جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی تجزیه‌کننده سلولز از خاک

رضا عصاره [۱*]، حسین شهبانی ظهیری[۲] و سیما عشقی[۱]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳

چکیده

مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتریهای ترموفیلیک (۶۰ درجه سانتی گراد) و مزوفیلیک (۳۷ درجه سانتی گراد) تجزیه کننده سلولز را از خاک نشان می‌دهد. باکتریهای ترموفیل و مزوفیل با استفاده از روش رقت‌سازی متوالی پس از غنی‌سازی محیطهای رشد در حضور میکروکریستالین سلولز به عنوان تنها منبع کربن، جداسازی و خالص‌سازی شدند. غربالگری باکتریهای خالص سازی شده برای شناسایی باکتریهای تولید کننده آنزیم سلولاز با استفاده از تکنیک زایموگرام در پلیت انجام شد. از میان سویه‌های سلولیتیک، ۱۲ سویه ترموفیل و ۱۲ سویه مزوفیل براساس میزان فعالیت آنزیم، درصد رشد و میزان پروتئین خارج سلولی با یکدیگر مقایسه و سویه‌های دارای بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز از طریق توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. نتایج نشان داد این سویه‌ها به جنسهای *Bacillus*، *Geobacillus* و *Chryseobacterium* تعلق دارند. سویه برتر ترموفیل و مزوفیل جهت شناسایی دما و pH بهینه مورد بررسی قرار گرفتند که سویه ترموفیل در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و pH ۶/۵ و سویه مزوفیل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH ۸/۵ بهترین عملکرد را نشان دادند. بر اساس نتایج به دست آمده، این باکتریها از پتانسیل لازم جهت تبدیل ضایعات سلولیتیک شهری و کشاورزی به مواد دارای ارزش افزوده برخوردار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سلولز، سلولاز، باکتریهای سلولیتیک، *Bacillus*، *Geobacillus*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۸۶۸۴۴۳، پست الکترونیکی: reza.assareh@srbiau.ac.ir

مقدمه

استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی برای تولید سوختهای زیستی به دلیل فراوانی، دسترسی آسان، قیمت پایین و تجدیدپذیری طی چند دهه گذشته افزایش یافته است. سلولز از اجزاء اصلی زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی است که به دلیل برخورداری از ظرفیت مناسب برای تولید سوخت سبز و پاک در سرتاسر جهان مورد توجه می‌باشد (۴، ۷ و ۱۲). موانع متعددی برای تولید سوخت زیستی از ضایعات سلولزی وجود دارد از جمله این موانع می‌توان به ساختار پایدار سلولز همراه با هزینه بالا و عملکرد پایین آنزیمهای سلولازی اشاره کرد. ساختار پایدار سلولز می-تواند به وسیله پیش تیمارهای فیزیکی و شیمیایی برداشته شود، درحالی که عملکرد آنزیم را می توان از طریق ایجاد محیطهای مناسب رشد برای میکروارگانیسم‌های طبیعی یا دستکاری شده افزایش داد (۱۰، ۱۵ و ۲۱).

مکانیزم هیدرولیز آنزیمی سلولز شامل همکاری سه آنزیم اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز، و بتاگلوکوزیداز می‌باشد. میکروارگانیسم‌هایی مثل باکتریها، قارچها و اکتینومایستها برای تجزیه ترکیبات سلولزی این آنزیمها را به صورت مجزا و نیز به صورت ساختار پیچیده متصل به هم تولید می‌کنند(۲۲ و ۲۴).

هزینه تولید سلولاز بیش از ۴۰ درصد از کل هزینه تبدیل ضایعات سلولزی به بیواتانول را دربر میگیرد (۳، ۷). مطالعات جهت جداسازی و شناسایی میکروبهای

سلولیتیک قوی ادامه دارد و میکروبهای سلولیتیک زیادی مانند: *Bifidobacterium breve*، *Thielavia terrestris*، *Clostridium Sp.*، *Bacillus Sp.*، *Cellulomonas Sp.* و ... گزارش شده است. Bisaria and Ghose تعدادی از قارچها و باکتریهایی که توانایی تجزیه سلولز نامحلول در شرایط آزمایشگاهی را از طریق تولید سلولازهای خارج سلولی دارند ارائه داده‌اند. گونه‌های قارچی عبارتند از : *T. reesei*، *T. viride*، *T. coningi*، *Penicillium funiculosum*، *Pulverulentum*، *Fusarium solani* و *Sclerotium rolfsii*. گونه‌های باکتریایی عبارتند از *Clostridium*، *Cellulomonas*، *Bacillus*، *Thermonorospora*، *Flavobactrium* و *Thermoactinomycetes* (۶).

امروزه تولید و پرورش میکروارگانیسم‌هایی که با سرعت بیشتر و هزینه کمتر موجب تولید این آنزیمها می‌شوند مد نظر بسیاری از محققین می‌باشد. بی‌شک در آینده بسیار نزدیک شاهد تولید قند، اتانول و دیگر محصولات تخمیری از زباله‌های مواد غذایی، کاغذهای باطله، پسماندهای کشاورزی نظیر کاه و دیگر منابع سلولزی خواهیم بود (۸).

هدف از این مطالعه: ۱- غنی‌سازی نمونه خاک انتخاب شده از پارک جنگلی چیتگر ۲- جداسازی باکتریهای تولید کننده آنزیم سلولاز از نمونه خاک غنی‌سازی شده ۳- مقایسه باکتریهای تولیدکننده آنزیم سلولاز و شناسایی ایزوله‌های برتر می باشد.

مواد و روشها

غنی‌سازی و جداسازی باکتریهای تجزیه کننده سلولز: نمونه خاک از پارک جنگلی چیتگر در شهر تهران در ایران انتخاب شد. غنی سازی نمونه خاک با استفاده از محیط کشت با ترکیب (گرم در لیتر) : ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ درصد کلرید آهن III، ۰/۰۵ گرم کلرید کلسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۱ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم کلرید کلسیم، ۰/۳ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۰۵ گرم عصاره مخمر و ۱ میلی‌لیتر از محلول Nitsch's trace element با ترکیب (گرم در لیتر): ۲/۲ گرم سولفات منگنز، ۰/۵ گرم سولفات روی، ۰/۵ گرم اسید بوریک، ۰/۰۱۶ گرم سولفات مس، ۰/۰۲۵ گرم مولیبدات سدیم و ۰/۰۴۶ گرم کلرید کبالت انجام شد (۱۷). این محیط با ۰/۵ گرم در لیتر از میکروکریستالین سلولز به عنوان تنها منبع کربن تکمیل گردید. pH محیط قبل از اتوکلاو با استفاده از NaOH ۱۰ مولار بر روی ۷ تنظیم شد.

