جداسازی باکتریهای سلولولیتیک از موریانه‌ها و تعیین فعالیت آنزیم سلولازی به منظور افزایش سرعت تجزیه بقایای لیگنوسلولزی

حسین صفاری[۱]، حسین بشارتی[۱]،احمد اصغرزاده[۱] و احمدعلی پوربابایی[۲]
مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران[۱]، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ،کرج،ایران[۲]

چکیده:
با توجه به اهمیت باکتریهای تجزیه کننده سلولز در فرایند تجزیه میکربی وهیدرولیز آنزیمی ضایعات آلی مقاوم به تجزیه تحقیقی به منظور جداسازی و خالص سازی باکتریهای سلولولیتیک از موریانه در موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شد. رقتهای مختلف روی محیط باسیلوس آگار برده شد و بر اساس مرفولوژی و ظاهرکلونیهای باکتری تعداد ۱۲ جدایه باکتری جداسازی و برای بررسی سلولولیتیک بودن روی محیط کشت حاوی کربوکسی متیل سلولز (BHM) ابتدا کشت خطی و سپس نقطه‌ای انجام شد. بر اساس میزان فعالیت آنزیم سلولازی و قطر هاله و کلنی ابتدا هفت جدایه و پس از اندازه گیری آنزیمهای سه گانه سلولازی و بر اساس حداکثر فعالیت آنزیمی تعداد چهار جدایه برتر تفکیک شد در نهایت برترین سویه باکتری از نظر تولید هر سه آنزیم سلولازی با نام اختصاری NTT که حاوی ۱۰۳۸/۶میکروگرم گلوکز در میلی لیترعصاره آنزیمی بود با نام *Bacillus methyltrophicus* شناسایی شد.

کلمات کلیدی: ضایعات لیگنوسلولزی خرما،سلولولیتیک،باکتری

مقدمه:
تولید ضایعات آلی در طبیعت روز به روز در حال افزایش است حال آنکه خاکها به دلیل کشتهای ی متراکم و شرایط آب و هوایی ماده آلی خود را از دست می دهند.این موضوع منجر شده که بحث تبدیل ضایعات آلی به مواد اصلاح کننده خاک و کمپوستها تحت تاثیر فعالیت گروهی از میکروبها مطرح باشد.(Massiani & Domeizel,1996)) بر اساس گزارش گروه اقتصاد و آمار وزارت جهاد کشاورزی سالانه مجموع بقایا و ضایعات کشاورزی بالغ بر ۳۰ میلیون تن است یکی از معضلات ضایعات خشبی ،الیاف خرما و باگاس نیشکراین است که در مدت زمان طولانی تجزیه و پوسیده شده و به کمپوست تبدیل می شود.با در اختیار داشتن اطلاعات لازم در مورد باکتریهای تجزیه کننده(سلولولیتیک) ضایعات غنی از لیگنین ،لیگنو سلولز و سلولز می توان از عملکرد این با کتریها کمک گرفت و ضایعاتی که در عرصه تولید به عنوان یک معضل مطرح است را با حداقل هزینه به کود آلی به عنوان جایگزین مناسب کود شیمیایی وارداتی و با کمترین آلودگی زیست محیطی تبدیل و از خروج ارز نیز از کشور جلوگیری کرد.
تجزیه سلولز و استفاده از آن در چرخه منابع کربن دار اهمیت دارد. سیستم گوارش موریانه ها حاوی میکربهای همزیست زیادی از جمله انواع باکتریهای هوازی و بی هوازی است که قادر به ترشح آنزیم سلولاز و تجزیه ترکیبات لیگنوسلولز می باشد به واسطه وجود این میکربها در بدن موریانه تبدیل ضایعات و معدنی کردن ترکیبات بیوپلیمری از جمله چوب اتفاق می افتد.(Wenzel et al., 2002) طیف وسیعی از میکربهای جدید سلولولیتیک با کاربرد صنعتی در بدن موریانه موجود است. (Tokuda et al., 2004) هیدرولیز سلولز به عنوان منبع انرژی تجدید پذیر از نظر تحقیقاتی و صنعتی مورد توجه می باشد. تحت تاثیر فعالیت آنزیمی سلولز گلوکز تولید می شود که برای تولید اتانول ،اسیدهای آلی و دیگر ترکیبات شیمیایی استفاده می شود.(Khan etal.,2002)آنزیمهای سلولازی عمدتا به وسیله منابع میکربی از قبیل باکتریها و یوکاریوتها تولید می شود که نقش کاتالیزوری سلولز را داشته عمدتا در اثر فعالیت ورشد میکروارگانیسمها روی مواد سلولزی تولید می شود(Lee & Koo, 2001)

