می‌کنند ولی علیرغم این واقعیت برخی گونه‌های باکتری‌ها توانایی تجزیه سلولز کریستالی را نیز از خود نشان داده‌اند (تری، 1997). از نقطه نظر فیزیولوژی میکربی باکتری‌های سلولولیتیک گروه‌های مختلفی از جمله باکتری‌های گرم مثبت هوازی مانند انواع *باسیلوس*، *سیتوفاژ* و *کلوستریدیوم* را در بر می‌گیرند. عموماً فقط تعدادکمی در هر گونه به طور فعال سلولولیتیک هستند. توانایی سلولولیتیک در ارتباط با اکسیژن، درجه حرارت و تحمل شوری متفاوت است. باکتری‌های هوازی ابتداسلولز را توسط سیستم‌های سلولازی پیچیده تجزیه می‌کنند. بنابراین گونه‌های مختلف

[1] endo-β-1,4 glucanas
[2] exo-β-1,4 glucanas
[3] β-1,4 glucosidase

www.SID.ir

Archive of SID

هوازی که سلولز مصرف می‌کنند مقادیر قابل اندازه گیری از سلولاز را آزاد نمی‌کنند و در عوض کمپلکس‌های سلولازهای آنها به طور مستقیم بر سطح سلول یا ماتریکس قرار می‌گیرد (شوارز، 2001). توانایی ریزجانداران در تجزیه لیگنوسلولز عامل کلیدی در بازیافت ضایعات به ویژه در فرایند کمپوست سازی است. از طرفی تلقیح با ریزجاندران مفید، تجزیه زیستی مواد آلی را فعال می‌کند و خصوصیات نهایی کمپوست را بهبود می‌بخشد. مایه تلقیح‌های میکربی به منظور تولید کمپوست‌های با ارزش افزوده بالا یا کاهش مدت زمان کمپوست سازی به توده کمپوست افزوده می‌شود (وارگاس –گارسیا و همکاران، 2007؛ گیند و همکاران، 2005). به همین منظور برای تجزیه سریعتر ضایعات آلی و تبدیل سریعتر آنها ضرورت دارد از میکرو ارگانیسم‌هایی با پتانسیل تولید بالای آنزیم‌های مناسب از جمله سلولازها استفاده شود. در این تحقیق نسبت به جداسازی و بررسی فعالیت آنزیم‌های سلولازی باکتری‌ها از جنس و گونه‌های مختلف گرم مثبت و منفی از منابع مختلف اقدام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی فعالیت سلولولیتیک (توان تجزیه سلولز) و بررسی فعالیت آنزیم‌های سه گانه سلولازی باکتری‌ها تحقیقی در آزمایشگاه تحقیقات بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب اجرا شد. به منظور جداسازی و بررسی فعالیت آنزیمی و دسترسی به حداکثر قدرت سلولازی در تجزیه ضایعات لیگنوسلولزی و امکان سازگاری آنها در شرایط تنش محیطی متنوع و از طرفی مقایسه جدایه‌های بومی با نمونه‌های موجود داخلی و خارجی نمونه‌برداری از منابع مختلف انجام شد. پس از نمونه‌برداری از منابع و مناطق مختلف (مطابق جدول دو) و تهیه سری‌های رقت از نمونه‌ها بر روی محیط کشت عمومی نوترینت آگار[1](NA) و اختصاصی[2] (B.H.M) (جدول یک) جدایه‌هایی با صفات میکروسکپی و ماکروسکوپی متفاوت جداسازی و خالص سازی شد. پس از انتقال و کشت خطی روی محیط کشت اختصاصی بوشنل هس((B.H.M) پلیتها به مدت 96 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد به منظور جداسازی باکتری‌های سلولولیتیک در انکوبار قرار داده شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های سلولازی

ارزیابی بر اساس قطر هاله شفاف

غربال گری جدایه‌های سلولولیتیک بر اساس خواص ظاهری کلنی‌ها در کشت خالص و اندازه‌گیری قطر هاله شفاف اطراف کلنی در محیط کشت اختصاصی B.H.M انجام شد (جدول یک). برای مشاهده هاله شفاف ابتدا سطح پلیت‌های حاوی کلنی را با محلول 0/3 درصد کنگورد (congo red) غوطه ور کرده و پس از 20 دقیقه محلول کنگورد باقیمانده در سطح پلیت تخلیه و با محلول یک مولار کلرید سدیم جایگزین شد (تدر و وود، 1982). نسبت قطر هاله به قطر کلنی‌ها (که شاخصی از میزان تولید آنزیم سلولاز است) با خط کش دقیق اندازه‌گیری و یادداشت شد (جدول دو).