یک گرم از نمونه خاک در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل تلقیح شد. ۱۲ ارلن به این صورت آماده و برای جداسازی باکتریهای ترموفیل ۶ ارلن در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و برای جداسازی باکتریهای مزوفیل ۶ ارلن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm برای ۶ روز انکوبه شدند. از مخلوط هر ارلن ۱ میلی‌لیتر به ارلن حاوی محیط تازه منتقل و در همان شرایط انکوباسیون انجام شد. این فرایند ۵ بار تکرار شده و کشتهای نهایی برای جداسازی و خالص سازی مخلوط باکتریهای به دست آمده از غنی-سازی صورت گرفته با استفاده از کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد به روش رقت‌سازی متوالی استفاده شدند. در این روش رقتهای متوالی تهیه و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت آگار شامل محیط غنی‌سازی جامد شده به وسیله آگار بدون ماده مغذی (۱۵ گرم در لیتر) اسپری کرده و پلیتها در دماهای ۶۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پلیتها پس از ۲۴ ساعت بررسی شده و کلنیهای تک رشد کرده برای ۳ مرتبه به صورت خطی کشت داده شدند تا از خلوص آنها اطمینان کامل حاصل گردد (۱۷).

شناسایی باکتری‌های سلولیتیک: محیط کشت زایموگرام با ترکیب (گرم در لیتر) : ۲ گرم سدیم نیترات، ۱ گرم دی-پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۵

گرم کلرید پتاسیم، ۲ گرم کربوکسی متیل سلولز، ۰/۲ گرم پپتون مخصوص میکروبیولوژی و ۱۷ گرم آگار تهیه شد. سویه‌های خالص شده به صورت نقطه‌ای بر روی این محیط کشت داده شدند، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دماهای۳۷ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد پلیتها با استفاده از روشهای Gram's Iodine و کنگورد رنگ آمیزی شدند تا ایزوله‌های سلولیتیک از طریق ایجاد هاله شفاف از دیگر ایزوله‌ها شناسایی شوند (۹).

تعیین میزان فعالیت آنزیم و درصد رشد: جهت تعیین درصد رشد و میزان فعالیت آنزیم باکتریهای مزوفیل در محیط تولید آنزیم شامل محیط کشت LB حاوی ۰/۵ گرم در لیتر کربوکسی متیل سلولز، و باکتریهای ترموفیل در محیط غنی‌سازی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیم به روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) بر اساس مقدار قندهای احیاء کننده آزاد شده از کربوکسی متیل سلولز تعیین شد (۱۳). مخلوط آزمایش ۱ میلی‌لیتر شامل ۵۰۰ میکرولیتر از کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۱ درصد در بافر سیترات–فسفات pH ۶/۵ و ۵۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت کشت به عنوان آنزیم آماده شد، این مخلوط ۱ ساعت در ۵۰oC انکوبه و واکنش با اضافه کردن محلول DNS (۳ میلی‌لیتر) متوقف گردید. نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد انکوبه شده و برای تثبیت رنگ برای ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. پس از آنکه نمونه‌ها خنک شدند جذب نوری هرنمونه در طول موج ۵۵۰ نانومتر در مقابل نمونه کنترل که کاملاً شبیه نمونه آزمایش بدون گرماگذاری در ۵۰ درجه سانتی گراد تهیه شده بود اندازه‌گیری شد. فعالیت سلولاز با استفاده از منحنی استاندارد گلوگز تعیین گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم معادل مقداری از آنزیم می‌باشد که یک میکرومول از گلوگز در دقیقه آزاد کند.

برای تعیین سرعت رشد ۵ میلی‌لیتر از محیط برداشته و به وسیله سانتریفیوز (۳۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰) سلولها از سوپرناتانت جدا شدند. سلولها در یک میلی‌لیتر - هیدروکسید سدیم یک نرمال به صورت محلول در آمده و برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سلولهای تخریب شده به وسیله سانتریفیوز (۳۰ دقیقه در g۱۲۰۰۰) رسوب داده شدند و مقدار پروتئین آزاد شده در اثر تخریب سلولها به روش لوری با استفاده از استاندارد Bovin serum albumin در سوپرناتانت اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین سلولی می‌تواند شاخصی برای تعیین رشد باشد (۱۱ و ۲۰).

غلظت پروتئین محلول با استفاده از روش بردفورد (Bradford MM., 1976) اندازه‌گیری شد (۵). برای تهیه منحنی استاندارد از محلول Bovin serum albomin استفاده شد. جذب نوری نمونه‌های آماده شده بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه-گیری شد .

شناسایی مولکولی ایزوله‌های برتر: ایزوله‌هایی که بیشترین تولید آنزیم سلولاز را در مقایسه با سایر ایزوله‌ها نشان دادند انتخاب و بر اساس توالی‌یابی بخشی از ژن 16S rRNA شناسایی شدند. استخراج DNA باکتری با تغییراتی در روش Sambrook و Russell (2011) انجام شد (۱۹). کل DNA به دست آمده جهت تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA به همراه دو پرایمر عمومی 27 F و 1495 R استفاده شد (۱۴).

