

جداسازی یک سویه سلولوموناس از روده کرم ابریشم و ارزیابی فعالیت اندوگلوکانازی آن

جعفر همت و گیتی امتیازی

عضو هیأت علمی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران - پژوهشکده یزد و

دانشیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۹/۱۷

خلاصه

باکتری یا باکتریهای هیدرولیز کننده سلولز احتمالی، طی دو سال متوالی از روده کرم جدا گردید. بررسی نشان داد که از روده کرم ابریشم در محیط سلولز آگار و در دمای ۲۵C و ۳۰C حداقل یک باکتری مزوفیل بیهوازی اختیاری تجزیه کننده سلولز که بعنوان سویه سلولوموناس شناسایی گردید قابل جداسازی است این سویه دارای زمان نسل حدود سه ساعت بود و در محیط کشت شش روزه بیشترین مقدار فعالیت اندوگلوکانازی را (3 U /ml) نشان داد بنابراین روده کرم ابریشم حداقل زیستگاه اکولوژیک یک سویه سلولوموناس است که می تواند توانایی بالقوه جهت اهداف بیوتکنولوژی را نیز دارا باشد.

واژه های کلیدی: کرم ابریشم، سلولوموناس، اندوگلوکاناز

مقدمه

موجودات زیادی در طبیعت سلولز را جهت تامین نیاز کربنی و انرژی خود انتخاب نمودند چرا که سلولز زنجیره پلیمری فابل تجزیه از گلوکز است که در آن زیر واحدهای گلوکز بوسیله پیوندهای بتا - ۱ و ۴- گلوکوزیدی بهم متصل شده اند. تاکنون مطالعات و گزارشات متعددی در مورد جداسازی و بررسی خواص باکتریهای تجزیه کننده سلولز از دستگاه گوارش نشخوارکنندگان منتشر شده است (۱۴، ۱۳، ۵). بعضی حشرات هم از گیاهان و مواد سلولزی تغذیه می کنند (۸، ۶). کرم ابریشم^۱ نیز در مرحله لاروی از برگ توت بعنوان تنها منبع غذایی استفاده می کند. برگ توت دارای ترکیبات شیمیایی متعدد است که بر آورنده نیازهای لارو است از جمله این ترکیبات کربوهیدراتهای برگ توت هستند که در رشد مطلوب لاروها بخصوص انواع جوان اهمیت بسزایی دارند. این

کربوهیدراتها، قندهای گلوکز، فروکتوز، دکسترین، نشاسته، گالاکتان، آرابان، فیبر خام و بر حسب برخی گزارشها، مالوز و پکتین را نیز شامل می شود. فیبر خام شامل سلولز، پنتوزان و لگنین است. ولی اینها بوسیله لارو کرم ابریشم قابل هضم و جذب نیستند (۲). از طرفی امروزه سلولاز در روده های کرم ابریشم برگ چوار مشخص شده است. منبع سلولاز را در حشرات به میکرو ارگانیسماهای همزیست نسبت می دهند (۸، ۶، ۱) سلولاز یک سیستم آنزیمی تجزیه کننده سلولز به زیر واحدهای آن است. اولین آنزیم این سیستم از لحاظ عملکرد روی سلولز، بتا - ۱ و ۴- اندوگلوکاناز^۲ است که با حمله به انتهای غیر احیای سلولز، برای آنزیم بعدی سیستم یعنی بتا - ۱ و ۴- اگزوگلوکاناز^۳، محل اثر ایجاد میکند. توانایی از آنزیم اخیر، سلوبیوز را از سلولز آزاد می کنند. در نهایت آنزیم بتا - ۱ و ۴- گلوکوزیداز^۴، سلوبیوز را به دو ملکول گلوکز هیدرولیز

1 - Bombyx mori

2 - B-1,4-Endo glucanase (E.C.3.2.1.4)

3 - B-1,4-Exo glucanase (E.C.3.2.1.91)

4 - B-1,4-Glu Cosidase (E.C.3.2.1.21)