سنجش فعالیت آنزیم‌های سلولازی در محیط مایع

به منظور تهیه محیط پیش کشت، ابتدا محیط کشت NB(nutrient broth) در مقادیر لازم تهیه و سپس 20میلی لیتر در ارلن‌های 100 میلی لیتری توزیع و در اتوکلاو با دمای 121° C به مدت 20 دقیقه استریل گردید. سپس در لامینار و کنار شعله از هر جدایه یک لوپ باکتری در داخل ارلن کشت داده شد. ارلن‌ها به منظور هوادهی برای رشد باکتری روی شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه قرار داده شد (اطلس، 2004). پس از 18 ساعت گرما گذاری روی همزن دورانی (shaker)، در شرایط استریل به میزان دو درصد حجمی از مایع پیش کشت که در هر میلی لیترآن جمعیتی معادل $1/5 \times 10^{8}$ cfu.ml^{-1} به محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی آنزیم‌های سلولیتیک تلقیح شد.

[1] Nutrient agar
[2] Bushnell Hass medium

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- محیط کشت B.H.M (بوشنل و هس، 1941)

نام ترکیب	گرم درلیتر
Carboxy methyl cellulose (C.M.C)	10/00
K_2HPO_4	1/00
KH_2PO_4	1/00
$MgSO_4 .7H_2O$	0/20
NH_4NO_3	1/00
$FeCl_3. 6H_2O$	0/05
$CaCl_2$	0/02
Agar	15/00

فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در محلول رویی با روش پیشنهادی میلر (1959) با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) و در حضور ماده زمینه کربوکسی متیل سلولز (C.M.C)، فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بر اساس روش ژانگ و همکاران (2009) با استفاده از فنل و اسید سولفوریک در حضور ماده زمینه آویسل و آنزیم بتاگلوکزیداز بر اساس روش ژانگ و همکاران (2009) با استفاده از کیت تشخیصی گلوکز در حضور ماده زمینه سلوبیوز تعیین گردید. میزان کمی آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز وبتاگلوکزیداز با دستگاه اسپکترفتومتر مدل UV/VIS-CE2040 به ترتیب در طول موج 540nm ، 490nm و 546nm -500 قرائت شد. با تقسیم جذب هر نمونه بر زاویه خطی منحنی استاندارد گلوکز، غلظت کلی قندهای احیا کننده بر حسب واحد آنزیمی به دست آمد. طبق تعریف یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول گلوکز را در شرایط استاندارد نمونه در هر دقیقه آزاد نماید. نتایج بدست آمده اندازه‌گیری آنزیم اندو گلوکاناز روی 28 جدایه منتخب انجام شد (شکل دو). نظر به اینکه در تعدادی از جدایه‌ها میزان فعالیت آنزیمهای سلولازی اگزو گلوکاناز و بتا گلو کزیداز اندازه‌گیری شده در حد ناچیز و نزدیک به صفر بود با در نظر گرفتن تنوع منابع مختلف نمونه‌برداری اندازه‌گیری دو آنزیم اگزو و بتا بر روی 12 جدایه منتخب از 28 جدایه در چهار تکرارانجام شد (شکل سه و چهار).