هیدرولیز آنزیمی کامل سلولز نیازمند انواع آنزیمهای سلولازی ازقبیل اندو گلوکاناز، اگزوگلوکاناز(اگزوسلوبیوهیدرولاز) و بتا گلوکزیداز می باشد.(Yi JC et al.,1999) اندوگلوکاناز به طور تصادفی پیوندهای بتا یک و چهار ملکول سلولز را هیدرولیز می کند. اگزوگلوکانازها در اغلب موارد واحد سلوبیوز را از انتهای زنجیره آزاد می کند و در نهایت واحد سلوبیوز به وسیله بتا گلوکزیداز به گلوکز تبدیل می شود.(Bhat MK, Bhat S.,1997) باسیلوس ها باکتری های هوازی و بی هوازی های اختیاری هستند که قادرند آنزیمهایشان را به محیط ترشح کنند. آنها آنزیم های هیدرولیتیک خارج سلولی را تولید می نمایند که دراکثر فرایند های صنعتی بکار گرفته می شود. سلولز پلیمری است خطی از واحد های گلوکز که با پیوند های گلیکوزیدی بتا یک و چهار به هم متصل شده اند ویکی از فراوان ترین کربوهیدرات های موجود در طبیعت می باشد به طور کلی هدف اصلی در این تحقیق دستیابی به میکروبهایی با توان بالای تجزیه مواد آلی لیگنو سلولز از قبیل ضایعات در خت خرما است که بتواند ضمن ترشح آنزیمهای سلولو لیتیک مناسب و به حد کافی سرعت تجزیه ضایعات خشبی را افزایش داده و منجر به تولید حداکثر کمپوست در حداقل زمان گردد.

مواد و روش‌ها :

۱-نمونه برداری:

برای اجرای این تحقیق در ابتدا اقدام به جمع آوری تعدادی موریانه از گونه های مختلف در استانهای فارس ، خوزستان و تهران گردید و در شرایط مناسب نمونه ها برای مراحل بعد به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-غربالگری (screening) باکتریهای سلولولیتیک :

جهت غربالگری باکتری های توانمند ابتدا نمونه های موریانه تازه و زنده که در شرایط مناسب نگهداری شده بود را برداشته و پس از ضدعفونی کردن سطح بدن آنها با الکل ۹۷۰ درصد محتویات شکمی آنها جداشده و پس از له کردن محتویات اقدام به تهیه عصاره با نسبت یک به ۱۰ با سرم فیزیولوژیک (کلرور سدیم ۰/۸۵درصد)در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر گردید و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دور ۱۳۰ قرار داده شد. سپس ازنمونه های سری رقت از سوسپانسیون آماده شده تهیه شد و هریک از رقتها بر روی محیط کشت اختصاصی های مدیا باسیلوس آگار استریل برای تفکیک جدایه های باکتری به ویژه باسیلوس برده شد.

محیط کشت باسیلوس آگار شامل ۱۳ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سپس اتوکلاو در دمای ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه و در نهایت افزودن ۴۹/۲ گرم محیط کشت آماده استریل در زیر لامینار می باشد که پس از حرارت و حل شدن پلیت می کنیم.

۳-اندازه گیری قدرت سلولازی در پلیت:

در این مرحله برای بررسی توان سلولازی جدایه ها در حضور کربوکسی متیل سلولز (C.M.C)به عنوان معیار ومبنای اولیه و استاندارد حاوی سلولز بررسی شد. جدایه های منتخب در رقتها به تفکیک روی محیط کشت معدنی موسوم به (Bushnell Haas Medium)BHM حاوی کربوکسی متیل سلولز(۱۰گرم در لیتر)کشت خطی شد و در دمای ۳۷ در جه سانتیگراد به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شد برای مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی که بیانگر تولید سلولاز و تجزیه CMC است ابتدا با محلول کنگو رد سه دهم درصد سطح پلیت به مدت ۲۰ دقیقه غرقاب سپس سطح پلیت با محلول یک مولار کلرور سدیم غرقاب شد جدایه های که سلولولیتیک باشند هاله شفاف تولید خواهند کرد که اندازه قطر هاله و کلنی با خط کش اندازه گیری وبرترین جدایه ها برای انجام آزمایشهای بعدی انتخاب (Teather et al.,1982).