27 F (5́GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3́)
1495 R (5́ CTACGGCTACCTTGTTACGA 3́)

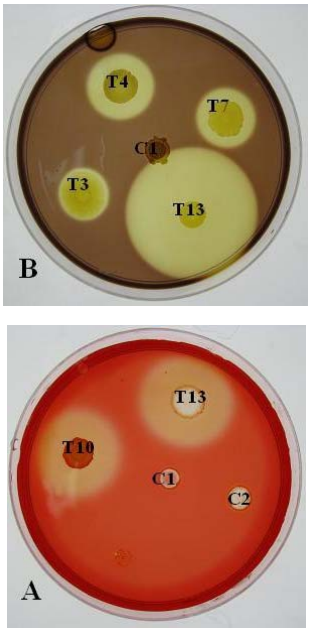
مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ mM MgCl2، از هر dNTPs ۰/۴ میلی مولار، از هر پرایمر pmol ۲۵، DNA ۱۰۰ نانوگرم، Taq DNA پلیمراز U ۰/۵ و ۲/۵میکرولیتر از 10x PCR buffer تهیه شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر طبق مراحل زیر انجام شد : واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت

سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۱دقیقه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه و یک مرحله توسعه نهایی برای ۱۰ دقیقه (۱۴).

محصولات به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت توالی‌یابی، از طریق شرکت سیناژن به شرکت Sourcebioscience فرستاده شده و به روش Sanger توالی‌یابی شدند. توالیهای به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast در بانک ژن با دیگر توالیهای موجود در این پایگاه اطلاعاتی مقایسه شدند. درختچه‌های فیلوژنی به روش neighbor-joining با استفاده از نرم افزار CLUSTAL در برنامه MEGA 5 ترسیم شدند (۱۸ و ۲۳). بر اساس حداقل خطا از درخت توپولوژی Boot strap برای هر نمونه ۱۰۰۰ تکرار بود.

اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم CMC_{ase} : اثر pH محیط کشت بر فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) تولید شده توسط سویه برتر ترموفیل و مزوفیل از طریق ساخت محیط کشت با pHهای متغییر بررسی شد. pH محیط از ۴ تا ۹/۵ با افزایش ۰/۵ واحدی با استفاده از NaOH و HCl ۱۰ مولار تنظیم و سویه برتر ترموفیل و مزوفیل در این محیطها کشت داده شدند. کشتهای تهیه شده در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای سویه ترموفیل و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای سویه مزوفیل انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) حاصل از محیطهای دارای pHهای مختلف اندازه‌گیری و pH بهینه تعیین شد.

اثر دما بر تولید آنزیم از طریق انکوباسیون محیط‌های کشت با pH بهینه در دماهای مختلف بررسی شد. انکوباسیون سویه ترموفیل در دماهای (۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و انکوباسیون سویه مزوفیل در دماهای (۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰، درجه سانتی گراد) صورت گرفت. پس از ۲۴ ساعت فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) حاصل از انکوباسیون در دماهای مختلف اندازه‌گیری و دمای بهینه تعیین شد.

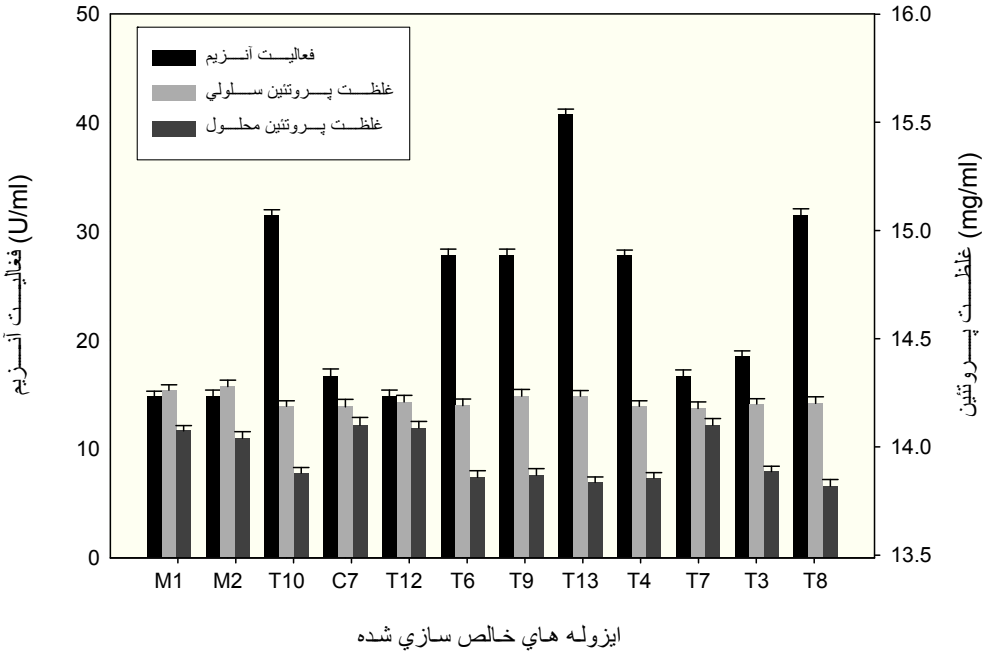


شکل ۱- پلیت زایموگرام جهت غربالگری و شناسایی باکتریهای تولید کننده آنزیم سلولاز از طریق ایجاد هاله شفاف بر روی محیط حاوی CMC بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون و رنگ آمیزی به وسیله (A) کنگورد و (B) Gram's iodine