نتایج و بحث

در مجموع تعداد 28 جدایه با توان سلولازی و هاله متوسط تا بزرگ در اطراف کلنی از بین 66 جدایه موجود در آرشیو میکربی آزمایشگاه بخش تحقیقات بیولوژی خاک جهت آزمایشهای تکمیلی انتخاب شد. نتایج بررسی قطر هاله و کلنی و نسبت قطر هاله به کلنی که به عنوان شاخصی در ارزیابی میزان فعالیت سلولازی هر جدایه می‌باشد (جدول دو) نشان داد بیشترین قطر کلنی مربوط به تعدادی از جدایه‌ها از جمله HSD ، MAL ، BSA، ASH و TSM بود که نتایج واکنش گرم نشان داد که همه این باکتری‌ها گرم مثبت هستند و در حقیقت هر چقدر قطر کلنی بزرگتر باشد بیانگر رشد و تکثیر بیشتر باکتری می‌باشد، از طرفی کمترین قطر کلنی عمدتاً مربوط به جدایه‌های HSE، CMB، CPG،TERو NTL بود که همگی گرم منفی بودند. اما بیشترین نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه گرم منفی TER با کمترین قطر و کمترین نسبت مربوط به جدایه گرم مثبت CPL مشاهده شد.

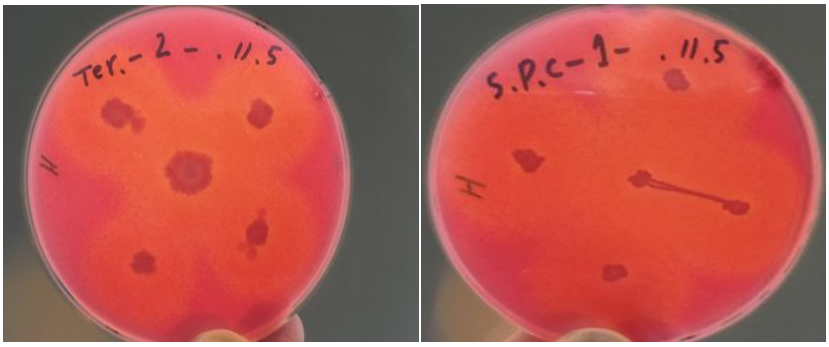
پس از بررسی جدایه‌های قوی از نظر تشکیل هاله و مقایسه نسبت قطر هاله به کلنی از بین 66 جدایه مطالعه شده در نهایت 12جدایه شامل: BSB، MAL، ALK، CPG ، HSE ، NTL، NTK، NTT، DEB، HWN، ATD،FRB مجدداً برای بررسی و اندازه‌گیری میزان تولید آنزیم‌های سه گانه سلولازی اندو گلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا گلوکزیداز تفکیک شد و پس از خالص سازی جدایه‌های باکتری سلولولیتیک و کشت تازه براساس دستورالعمل ارائه شده اقدام شد. اندازه‌گیری آنزیم اندو گلوکاناز بر اساس روش DNS روی 28 جدایه منتخب انجام شد. لازم به ذکر است که هر واحد آنزیمی طبق تعریف مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزاد سازی یک میکرومول قند احیایی گلوکز در شرایط استاندارد می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

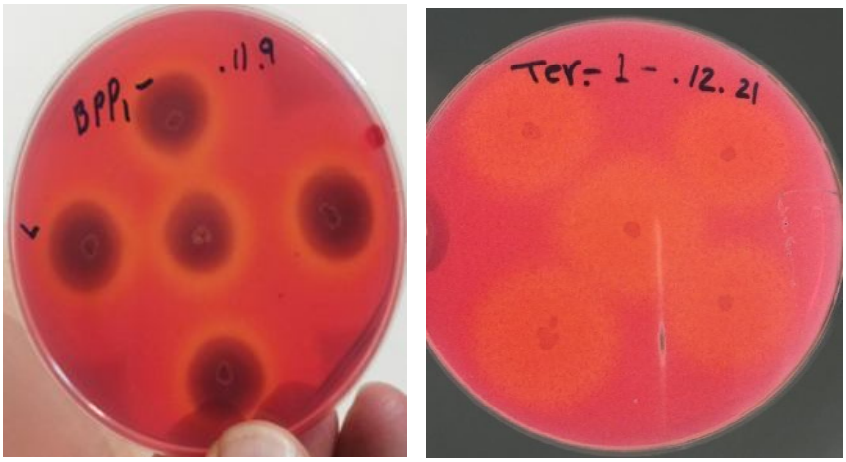
جدول 2- سنجش میزان قدرت سلولولیتیکی جدایه ها در محیط کشت B.H.M