۴-تعیین فعالیت آنزیمی جدایه ها:

برای ارزیابی فعالیت آنزیمهای سه گانه سلولازی در تعداد ۱۲ جدایه برتر سلولولیتیک اقدام شد. برای اندازه گیری آنزیم اندو گلوکاناز با سوبسترای CMC و روش DNS(دی نیترو سالیسیلیک اسید)،آنزیم اگزوگلوکاناز با سوبسترای آویسل و روش فنل و اسید سولفوریک، آنزیم بتا گلوکزیداز با سوبسترای سلوبیوز و استفاده از کیت گلوکز اقدام شد(Zhang et al.,2009)

نتایج و بحث :

جداسازی باکتریهای برتر تجزیه کننده سلولز:

از بررسی اولیه کلنیهای جداسازی شده از نمونه های مختلف تعداد ۱۲ جدایه باکتریهای میله ای گرم مثبت منفی و مثبت مشاهده و کد گذاری شد. در مرحله بعد از این تعداد جدایه براساس میزان تولید آنزیم سلولاز و ایجاد هاله در محیط حاوی C.M.C تعداد هفت جدایه که قادر به تولید آنزیم سلولاز بودند تفکیک شد در مرحله بعد میزان هر یک از آنزیمهای گروه سلولازی ذکر شده در جدایه ها سنجش شد از بین این ۱۲ جدایه سلولولیتیک براساس حداکثر قدرت آنزیمی چهار جدایه برتر تفکیک و در نهایت جدایه شماره ۶۳ با نام اختصاری NTTبه روش16SrRNA شناسایی و با نام *Bacillus methyltrophicus*معرفی شد این باکتری باسیلوس گرم مثبت و اسپوردار می باشد و حاوی هر سه آنزیم مهم سلولازی می باشد که نتایج آن در جدول یک آمده است.

جدول ۱-خصوصیات جدایه های برتر از نظر آنزیم سلولازی و هاله شفاف در پلیت

ردیف	شماره جدایه	کد جدایه	محل جداسازی و نام موریانه	قطرکلنی (میلی متر)	قطرهاله (میلی متر)	نسبت قطر هاله به کلنی	اگزوگلوکاناز (µg/ml)گلوکز	اندوگلوکاناز (µg/ml)گلوکز	بتا گلوکاناز (µg/ml)گلوکز	مجموع سه آنزیم (µg/ml)گلوکز
۱	۵۶	ATD	فارس *Microcerotermes diversus*	۳	۲۶	۸/۷	۲۸۲/۶	۱۵۱/۲	۷/۲	۴۴۱
۲	۶۳	NTT	تهران *Amitermes vilis*	۲	۱۴	۷	۵۷۴/۲	۴۰۸/۶	۵۵/۸	۱۰۳۸/۶
۳	۶۴	NTK	خوزستان *Microcerotermes gabrielis*	۳	۱۲	۴	۴۴۱	۱۳۱/۴	۰/۰	۵۷۲/۴
۴	۶۵	NTK	خوزستان *Microcerotermes gabrielis*	۳	۱۶	۵/۳	۴۷۵/۲	۴۵۷	۰/۰	۹۳۲/۲

بر اساس نتایج جدول یک مشاهده می شود جدایه شماره ۵۶ با نام اختصاری ATD با سه و ۲۶ میلیمتر به ترتیب دارای بیشترین قطر کلنی و هاله بود. کوچکترین قطرکلنی جدایه شماره ۶۳ و کمترین قطر هاله مربوط به جدایه شماره۶۴ بود. هر چه قدر قطر هاله بزرگتر باشد بیانگر توان تولید سلولاز بیشتر می باشد. اما مجموع تولید آنزیمهای سه گانه همیشه با قطر هاله همبستگی یکسان و مثبت ندارد به نحوی که از نظر نسبت قطر هاله به کلنی جدایه شماره ۵۶ بیشترین نسبت و جدایه شماره ۶۴ کمترین نسبت را داشت. بیشترین میزان آنزیم اگزوگلوکاناز مربوط به جدایه ۶۳ بود. بیشترین مقدار آنزیم اندو گلوکاناز مربوط به جدایه ۶۵ و بیشترین مقدار آنزیم بتا گلوکزیداز جدایه ۶۳ بود. در مجموع بیشترین میزان هر سه آنزیم متعلق به جدایه ۶۳ به میزان ۱۰۳۸/۶واحد آنزیمی بود. 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. در تحقیقات بر روی جدایه های 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 داده اند (Bhat ,2000 ; Teeri , 1997)