وجود یا عدم وجود فعالیت اندوگلوکنازی باکتریهای جدا شده و با روش DNS میزان فعالیت از لحاظ کمی تعیین گردید. واحد آنزیمی (U/ml) معادل مقدار آنزیمی که یک میکرومول قند احیاء را در دمای ۵۰C طی ۱۵ دقیقه از سوبسترا آزاد می کند، تعریف می شود - بررسی رشد و زمان نسل باکتری انتخاب شده

بمنظور بدست آوردن زمان نسل^۵ باکتری جدا شده، منحنی رشد آن بررسی واز روی آن زمان نسل باکتری مشخص شد. برای بدست آوردن الگوی منحنی رشد، باکتری در محیط کربوکسی متیل سلولز ۱% با pH برابر ۷ بمیزان ۱% (حجم به حجم) تلقیح و بمدت یک هفته در گرمخانه شیکردار در دمای ۳۰C قرارداد شد. طی آن روند رشد با نمونه گیریهای متعدد در فواصل زمانی مختلف و خواندن جذب نوری در nm ۶۰۰ بررسی شد.

- رابطه بین سن محیط کشت و تولید آنزیم

برای بدست آوردن زمان بیشترین مقدار آنزیم تولیدی، از محیط کشت سلولز مایع (۱%) همانند شرایط فوق الذکر بمدت یک هفته نمونه گیری شد. نمونه ها همانند قبل برای سنجش آنزیمی آماده و در فریز نگهداری شدند. در پایان نمونه گیری، فعالیت نمونه ها همانند قبل به روش استاندارد تعیین شد.

نتایج

شناسایی باکتری جدا شده و شمارش آن

مشاهدات روی محیط سلولز آگار نشان داد که تنها یک باکتری که از لحاظ ریخت شناسی دارای کلنی گرد، صاف کرم رنگ (گاه به رنگ لیموئی تغییر رنگ می دهد) با قوام کره ای و حاشیه صاف و قطر ۲ تا ۲/۵ میلیمتر می باشد قابل جداسازی است.

از لحاظ میکروسکوپی نیز جز گروه ۱۵ کتاب باکتری شناسی برگگی (چاپ ۱۹۸۶) یعنی گروه باکتری های میله ای گرم مثبت نامنظم بدون اسپور قرار می گیرد. با توجه به مطلب اخیر راجع به شرایط نیازمندی اکسیژن باکتری و منبع نمونه (شیره گوارش کرم) از یک طرف و شرایط کشت (هوای و بی هوای) از طرف دیگر، می توان استنباط کرد باکتری جدا شده جزء زیر گروه بی هوای های اختیاری می تواند قرار گیرد.

می کند (۳). سویه جدا شده مورد مطالعه دارای سیستم آنزیمی ذکر شده است. در این پژوهش جداسازی یک سویه سلولوموناس^۱ از روده کرم ابریشم و برخی خواص مهم اندوگلوکنازی آن بررسی می شود.

مواد و روشها

- جداسازی باکتری

لاروها پس از خروج از تخم روی برگ توت سفید قرارداد شد. پس از طی مراحل رشدی و پوست اندازی آنها، روزانه چند کرم بالغ بطور اتفاقی انتخاب واز روده آنها در شرایط استریل نمونه گیری به عمل آمد. نمونه های همگن شده از روده و همولفن خارج شده در یک محیط سلولز آگار در دمای ۳۰C کشت داده شدند (۴). کلنیهای ظاهر شده، خالص گردید و خواص ریخت شناسی و فیزیولوژیک باکتریها مورد بررسی قرار گرفت. کلیه عملیات دوبار در سالهای ۱۳۷۵ و ۱۳۷۶ انجام گردید.

- شمارش باکتری جدا شده

در حین جداسازی نکته ای که مورد توجه قرار گرفت شمارش تعداد باکتری مذکور در حجم نمونه همگن شده بکار رفته بود. برای نیل به این هدف جداسازی و شمارش بارقتهای مختلف از نمونه همگن شده انجام شد برای تهیه رقت از سرم فیزیولوژیک قبلا سترون شده استفاده شد.