ردیف	کد جدایه	محل جداسازی	قطر کلنی (میلی متر)	قطر هاله (میلی متر)	نسبت قطرهاله به کلنی
1	HSD	خاک نخلستان بندرعباس	5	21	4/2
2	CMB	کود گاوی تازه	2	10	5
3	HSE	خاک نخلستان بندرعباس	2	8	4
4	CPG	کوکوپیت	2	14	7
5	CPL	کوکوپیت	4	10	2/5
6	BPP	ضایعات نخل بهبهان	4	28	7
7	TER	موریانه کرج	2	18	9
8	ALK	کود مرغی فرآوری شده	4	27	8
9	MAL	ملاس نیشکر	5	31	6/2
10	BSA	خاک نخلستان بهبهان	5	18	3/6
11	BSB	خاک نخلستان بهبهان	4	18	4/5
12	USB	کود زیستی خارجی	3	16	5/3
13	FRB	کود زیستی خارجی	4	22	5/5
14	ASH	خاک	5	25	5
15	TSM	کود زیستی خارجی	5	22	4/4
16	ATA	موریانه فارس	4	20	5
17	ATD	موریانه فارس	3	26	8/7
18	DEA	فعال کننده زیستی داخلی	4	16	4
19	HPM	ضایعات نخل بندر عباس	3	25	8/3
20	HPN	ضایعات نخل بندر عباس	4	11	2/8
21	HPW	ضایعات نخل بندر عباس	3	18	6
22	DEB	فعال کننده زیستی داخلی	3	17	5/7
23	NTT	موریانه تهران	3	16	5/3
24	NTK	موریانه خوزستان	3	12	4
25	NTL	موریانه خوزستان	2	14	7
26	SAD	خاک نخلستان خوزستان	4	18	4/5
27	NTM	موریانه خوزستان	3	14	4/7
28	BAC	ورمی کمپوست	3	15	5

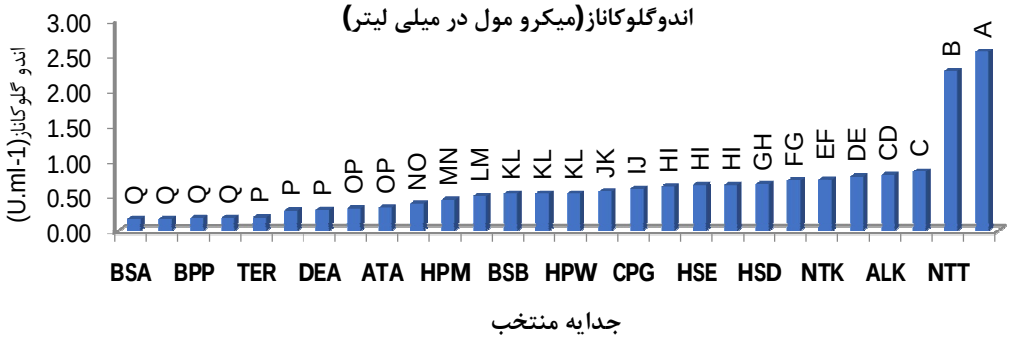


www.SID.ir

Archive of SID



شکل 1– هاله شفاف تشکیل شده اطراف کلنی جدایه ها درمحیط کشت B.H.M بعد از 72 ساعت گرماگذاری



شکل 2- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در 28 جدایه پس از 72 ساعت گرماگذاری

تعداد واحد آنزیم اندو گلوکاناز تولید شده بر حسب مقدار گلوکز احیاء شده بیان می‌شود که نحوه محاسبه میزان قندآزاد شده بر اساس منحنی استاندارد و رابطه بین قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر و غلظت‌های استاندارد گلوکز محاسبه شد. همان طور که از شکل دو مشاهده می‌شود مقدار آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه‌ها مقادیر متفاوتی است حداقل مقدار در جدایه BSA متعلق به خاک نخلستان شادگان خوزستان به میزان 0/17 و حداکثر مقدار مربوط به جدایه NTL متعلق به موریانه خوزستان به میزان 2/55 واحد آنزیمی بود.