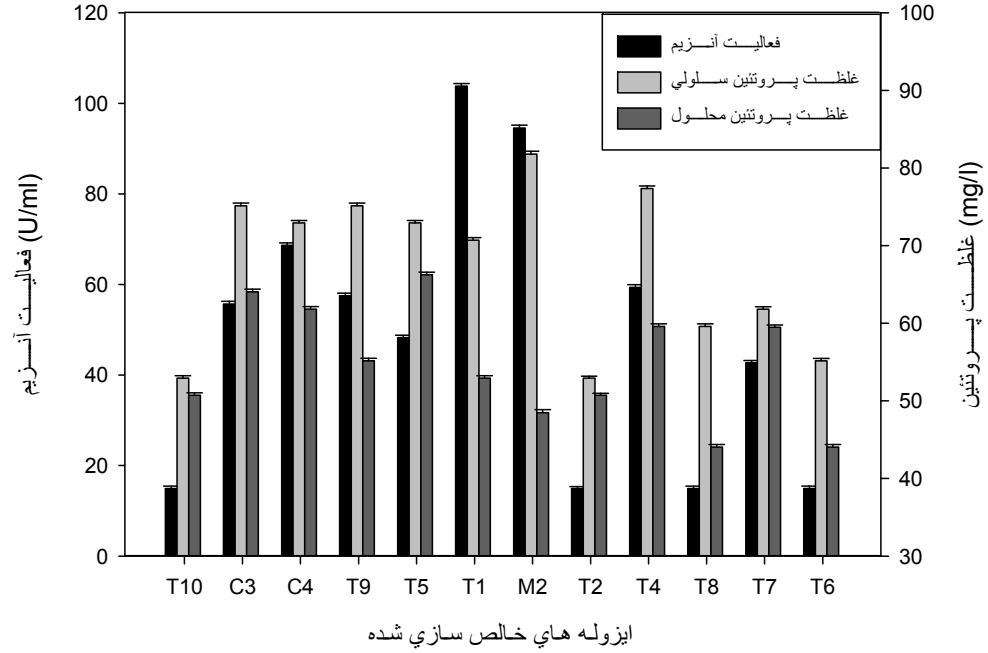
نتایج

جداسازی و شناسایی باکتریهای تجزیه کننده سلولز: تعدادی ایزوله باکتریایی از نمونه خاک جداسازی و خالص سازی شدند. ایزوله‌های انتخاب شده طی ۲۴ ساعت بر روی پلیت رشد کرده و کلنیهای صاف، گرد و خامه‌ای ایجاد کردند. بعضی ایزوله‌ها قادر به تولید رنگدانه در محیط کشت بودند. در بررسیهای میکروسکوپی، باکتریها میله‌ای گرم مثبت و منفی دیده شدند. از میان باکتریهای خالص سازی شده ۱۲ ایزوله ترموفیل و ۱۲ ایزوله مزوفیل به خوبی بر روی محیط حداقل رشد کرده و توانایی ایجاد هاله شفاف بر روی پلیت زایموگرام را نشان دادند (شکل ۱). این ایزوله‌ها برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

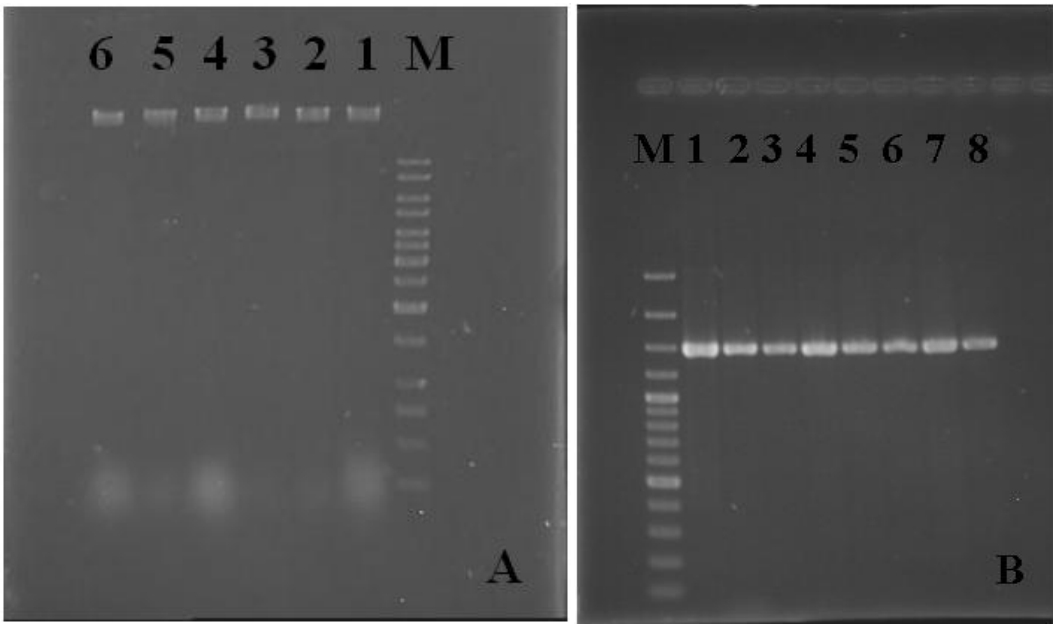
جداسازی ایزوله‌های برتر : ۱۲ ایزوله ترموفیل و ۱۲ ایزوله مزوفیل بر اساس نتایج غربالگری انتخاب شدند. این ایزوله‌ها بر اساس میزان پروتئین محلول، درصد رشد، و میزان فعالیت CMCase با یکدیگر مقایسه شده و ایزوله-هایی که بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز را نشان دادند شناسایی و انتخاب شدند (نمودارهای ۱ و ۲).



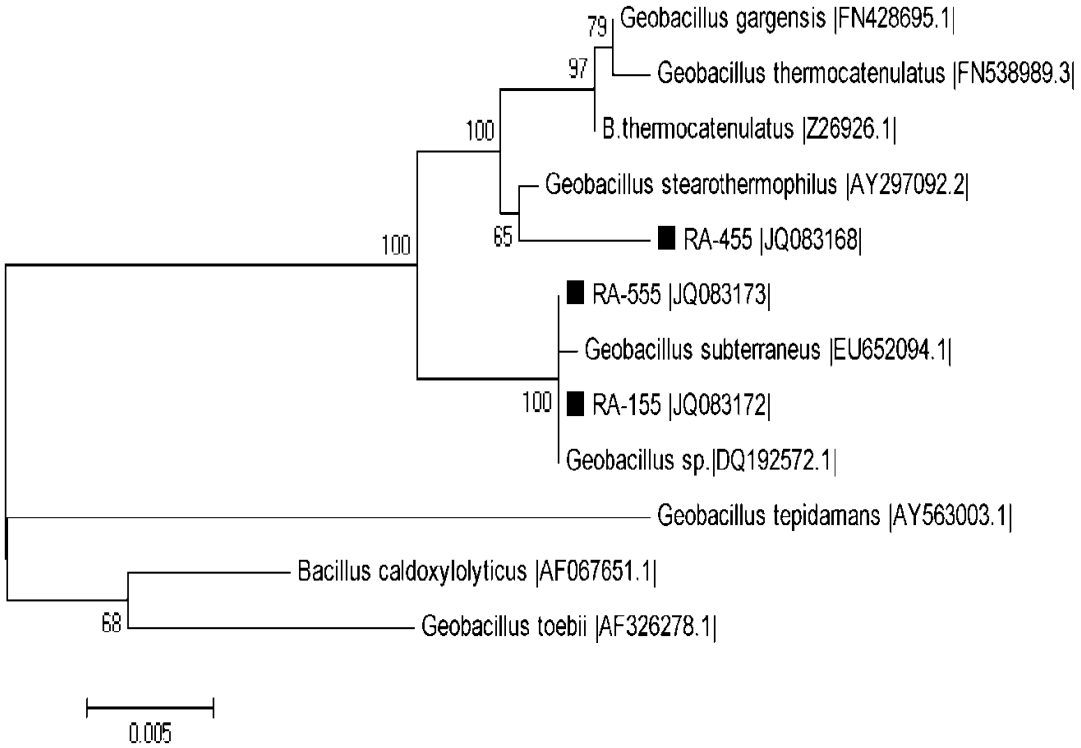
نمودار ۱- مقایسه باکتریهای مزوفیل تولید کننده آنزیم سلولاز بر اساس میزان فعالیت CMCase سوپرناتانت کشتهای ۲۴ ساعته، میزان رشد و غلظت پروتئین سوپرناتانت. غلظت پروتئین سلولی نشان دهنده درصد رشد است.