- شناسایی سویه باکتری انتخابی

شناسایی باکتری جدا شده انتخابی طبق کتاب مرجع باکتری شناسی برگگی^۲ و با توجه به خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیک آن انجام گرفت (۱۲ و ۷).

- بررسی خاصیت اندوگلوکنازی باکتریهای جدا شده

باکتریهای جدا شده در محیط سلولز مایع در گرمخانه شیکردار با سرعت شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰C کشت داده شدند. از محیط کشت پنج روزه توسط ساتریفوژ یخچالدار با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه مایع رویی^۳ عاری از سلول تهیه و جهت سنجش فعالیت اندوگلوکنازی استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیمی طبق دو روش استاندارد یکی به روش DNS^۴ و دیگری روش پلیتی انجام شد (۱۱ و ۱۰). باروش پلیتی

1- Cellulomonas

2 - Bergey's manual

3 - Supernatant

4- DNS (dinitrosalicylic acid)

5 - Generation time

6- Carboxymethyl cellulose

جدول ۱: برخی خواص تمایزی جنس سلولوموناس " در مقایسه با خواص سلولوموناس جدا شده از کرم ابریشم (sw97)

فعالیت سلولاری	زیستگاه	کاتالاز	حرکت	نیازمندی به اکسیژن	رنگ آمیزی	وجود بیسلیم	ریخت شناسی
	خاک و مواد			بیهواری			میله ای بینظم
+	در حال تجزیه	+	D	اختیاری	+b	-	بعضی
+	روده کرم			بیهواری			باکتری
		+	-	اختیاری	+b	-	میله ای بینظم
							بعضی
							کوکوسی

a: (+)، ۹۰٪ یا بیشتر سویه ها مثبت و (-)، ۱۰٪ یا کمتر سویه ها منفی b: براحتی بیرنگ میشوند. D: در قسمت عمده گونه ها متفاوت است.

زمینه تیره محیط قابل رویت است. بر این اساس سویه sw97: در محیط سلولز و کربوکسی متیل سلولز فعالیت اندوگلوکنازی نشان می دهد. محللهایی که بصورت هاله تو خالی است محلول رویی محیط کشت عاری از باکتری و محللهایی که بصورت هاله یکنواخت است محلول آنزیمی دارای باکتری است.

رابطه سن محیط کشت و تولید آنزیم

بررسی روند تولید آنزیم اندوگلوکنازی و زمان بیشترین مقدار آنزیم تولید شده طی یک هفته نشان داد که فعالیت اندوگلوکنازی در محیط سلولز ۱٪ (دمای ۳۰°C و pH اولیه معادل ۷) در روز اول قابل سنجش است و در روز ششم به حداکثر مقدار خود (۳U/ml) می رسد و سپس افت می کند (شکل ۳).

بحث

جداسازی سویه سلولوموناس از روده کرم ابریشم طی دو سال مجزا از دو سری کرم مجزا مبین آن است که روده کرم ابریشم شرایط لازم برای زیست باکتری مزوفیل بیهواری همانند باکتری تجزیه کننده سلولز موجود در روده کرم است اما می توان گفت در شرایط عمل شده سویه sw97 یکی از باکتریهای موجود و احتمالا منبع سلولاز شیر گوارشی ذکر شده برای کرم ابریشم است (۱). طبق اطلاعات ما این اولین گزارش جداسازی سویه مزبور از سلولوموناس را دارد. البته نمی توان ادعا کرد که این تنها دستنگاه گوارش کرم ابریشم است. بگوین و ایسن نیز قبلا خواص سلولازی یک گونه سلولوموناس جدا شده از مجرای گوارشی کرم خاکی را بررسی کرده بودند (۴). ملکراده و همکاران نیز سلولوموناس را از خاک، زیستگاه اصلی این باکتری، جداسازی نموده اند (۹). پس می توان گفت روده این کرم (و شاید کرمهای