با توجه به شکل دو، بیشترین میزان آنزیم اندو گلوکاناز متعلق به جدایه NTL می‌باشد که از موریانه خوزستان جداسازی شد. کمترین میزان آنزیم مربوط به جدایه BSA که از خاک نخلستان بهبهان جدا شد. همانطور که از شکل دو پیداست همه جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم اندو گلوکاناز می‌باشند و این توانایی در تحقیقات تری (1977) نیز بر روی باکتری‌های سلولولیتیک مشاهده شد. از طرفی رجب خانی و همکاران (1387) با بهینه سازی شرایط محیطی تولید آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه‌های باکتری و قارچ *آسپرژیلوس نیجر* سلولولیتیک توان تولید آنزیم را بررسی و به نتایج مشابه دست یافتند. کازانا و همکاران (2008) نیز با استفاده از روش سریع و ساده بر روی محیط کشت جامد با استفاده از معرف مناسب وجود آنزیم سلولاز میکربی اندوگلوکاناز را در جدایه های باکتری مشاهده کردند. تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS نسخه 9/2 انجام و تفاوت آماری بین جدایه‌ها از نظر تولید آنزیم اندوگلوکاناز در سطح یک درصد معنی‌دار شد که نتایج تجزیه واریانس در جدول سه مشاهده می‌شود. بیشترین تفاوت بین دو جدایه گرم مثبت NTL و NTT با بقیه مشاهده شد.

www.SID.ir

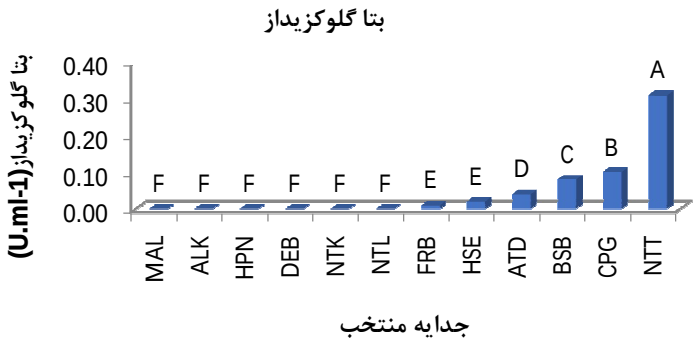
Archive of SID

جدول 3- تجزیه واریانس تغییرات آنزیم اندوگلوکاناز به روش آزمون دانکن

منبع تغییرات	مجموع مربعات خطا	درجه آزادی	میانگین مربعات خطا	نسبت F	معنی دار بودن
بین تکرارها	16/11	27	0/596	662/22	**<0/0001
داخل تکرارها	0/026	66	0/0009		
کل	16/13	93			
میانگین فعالیت آنزیم	ضریب تغییرات (cv)	مربع ضریب همبستگی (R-Square)			
0/625	4/92	0/998			

آنزیم اندوگلوکاناز موجب قطعه قطعه شدن زنجیر سلولزی به صورت تصادفی از محل اتصالات گلیکوزیدی "بتا 1و 4"می‌شود که نتیجه آن با کاهش سریع در طول پلیمر و افزایش تدریجی غلظت قند احیا کننده همراه است. هر چه قدر میزان قند احیایی که معادل واحد آنزیم تولید شده توسط ریز جاندار می‌باشد، بیشتر باشد فعالیت تجزیه سلولز سریعتر بوده و تشدید می‌شود. به نظر می‌رسد جدایه هایی که میزان تولید آنزیم در آنها بالاتر از 0/5 واحد است از پتانسیل خوبی برای تسریع فعالیت تجزیه سلولز دارند نتایج و مشاهدات این تحقیق با تحقیق بهت و همکاران (1997) ، کازانا و همکاران (2008) و وان دیک و پلشکه (2012) مشابهت داشته و تأیید می شود .