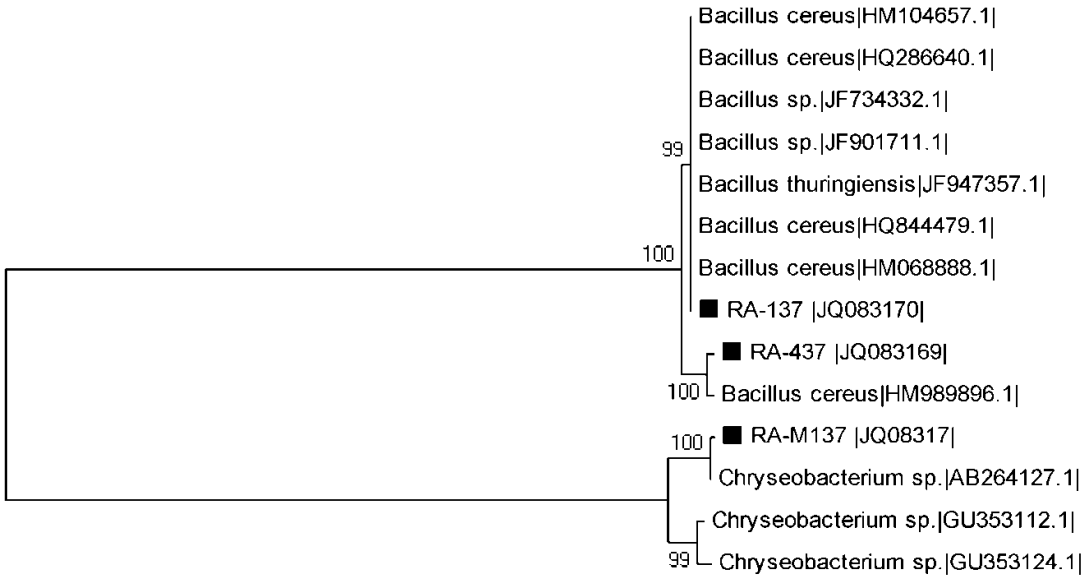
نمودار ۲- مقایسه باکتریهای ترموفیل تولید کننده آنزیم سلولاز بر اساس میزان فعالیت CMCase سوپرناتانت کشتهای ۲۴ ساعته، میزان رشد و غلظت پروتئین سوپرناتانت. غلظت پروتئین سلولی نشان دهنده درصد رشد است.



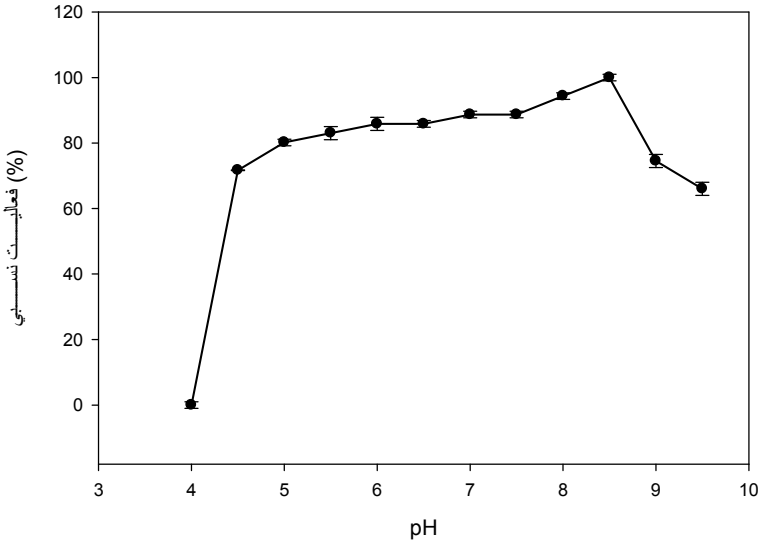
شکل ۲- A: الکتروفورز DNA استخراج شده از ایزوله های جداسازی شده از نمونه های خاک(۱-۶)؛ B: الکتروفورز محصولات PCR. حاصل از ژن کد کننده 16S rRNA مربوط به ایزوله های جداسازی شده از نمونه های خاک. شماره ۱ تا۸: ایزوله های مختلف، M : مارکر DNA 1kb



شکل ۳- درخت فیلوژنی رابطه بین توالی 16S rDNA ایزوله‌های ترموفیل به دست آمده در این مطالعه و توالیهای به دست آمده از بانک جهانی ژن را نشان می‌دهد.درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 به روش neighbor-joining ترسیم شده است.