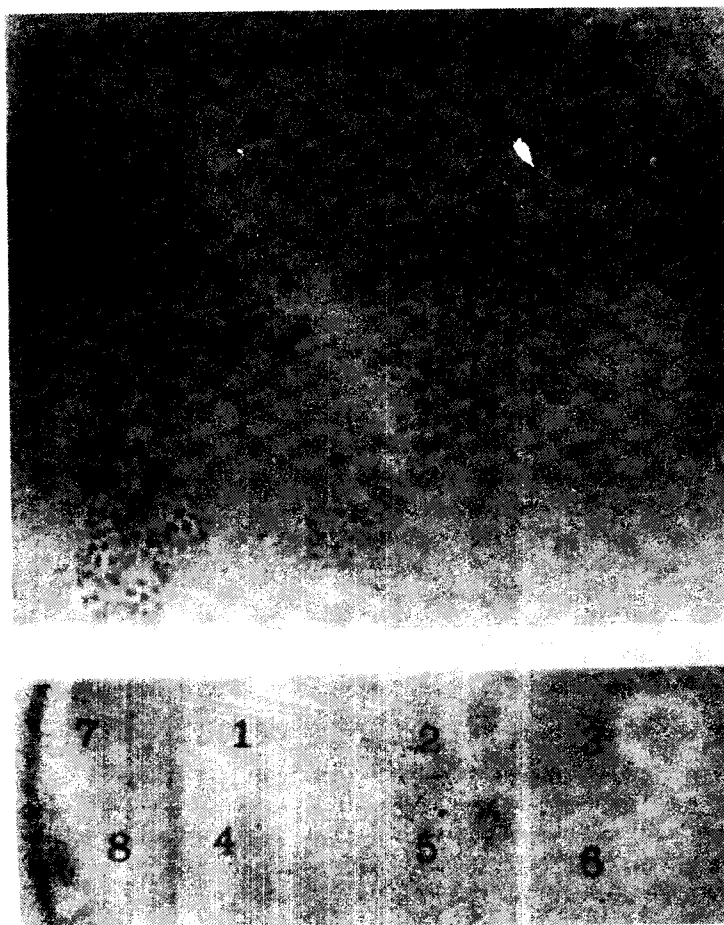
با توجه به خصوصیات بیوشیمیایی جنسهای مزبور و با توجه به خصوصیات شاخص باکتری جدا شده یعنی ریخت شناسی سلولی (میله ای نامنظم، بعضی کوکوس)، عدم وجود هیف انشعابی وسیع و سهولت تغییر خصوصیت گرم مثبت بودن و وجود خصوصیت سلولازی (جدول ۱) و دیگر خصوصیات فیزیولوژیکی تاییدی (نتایج آورده نشده است)، باکتری مزبور در جنس سلولوموناس قرار می گیرد قابل ذکر اینکه بر طبق چاپ ۱۹۹۴ کتاب مذکور، باکتری جدا شده در گروه بیستم و در هر حال جنس سلولوموناس قرار میگیرد (۱۲ و ۷). این سویه را sw97 نامگذاری می کنیم (sw برای کرم ابریشم و ۹۷ برای سال جداسازی). میانگین برآورد شمارشها نشان داد که در عصاره همگن شده همولنف و روده کرم ابریشم $10^4 \times 1/5 - 1$ عدد باکتری در میلی لیتر وجود دارد.

بررسی منحنی رشد و زمان نسل

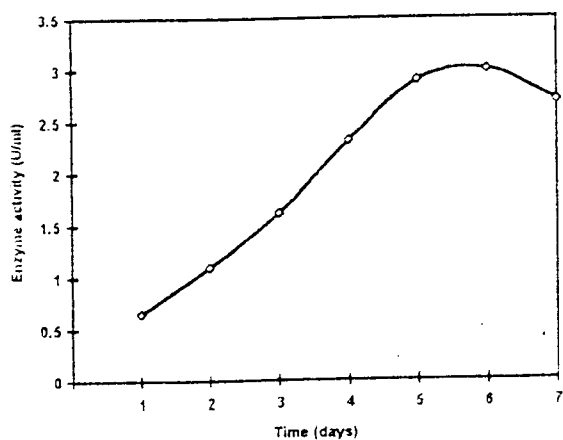
بررسی منحنی رشد باکتری جدا شده نشان داد که این باکتری در محیط کربوکسی متیل سلولز و در شرایط ذکر شده پس از یک مرحله سکون چند ساعته وارد مرحله رشدنمایی می شود و پس از حدود ۴ روز وارد مرحله رکود می گردد (شکل ۲). طبق منحنی رشد (مقادیر لگاریتمی جذب بر حسب زمان) زمان نسل حدود ۳ ساعت می باشد.