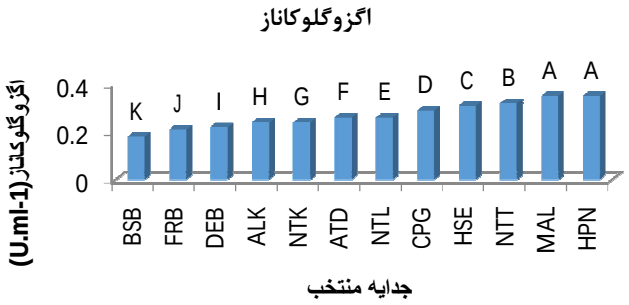
نظر به اینکه در تعدادی از جدایه‌ها میزان فعالیت آنزیم بسیار کم و فعالیت دو آنزیم اگزو گلوکاناز و بتاگلو کزیداز در حد ناچیز و قابل صرف نظر کردن بود با در نظر گرفتن تنوع منابع مختلف نمونه‌برداری اندازه‌گیری دو آنزیم اگزو و بتا بر روی 12 جدایه منتخب از 28 جدایه انجام شد. مطابق شکل سه، بیشترین فعالیت آنزیم بتا گلوکزیداز متعلق به جدایه NTT جدا شده از موریانه و بعد از آن جدایه های CPG، BSB، ATD می باشد. این آنزیم قادر است سلوبیوز و زنجیره های کوتاه الیگوساکارید را به گلوکز تبدیل کند. در حقیقت دیمرهای گلوکز را به گلوکز هیدرولیز می کند (دئوبالد،1997).



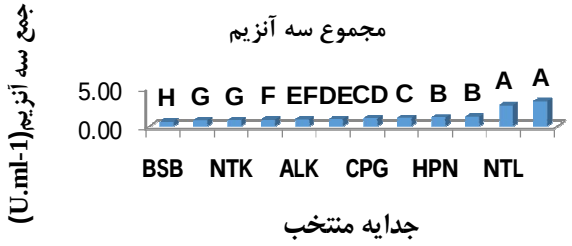
شکل 3- مقدار فعالیت آنزیم بتاگلوکزیداز در جدایه‌های منتخب

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 4- مقدار فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه های منتخب



شکل 5- مجموع فعالیت سه آنزیم در جدایه های منتخب

با توجه به شکل چهار، بیشترین مقدار فعالیت آنزیم اگزو گلوکاناز متعلق به جدایه HPN به میزان 0/35 واحد آنزیمی بود که از ضایعات نخل بندرعباس جداسازی شد و کمترین میزان آنزیم مربوط به جدایه BSB به میزان 0/18 واحد آنزیمی که از خاک نخلستان بهبهان جداسازی شد. با توجه به شکل پنج، مشاهده می‌شود که بیشترین مجموع سه آنزیم مربوط به جدایه NTT بود که از موریانه تهران جداسازی شد این جدایه با دارا بودن هر سه آنزیم توان بالایی در تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی دارد. عصاره و همکاران (1393) با تحقیق بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده سلولز از خاک با روش‌های مشابه تحقیق حاضر موفق به جداسازی و شناسایی باکتری‌های سلولولیتیک مزوفیل و ترموفیل در شرایط بهینه شدند و بر ضرورت شناسایی و ارزیابی توان تولید آنزیم های سلولازی برای تبدیل ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی و شهری تأکید کردند. همتی و همکاران (2018) برای دستیابی به باکتری‌های لیگنوسلولوتیک تعداد زیادی جدایه باکتری بومی از خاک‌های مختلف و کمپوست استفاده و دریافتند که باکتری‌های ترموفیل توانایی بیشتری در تجزیه بقایای آلی دارند که مؤید نتایج مشابه در این تحقیق می‌باشد. در تحقیقات بر روی جدایه‌های سلولولیتیک به ندرت جدایه‌ای با توان تولید هر سه آنزیم سلولازی گزارش شده است و در تحقیقات دیگر محققان اغلب یک یا دو آنزیم از سه آنزیم مذکور در یک باکتری را گزارش داده‌اند (تری، 1997). اما آزمایش سنجش آنزیمی حاضر نشان داد که شش جدایه NTT، ATD ، FRB،BSB، CPG و HSE به ترتیب دارای فعالیت آنزیمی 3/21 ، 0/91 ، 0/74، 0/56، 1/00 و 1/08 واحد آنزیمی می‌باشند. دارا بودن هر سه آنزیم سلولازی به عنوان یک مزیت برای تبدیل ضایعات لیگنو سلولزی به کمپوست در زمان کمتر مطرح می‌باشد. بررسی آنزیم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