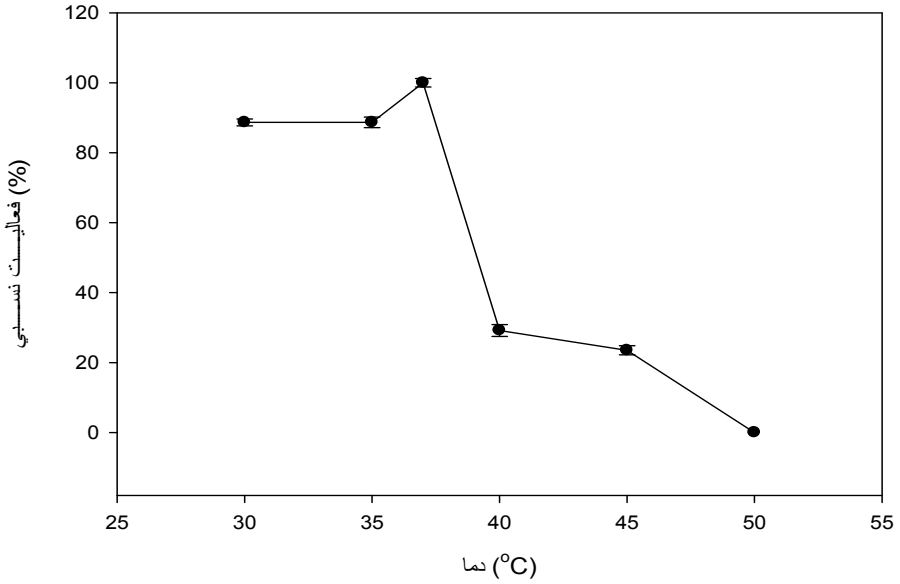
شکل ۴- درخت فیلوژنی رابطه بین توالی 16S rRNA ایزوله‌های مزوفیل به دست آمده در این مطالعه و توالیهای به دست آمده از بانک جهانی ژن را نشان می‌دهد.درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 به روش neighbor-joining ترسیم شده است.



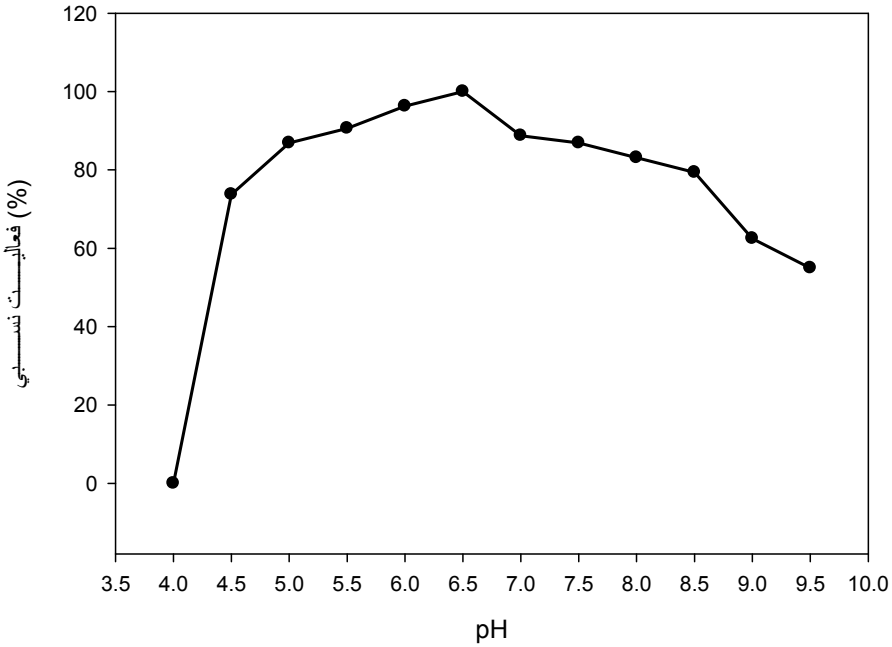
نمودار ۴- اثر pH محیط کشت روی تولید سلولاز را در ایزوله برتر مزوفیل نشان می‌دهد. pH محیط کشت با استفاده از NaOH (1 N) و HCl (1 N) تنظیم و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷oC فعالیت CMCase در سوپرناتانت اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت درصدی از حداکثر فعالیت آنزیم نشان داده شده است.

شناسایی مولکولی ایزوله‌های برتر: شناسایی باکتریهایی که فعالیت آنزیم بیشتری نشان دادند از طریق توالی‌یابی بخشی از ژن 16S rRNA انجام شد. نتایج استخراج DNA و PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. محصولات PCR توالی‌یابی شده و توالیهای به دست آمده در بانک جهانی ژن ثبت شدند. Accession number اختصاص داده شده به توالیهای ثبت شده عبارتند از: JQ083168، JQ083169، JQ083170، JQ083171، JQ083172 و JQ083173. بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR و اطلاعات به دست آمده از بانک جهانی ژن درختچه‌های فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 به روش neighbor-joining برای سویه‌های ترموفیل و مزوفیل

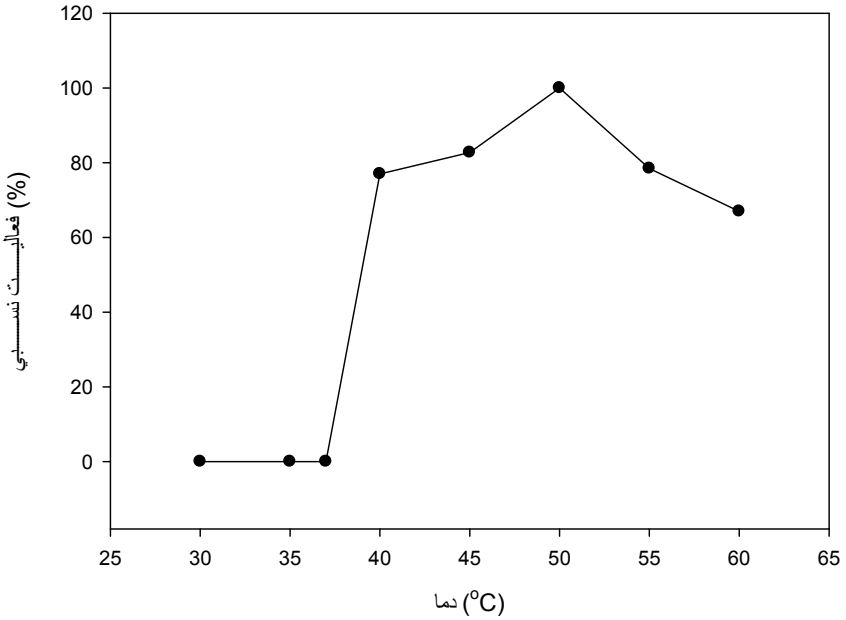
ترسیم شد (شکل ۳ و ۴). بر اساس نتایج به دست آمده از ترسیم درختچه‌های فیلوژنتیکی باکتریهای شناسایی شده به جنسهای *Bacillus*، *Geobacillus* و *Chryseobacterium* تعلق داشتند.