فعالیت اندوگلوکنازی سویه sw97

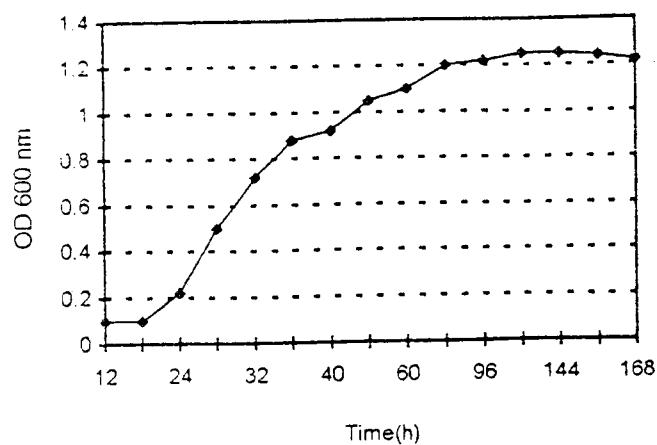
همانطور که قبلا ذکر شد بررسی فعالیت اندوگلوکنازی سویه جدا شده به دو روش DNS و پلیتی انجام گرفت. مزیت روش پلیتی این است که با مقدار کمی محلول آنزیمی (مثلا ۵۰ میکرولیتر) در یک زمان می توان وجود یا عدم وجود فعالیت آنزیمی چند باکتری جدا شده را در یک پلیت با حداقل امکانات بررسی کرد. همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می شود محل اثر فعالیت بصورت هاله بیرنگ در



شکل ۱ - الف: خصوصیت ریخت شناسی سویه SW97 ب: سنجش فعالیت اندوگلوکنازی به روش پلیتی، مکانهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷، محلول آنزیمی دارای باکتری جدا شده در محیط CMC، ۲ و ۳، محلول آنزیمی فاقد باکتری در محیط سلولز، ۵، یک نمونه سلولاز تجارתי (شاهد مثبت)، ۷ و ۸، کنترل منفی (محلول آنزیمی جوشانده شده)



شکل ۳ - رابطه سن در محیط کشت و مقدار تولید آنزیم اندوگلوکناز سویه Sw97 طی یک هفته در محیط سلولز مایع ۱٪ با pH اولیه معادل ۷ در دمای ۳۰°C



شکل ۲ - منحنی رشد سویه Sw97 جدا شده در محیط کشت ۱٪ کربوکسی متیل سلولز (pH=۷) طی مدت ۱۶۸ ساعت در دمای ۳۰°C

ابریشم نیز از لحاظ وجود یا عدم وجود فعالیت آنزیم سلولاز مورد بررسی قرار گرفت که با این روش فعلیتی در عصاره مشاهده نشد. دلایل این امر می تواند عدم وجود مقدار کافی آنزیم قابل سنجش در عصاره، عدم حساسیت کافی روش پلیتی و یا وجود بازدارنده فعالیت آنزیم در همولنف و موارد مشابه باشد. همچنین در این پژوهش فقط وجود باکتریهای بی هوازی اختیاری روده کرم ابریشم بررسی شد. بنابراین احتمال وجود میکروارگانیسمهای دیگر را نمی توان رد کرد. این مطالعه صرفنظر از جنبه بررسی اکولوژیکی فلور دستگاه گوارش کرم ابریشم، از جنبه شناسایی منابع باکتریهای بالقوه مفید در زمینه بیوتکنولوژی نیز دارای اهمیت است.