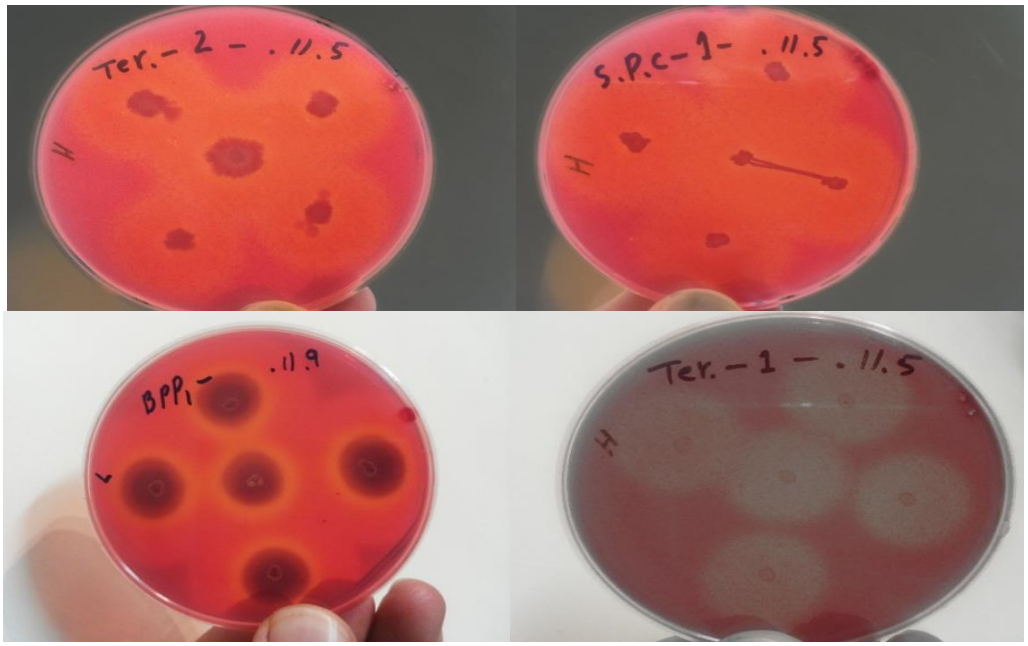

Figure ۱

شکل ۱- نمونه هایی از هاله ایجاد شده در اثر تولید آنزیم سلولازی رنگ روشن اطراف کلنی بیانگر تجزیه CMC به وسیله آنزیم سلولاز می باشد

منابع :

Bhat MK, Bhat S. 2000. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol Adv. 15: 583-620.

Khan CG, Arikan B, Naldi MN, et al. 2002. Turkey Journal of Biology, 26:209-213.

Massiani C. and Domeizel M.1996.Quality of compost organic matter stabilization and trace metal contamination .In The sciences of composting ,Eds,De

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. App.environ.microbiol. 12: 777-780.

Teeri T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Tibtec. 15: 160-167.

Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H. et al. 2004. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. *Molecular Ecology*, **13**, 3219–3228.

Wenzel M, Schonig I, Berchtold M, Kampfer P, Konig H .2002.Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J Appl Microbiol* **92**:32–40

Wood TM. McCrae SI. 1982. In "Enzymatic hydrolysis of cellulose" Carbohydr. Res 110: 291 – 303.

Yi Jin Cai,† Sandra J. Chapman,‡ John A. Buswell,* and Shu-ting Chang 1999. Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β-Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvacea*, the Edible Straw Mushroom Appl Environ Microbiol. 65: 553–559.

Zhang Y-HP , Hong J , Ye X. 2009. Cellulase assays. Methods.Mol. Biol. 581: 213-231.

Isolation of cellulolytic bacteria from gut of termite and assay cellulase enzyme activity to enhance the decomposition rate of lignocellulosic wastes

H. Saffari[1] , H Besharati [1],A. Asgharzadeh[1] and A. A. Pourbabaee[2]

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran[1] .

Department of Soil Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran[2]

Abstract:
Cellulolytic bacteria have important in biodegradation and enzymatic hydrolysis. So this study was carried out for isolation and purification some cellulolytic bacteria for accelerating on lingo cellulosic palm waste in 2014 year in soil biology division research of SWRI. Sampling was prepared from different genius of .Ddilution series was prepared from extractant any sample then transfer to bacillus agar medium and separated 12 different isolate .After purification isolates transferred to medium contain carboxy methyl cellulose (CMC) that named BHM(Bushnell Hans Medium).Isolates that were growth on BHM and spot culture after 96 hours on the basis of cellulase activity and clear zone diameter around colony 7 isolate were separated .Based on three type cellulase enzyme activity 3 active isolate were separated. In point of view maximum cellulase activity was belonged to isolate no.63 (NTT) with producing 1038.6 microgram glucose per ml suspension showed prominent cellulolytic activity that belong to bacillus genus and be identified as *Bacillus methyltrophicus*.

Key words: Termite , palm lignocellulosic wastes, cellulolytic, bacteria