ترشح شده توسط گونه‌های باسیلوس مانند (سلولاز، پروتئاز و آمیلاز) نشان داده که گونه‌های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس لیچنیفورمیس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس پولی میکسا* توانایی تولید سلولاز را دارند. از آنجا که این سویه‌ها هر سه نوع سلولاز را تولید نمی‌کنند، بنابراین قادر به هیدرولیز کامل سلولز کریستالی نیستند. بررسی سویه‌های دیگر این گونه‌ها مشخص کرد که سویه*Bacillus subtilis D40* توانایی تولید آنزیمی با ویژگی‌های هر سه نوع آنزیم سلولاز را دارا بوده و قادر به تجزیه کامل سلولز کریستالی می‌باشد (هن و همکاران، 1995). نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه توسط وان دیک و پلشکه (2012)، وارگاس و گارسیا (2010) و بهت و همکاران (1997) در خصوص جدایه‌های دارای هر سه آنزیم با نتایج این تحقیق مطابقت داشته و تأیید می‌شود. پیشتر جدایه برترNTT حاوی هر سه آنزیم سلولازی با نام*Bacillus methyltrophicus* شناسایی و ثبت شده است (صفاری و همکاران، 2016).

نتیجه‌گیری

از بررسی 12جدایه با توان سلولازی بالا و مقایسه نسبت قطر هاله به کلنی از بین 28 جدایه با توان سلولازی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سه گانه اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکزیداز مشاهده شد که همه جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیم سلولازی و گرم مثبت اسپوردار و یا گرم منفی و ازطرفی قطر هاله اطراف کلنی ارتباط مستقیم با میزان فعالیت آنزیمی و سلولازی و تنوع آنزیمی داشت. در بعضی از جدایه‌ها قابلیت تولید یک آنزیم بعضی دو و در بعضی فعالیت هر سه آنزیم وجود دارد. فعالیت آنزیمی جدایه‌های مختلف کاملاً متفاوت و از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. بیشترین مجموع فعالیت سه آنزیم مربوط به جدایه NTT به میزان 3/21 واحد آنزیمی بود که از موریانه تهران جداسازی و با نام *Bacillus methyltrophicus* شناسایی و ثبت شده است. این جدایه با دارا بودن هر سه آنزیم توان بالایی برای تجاری سازی و تولید آنزیم‌های سلولازی و استفاده از آن در تجزیه بقایای لیگنوسلولزی را دارد. اگرچه بعضی از جدایه‌ها فعالیت آنزیمی قابل قبولی داشتند اما به دلیل گرم منفی بودن و نداشتن ماندگاری در شرایط تنش قابل توصیه برای کاربرد عملی تجزیه بقایای لیگنوسلولزی نیست و جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها می تواند برای تکمیل کلکسیون و بررسی دیگر قابلیت‌های بیوشیمیایی چند منظوره آنها راهگشا باشد. اما در مقابل باکتری‌های سلولولیتیک گرم مثبت با داشتن اسپور در شرایط نامناسب محیط پایدار می‌باشند. لازم به ذکر است در تحقیقات بر روی جدایه‌های سلولولیتیک به ندرت جدایه‌ای با توان تولید هر سه آنزیم سلولازی گزارش شده است.

فهرست منابع:

1. رجب خانی،ز. زمانی، م. مطلبی، م. عنصری دیزج یکان، ح. 1387. بهینه سازی تولید آنزیم بتا یک و چهار اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ (R4)*Aspergillus niger* و همسانه سازی ژن eglB. مجله زیست شناسی ایران، جلد 22 ، شماره 4.
2. عصاره، ر.ح. شهبانی ظهیری و س.عشقی، 1393، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده سلولز از خاک، مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد 27، شماره 1.
3. Atlas, R.M. 2004. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
4. Bhat, M.K.and Bhat, S. 2000. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Adventure. 15: 583-620.
5. Bushnell, D.L. and Haas, H.F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms, Kansas Agricultural Experiment Station. 199: 653–673.
6. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. 1955. In: Methods in Enzymology. Academic Press INK London. pp: 149-158.
7. Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. In: Microbial Enzymes & Biotechnology. Applied science publications, London. pp: 183-223
8. Gained, S. et al. 2005. Biodegradation study of crop residues as affected by exogenous inorganic nitrogen fungal inoculants. Journal of Basic Microbiology. 4: 301-310.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Hankin, L. Anagnostakis, S.L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. Journal of Genetic Microbiology. 98: 109-115.
10. Han, S.J., Yoo, Y.J., Kangs, H.S. 1995 Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cel gene of *Bacillus SP*. D04 has exo and endoglucanase activity. Journal of Biological Chemistry. 43: 260-270.
11. Hemati A. Aliasgharzad, N. Khakvar, R. 2018 *In vitro* evaluation of lignocellulolytic activity of thermophilic bacteria isolated from different composts and soils of Iran, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.04.010
12. Kasana, R., Salvan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A., 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on agar Plates Using gram's iodine. Current, Microbiology. 57:503- 507.
13. Li W, Zhang WW, Yang MM, Chen YL (2008) Cloning of the Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. Molecular. Biotechnology. 40:195–201.
14. Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van, Z.Y., W.H., Pretorius, I.S. 2002 Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66: 506–577.
15. Miller, G. L. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31: 426-428.
16. Sadhu, S., Maiti, T.K. 2013 Cellulase production by bacteria: A Review. British microbiology research journal. 3:235-258.
17. Saffari,H., Pourbabaee,A. A., Asgharzadeh, A., Besharati, H. 2016. Isolation and identification of effective cellulolytic bacteria in composting process from different sources Archive of . Agronomy.and Soil Science. DOI:10.1080/03650340.2016.1198006
18. Schwarz, W.H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 634-649.
19. Stewart, B. J., Leatherwood, J.M. 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. Journal of Bacteriology. 128: 609-615.
20. Teather, R. M. and Wood, P. J. 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. Applied Environmental Microbiology. 12: 777-780.
21. Teeri, T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends in Biotechnology. 15: 160-167.
22. Van, Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnology advances. 30: 1458–1480.
23. 23-Vargas-Garcia, M.C., et al. 2007. Waste management. 27: 1099-1107.
24. Vargas-Gracia, M.C., Surez-Estrella, F.F., Lopez, M.J., Moreno, J., 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Management. 30: 771–778.
25. Zhang, Y-HP , Hong, J. , Ye, X. 2009. Cellulase assays. Methods of Mollecular Biology. 581: 213-231.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of the cellulase enzyme system of some native cellulolytic bacteria for degradation of lignocellulosic wastes

H. Saffari[1], A. A.Pourbabaee, A. Asgharzadeh and H. Besharati

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: hosaffary@yahoo.com

Department of Soil Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran; E-mail: pourbabaei@ut.ac.ir

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: besharati1350@yahoo.com

Received: October, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

Cellulolytic bacteria with cellulase enzyme system play an important role in decomposing lignocellulose wastes and accelerating the composting process. For this purpose, a study was carried out on some native cellulolytic bacteria isolated from different sources in Soil and Water Research Institute. Twenty eight isolates were selected based on morphological characteristics and cellololytic test, in specific medium (B.H.M). Spot cultivation on B.H.M medium and observation of halo diameter as the cellulolytic characteristics of the isolates led to the separation of 12 isolates. The maximum and minimum diameter of a clear zone around the colony of MAL and HSE isolates were 31 and 8 millimeters respectively. Also the maximum and minimum proportion of clear zone diameter to colony were observed in TER and CPL isolates. The activity of endoglucanase, exoglucanase and betaglucosaidase among 12 isolates showed that the least amount of endoglucanase was belong to SAD (0.17 $U.ml^{-1}$) and the most one was NTL (2.55 $U.ml^{-1}$) isolates. The maximum activity of betaglucosidase in NTT isolate was 0.31 $U.ml^{-1}$ and the maximum exoglucanase enzyme activity was belong to HPN isolate (0.35 $U.ml^{-1}$) and minimum was belong to BSB isolate (0.18 $U.ml^{-1}$). Analysis of variance showed that the differences between the isolates with the highest and lowest triple cellulase activity was significant (especially endoglucanase) at one percent statistic level but was not significant between some isolates. There was a direct relation between cellulase activity and the enzyme compound. NTT isolate showed the highest activity of beta-glucosidase enzymes and it was the second and the third in terms of endoglucanase and exoglucanase production, respectively. It had the highest activity of three enzymes (3.21 unit) and identified and registered as *Bacillus methyltrophicus.*

Keywords: Bacteria, Cellulase enzyme, Enzymetic hydrolysis, Lingocellulosic wastes

[1] Corresponding author: Soil Fertility and Plant Nutrition Department, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

www.SID.ir