نمودار ۵- اثر دما در تولید سلولاز توسط ایزوله برتر مزوفیل. محیط کشت حاوی CMC به عنوان تنها منبع کربن و با pH ۸/۵ تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون کشتها در دماهای مختلف فعالیت CMCase در سوپرناتانت اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت درصدی از حداکثر فعالیت آنزیم نشان داده شده است.



نمودار ۶ – اثر pH محیط کشت روی تولید سلولاز را در ایزوله برتر ترموفیل نشان می‌دهد. pH محیط کشت با استفاده از NaOH (1 N) و HCl (1 N) تنظیم و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۰oC فعالیت CMCase در سوپرناتانت اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت درصدی از حداکثر فعالیت آنزیم نشان داده شده است.



نمودار ۷ – اثر دما در تولید سلولاز توسط ایزوله برتر ترموفیل. محیط کشت حاوی CMC به عنوان تنها منبع کربن و با pH ۶/۵ تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون کشتها در دماهای مختلف فعالیت CMCase در سوپرناتانت اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت درصدی از حداکثر فعالیت آنزیم نشان داده شده است.

اثر pH و دما در تولید سلولاز: ایزوله‌های ترموفیل و مزوفیل بطور قابل توجه‌ای رشد و تولید سلولاز را در رنج گسترده‌ای از pH نشان دادند. بیشترین تولید آنزیم برای سویه مزوفیل در pH ۸/۵ (نمودار ۴) و برای سویه ترموفیل در pH ۶/۵ (نمودار ۶) به دست آمد. شیب تند قسمت اول این نمودارها به دلیل عدم توانایی رشد ایزوله‌ها در pH کمتر از ۴/۵ می‌باشد. این مقدار از فعالیت آنزیم ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده و مقدار آنزیم به دست آمده در دیگر pH ها با آن مقایسه شد. دمای بهینه برای تولید آنزیم برای سویه مزوفیل ۳۷ درجه سانتی گراد (نمودار ۵) و برای سویه ترموفیل ۵۰ درجه سانتی گراد (نمودار ۷) به دست آمد. فعالیت آنزیم در این دما ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده و مقدار فعالیت آنزیم در سایر دماها نسبت به آن سنجیده شد.

بحث

پژوهش در زمینه هیدرولیز سلولز و آنزیمهای درگیر، به سرعت در حال پیشرفت است. در سالهای اخیر منافع قابل توجهی از مواد گیاهی به عنوان یک منبع تجدیدپذیر که قابلیت تبدیل به محصولات مفید مانند سوختهای مایع را دارند به دست آمده است. از جمله فواید فرآیندهای تبدیل زیستی از بین رفتن ضایعات سلولیتیک شهری و کشاورزی است که امروزه یکی از معضلات محیط زیست می‌باشند. مهدی پور مقدم و همکاران در سال ۱۳۸۸ سویه‌هایی به منظور مقایسه فعالیت آنزیمهای تجزیه کننده دیواره سلولی از ریشه های برنج و گندم جداسازی کردند (۱). زمانی و همکاران در سال ۱۳۸۷ تأثیر عوامل محیطی مختلف شامل منابع کربنی، القاکننده ها، pH و زمان کشت را جهت مطالعه میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در سویه R4 قارچ *Aspergillus niger* را بررسی کردند (۲). در این مطالعه چندین ایزوله باکتریایی با قابلیت تولید آنزیمهای سلولیتیک خالص سازی گردید که پتانسیل کاربرد در تجزیه مواد گیاهی را دارا می‌باشند جهت جداسازی باکتریهای تولیدکننده آنزیم سلولاز از روش غربالگری در پلیت استفاده شد. Kasana و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند رنگ آمیزی با Gram's iodine آسان‌تر و سریع‌تر بوده و

جهت غربالگری مناسب‌تر از روشهای رنگ آمیزی با محلولهای کنگورد و HAB می باشد (۹). استفاده از روشهای کنگورد و Gram's iodine جهت شناسایی سویه-های سلولیتیک و بررسی هاله‌های ایجاد شده در پلیت نشان داد رنگ آمیزی با Gram's iodine سریع‌تر و مناسب‌تر بوده و نتایجی مشابه با Kasana و همکاران به دست آمد. ایزوله‌هایی که بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز را نشان دادند از طریق آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی شدند. توالیهای به دست آمده از این ایزوله‌ها در بانک جهانی ژن ثبت شده و بر اساس اطلاعات به دست آمده از این پایگاه اطلاعاتی و ترسیم درخچه‌های فیلوژنی مشخص شد این سویه‌ها به جنسهای *Bacillus*، *Geobacillus* و *Chryseobacterium* تعلق دارند. Rastogi و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند سلولز و علوفه ذرت مناسبترین سوبسترا جهت افزایش فعالیت CMCase در جنسهای *Bacillus sp.* و*Geobacillus sp.* می‌باشند (۱۶). در بررسیهای این تحقیق گزارشات معدودی از تولید آنزیم سلولاز توسط جنسهای *Bacillus* و *Geobacillus* به دست آمد که بیشتر گزارشات به دست آمده مربوط به سویه‌های ترموفیل و بی هوازی بود. اگرچه تعدادی از باسیلوسهای هوازی تولیدکننده آنزیم اندوگلوکاناز معرفی شده‌اند. در این تحقیق سویه هایی از جنس *Bacillus* و *Geobacillus* شناسایی گردید که قادر بودند در شرایط هوازی در مدت ۲۴ ساعت بالاترین سطح میزان آنزیم خود را تولید کنند. در میان ایزوله‌های مزوفیل ایزوله برتر آنزیم با فعالیت ۴۰U/ml و در میان ایزوله‌های ترموفیل ایزوله برتر آنزیم با فعالیت ۱۰۰U/ml را تولید کردند. این باکتریها قادر بودند در رنج گسترده‌ای از دما و pH رشد کرده و آنزیم با فعالیت قابل توجه تولید کنند. در بحث انرژیهای زیستی بخش عمده هزینه مربوط به گرانی آنزیم‌های سلولیتیک می‌باشد، جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده این آنزیم از خاکهای بومی می‌تواند گامی مهم در کاهش هزینه‌ها و اقتصادی شدن استفاده از ضایعات سلولیتیک - باشد.