دیگری که به صورتی با خاک در ارتباط هستند) می تواند زیستگاه اکولوژیکی سلولوموناس باشد. از این جنبه که آیا سویه جدا شده می تواند در برآوردن نیازهای غذایی کرم ابریشم دخیل باشد، نیازمند بررسی بیشتر است. البته شاید سرعت عبور مواد غذایی در روده، برای تجزیه کامل سلولز کافی نباشد. اما با توجه به زمان نسل ۳ ساعته سویه، و اثر القایی قندها در حضور سلولز برای این سویه (نتایج اینجا نشان داده نشده است) باکتری های موجود در روده، احتمالاً اندک سلولازی تولید خواهند کرد و هر باکتری اولیه پس از یک هفته استقرار توان قابل توجه تولید آنزیم را خواهد داشت. ذکر این نکته ضروری می نماید که در روش پلیتی، عصاره همگن شده کرم

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. بافری زنوز. ۱۳۷۲. اصول مورفولوژی و فیزیولوژی حشرات. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۹.
۲. جوانشیر. ک. ۱۳۷۴. توت برای ابریشم و ابریشمهای بدون توت. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۶ - ۲۶۳.
3. Beguin . P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol. 44: 219-48.
4. Beguin. P., H. Eisen . and H. Roupas. 1977. Free and cellulose - bound cellulases in a Cellulomonas sp. J. Gen. Microbiol. 101: 191-96.
5. Borneman. W. S., D. E. Akin. and L. G. Ljungdahl. 1989. Fermentation products of plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. Appl Environ . Microbiol. 55: 1066-73.
6. Gullan. P. J. and P. S. Cranston. 1994. The Insects:An outline of entomology. Chapman & Hall. London. UK. 98. p.
7. Hensyl. L. W. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore USA . 575. p.
8. Hoffman . K. H. 1985. Enviromental physiology and biotechnology and biochemistry of Insects. Springe-Verlag. Berlin. 98. p.
9. Malekzadeh . F., M. Azin., M. Shahamat and R. R. Cowell . 1993. Isolation and identification of three Cellulomonas sp. from forest soil . W. J. Microbiol. Biothechnol. 9: 53-55.
10. Mateos. F. F., J. I. Jiminez-Zurdo., J. Chen., A. S. Squartin., S. K. Haach., A. Molina., D. H. Hubbell. and F. B. Dazze, 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1816-22.
- 11 . Miller. G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Analy. Chemist. 31: 426-28.
- 12 . Sneath. P. A., N. S. Mair., M. E. Sharpe. and J. G. Holt. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. U S A . 1261-1328. pp.
- 13 . Torre . M. and C. Casas . 1984. Isolation and characterization of a symbiotic mixed bacterial culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 430-34.
- 14 . Varel. V. H., S. J. Fryda. and I. M. Robinson. 1984. Cellulolytic bacteria from pig large intestine . Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 219-21.

**Isolation of *Cellulomonas* sp. from Silkworm (*Bombyx mori*) Gut and
Evaluation of its Endoglucanase Activity.**

G. HEMMAT AND G. EMTIAZI

**Member of Scientific Board, Iranian Research Organization for Science
and Technology, Yazd Center, and Associate Professor of Science
Faculty , Isfahan University .**

Accepted Dec. 8, 1999

SUMMARY

This study was done in order to determine the cellulolytic-bacterial microflora of silkworm (*Bombyx mori*) gut. A facultative anaerobic and cellulolytic mesophilic bacterium determined as *Cellulomonas* sp. (sw97¹) was isolated from silkworm gut at 25° c and 30° c in cellulose agar. The strain generation time was almost 3 hours. A maximum level of endoglucanase (E. C. 3. 2. 1. 91) was observed 6 days after culture . Thus the gut of silkworm is an ecological niche for *Cellulomonas* sp. that can have a potential usage in biotechnology

Key words: Silkworm, *Cellulomonas*, Endoglucanase.