منابع

۱- مهدی پور مقدم، م، امتیازی، گ، صالحی، ز، ۱۳۸۸ ، مقایسه فعالیت آنزیمهای فیتاز و سلولاز درآزوسپیریلوم های اندوفیت برنج و گندم، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره ۳، صفحات ۳۴۰ تا ۳۵۰.

۲- رجب خانی،ز، زمانی، م، مطلبی، م، عنصری دیزج یکان، ح، ۱۳۸۷، بهینه سازی تولید آنزیم بتا 1 و 4 اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ *Aspergillus niger*(R4) و همسانه سازی ژن eglB، مجله زیست شناسی **ایران**، جلد ۲۲، شماره ۴، صفحات ۶۸۲ تا ۶۹۰.

3. Ahamed, A., Vermette, P., 2008. Culture based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-30 in bioreactor culture conditions. Biochem. Eng. J. 140, 399–407.

4. Bansal, N., Tewari, R., Gupta, J.K., Soni, S.K., Soni, R., 2011. A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of industrial depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. BioRes. 6, 552–569.

5. Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Anal. Biochem. 72:248-254.

6. Bisaria, V. and Ghose, T., 1978. Bioconvertion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial protein.T.K.Ed.New Dehli 155-165.

7. Deswal, D., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C., 2011. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation.Bioresour. Technol. 102, 6065–6072.

8. Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, E. L., Howard, S., 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. Afr. J. Biotechnol., 2, 602-619.

9. 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. Curr, Microbiol. 57:503-507.

10. Krishna, C., 2005. Solid-state fermentation systems – An Overview. Crit. Rev. Rev. Biotechnol. 25, 1–30.

11. Lowry, O.H., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193, 265–275.

12. Milala, M. A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A. C., Wafer, J.A., 2005. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme productions by *Aspergillus niger*. Res. J. Agric. Biol. Sci. 1, 325–328.

13. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., Burton, A. L., 1960. Easurement of Carboxymethylcellulase activity. Anal. Biochem. 1, 127-132.

14. Sharma, M., Schmid, M., Rothballer, M., Hause, G., Zuccaro, A., Imani, J., Kämpfer, F., Domann, E., Schäfer, P., Hartmann, A., Kogel, K. H., 2008. Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order Sebacinales. Cellular Microbiology 10(11), 2235–2246.

15. Pandey, A., 1994. Solid-State Fermentation. Wiley Eastern Limited, New Delhi, pp. 12–17.

16. Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., Sani, R. K., 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresour. Technol. 101, 8798-8806.

17. Rastogi, G., Muppidi, G. L., Gurram, R. N., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Apel, W. A., Bang, S. S., Dixon, D. J., Sani, R. K., 2009. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 585–598.

18. Saitou, N., and Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenic Trees. Mol. Biol. Evol. 4- 406-425.

19. Sambrook, J., Russell, D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

20. Sami A. J., Akhtar M. W., Malik N. N., Naz B. A., 1988. Production of free and substrate-bound cellulases of cellulomonas flavigena. Division of Biochemistry Institute of chemistry. University of the Panjab.

21- Schloss P. D., Handelsmen, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl.environ. microbial.71,1501-1506.

22. Sherief, A. A., El-Tanash, A. B., Atia, N., 2010. Cellulase production by *Aspergillus fumigates* on mixed substrate of rice straw and wheat bran. Res. J. Microbiol. 5, 199–211.

23. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.199–211.

24. Viikari, L., M.Tenkanen, J. Buchert, M. Ratto, M. Bailey, M. Siika-Apo, and M. Linko. 1993. Hemicellulases for industrial applications. In: Saddler, J. N. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. CAB International, Wallingford, UK, 131–182.

☑ 1.*Geobacillus* sp. enrichment culture clone RA-155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,421 bp linear DNA Accession:JQ083172.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

☐ 2.*Bacillus* sp. enrichment culture clone RA-137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,414 bp linear DNA Accession: JQ083170.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

☐ 3.*Bacillus* sp. enrichment culture clone RA-455 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,421 bp linear DNA Accession: JQ083168.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

☐ 4.*Geobacillus* sp. enrichment culture clone RA-555 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,430 bp linear DNA Accession: JQ083173.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

☐ 5.*Chryseobacterium* enrichment culture clone RA-M137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,386 bp linear DNA Accession: JQ083171.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

☐ 6.*Bacillus* sp. enrichment culture clone RA-436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,389 bp linear DNA Accession:JQ083169.1

GenBank FASTA Graphics Related Sequences

Isolation and identification of native cellulose-degrading bacteria from soil

Assareh R.[1], Shahbani Zahiri H.[2] and Eshghi S.[1]
[1] Complex Laboratory, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran
[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The present study shows isolation and identification of thermophilic (60°C) and mesophilic (37°C) bacteria degrading the cellulose from the soil. after the growth environments enrichment with microcrystalline of cellulose as the sole source of carbon, Thermophilic and Mesophilic bacteria were isolated and purified by serial dilution method. Screening of purified bacteria was done to identify cellulase-producing bacteria by zymogram on plate method. Among the cellulolytic strains, 12 thermophilic and 12 mesophilic strains were selected and these bacteria were compared with each other based on cellulase activity, growth and extracellular protein amounts. Identifying the strains with highest enzyme activity based on gene sequences 16S rDNA suggested that these strains belong to genera *Bacillus* ،*Geobacillus* و *Chryseobacterium*. the preferred thermophilic and mesophilic genera were assessed to identify the best temperature and pH inwhich the thermophilic and mesophilic genera showed the best function in temperature 50°C and pH 6.5 and temperature 37°C and pH 8.5 respectively. These bacteria have necessitated potential for biological conversion of urban and agricultural cellulolytic wastes to valuable materials.

Key words: cellulose, cellulase, cellulytic bacteria, *Bacillus, Geobacillus*