P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (2) :47-55

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

دراسة البكتريا المنتجة لانزيم السليوليز المعزولة من بيئات مختلفة وايجاد الظروف المثلى لانتاج الانزيم.

علي عدنان عبد* احمد محمد تركي** احمد عبد الجبار سليمان***

*مديرية تربية الانبار

**جامعة الانبار كلية العلوم.

*** جامعة الانبار مركز دراسات الصحراء

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: ٢٠١٧/٥/٣

DOI: 10.37652/juaps.2015.124509

الكلمات المفتاحية:

البكتريا المنتجة لانزيم السليوليز،
عزل،
لظروف المثلى لانتاج الانزيم.

الخلاصة:

جمعت ١٨٠ عينة من (التربة، امعاء الحشرات، اوراق الاشجار، كرش المجترات ومياه المجاري) وانتخبت منها خمس عزلات فقط محللة للسليلوز بواقع عزلة واحدة لكل مصدر وشخصت على انها تعود الى (*Staphylococcus sciuri*، *Streptococcus parasanguinis*، *Sphingomonaspaucimobilis*، *Rhizobium radiobacter*، *Escherichia coli*) وبأقطار تحلل بلغت (٤٢، ٢٨، ٣٩، ٣٥، ٣٢ملم) على التوالي، واظهر تأثير تغير الرقم الهيدروجيني ان افضل فعالية لإنزيم السليوليز بلغت ٦.٦٢٧ وحدة/مل عند الرقم الهيدروجيني ٦ عند استخدام العزلة المحلية *Staph. Sciuri* في حين بلغت الفعالية الانزيمية ٥.٨٥٧، ٥.٥١٨، ٥.٩٩٦ وحدة/مل للعزلات المحلية *Strep. parasanguinis*، *Sphingo. paucimobilis*، *Rhizo. radiobacter* على التوالي عند الرقم الهيدروجيني ٧ بينما اعطت العزلة المحلية *E. coli* افضل فعالية للانزيم عند الرقم الهيدروجيني ٦.٥ بفعالية بلغت ٤.٩٦٣ وحدة/مل. وتباينت كفاءة هذه العزلات الخمس في قدرتها على انتاج انزيم السليوليز في الوسط الزرعي السائل وتحت درجات حرارية مختلفة إذ ان افضل فعالية للانزيم سجلت عند ٣٠م° للعزلتين المحليتين *Staph. Sciuri* و، *Strep. Parasanguinis* بينما كانت افضل فعالية للأنزيم للعزلتين المحليتين *Sphingo. Paucimobilis* و *E. coli* عند درجة حرارة ٢٥م° في حين كانت الدرجة الحرارية ٥٠م° هي الافضل لإنتاج الانزيم من قبل العزلة المحلية *Rhizo. Radiobacter*. وكانت لعمليتي التحريك والتهوية دور في زيادة فعالية الانزيم عند عدد دورات ٥٠ دورة/دقيقة للعزلات المحلية *Strep. parasanguinis*، *Sphingo. paucimobilis*، *Rhizo. Radiobacter* و *E. coli* في حين بلغت افضل فعالية للأنزيم من قبل العزلة المحلية *Staph. Sciuri* عند عدد دورات ١٠٠ دورة/دقيقة. وقد اظهرت النتائج ان افضل انتاج لأنزيم السليوليز تحقق للعزلات الخمس بعد ٤٨ ساعة من الحضن.

المقدمة

السليلوز يشكل (١٥–٣٩)% من الكتلة الجافة من الجدار الابتدائي او الاولي وحوالي ٤٠% من الجدار الثانوي. يكون السليلوز بشكل بلوري في الطبيعة ويختلف حسب مصادره من ناحية طول السلسلة ودرجة الترابط بين هذه السلاسل.

ويكون على شكلين الاول بلوري والثاني غير بلوري(١) والشكل الثاني هو الهدف لإنزيمات cellulase معطيا بالتالي زيادة نسبة الشكل البلوري (٢) هذا الشكل يسبب صعوبة تحلل السليلوز نتيجة كون جزيئات الشكل البلوري مرتبطة بواسطة أواصر هيدروجينية وهذه تجعل السليلوز غير ذائب في الماء أو انه يصعب تحلله مائيا وحتى أنزيميا عدا بعض الانزيمات المحللة له بواسطة انزيمات السليوليز محولة اياه الى الكلوكوز(٣) ان السليلوز في النباتات يكون عادة مخلوط مع اللكنين (Lignin) والهيمي سليلوز (Hemicellulose) أما السليلوز الموجود في البكتريا الذي يسمى السليلوز البكتيري Bacterial

* Corresponding author at: University of Anbar College of Science .E-mail address:

cellulose يتكون من سلاسل متوازية تتألف هذه السلاسل من وحدات D–glucopyranose مترابطة فيما بينها بواسطة اواصر هيدروجينية وهي ذات الاواصر الموجودة في التركيب الكيميائي للسليلوز النباتي(٤) ذكر(٥) ان السليليز هو انزيم سليلوزي تنتجه الفطريات والبكتريا له القدرة على تحليل السليلوز الى بنيته الاساسية β– glucose او Oligosaccharides لهذا السبب يستخدم في العديد من التطبيقات المتنوعة. أذ يتكون هذا الانزيم بصورة عامة من مجموعتين الاولى Ctalytic domain المجموعة المحفزة ويرمز لها CD التي تعمل على تحفيز تحلل اواصر glucosidase β1,4 للسليلوز، والثانية Cellulose–binding domain (CBD) مجموعة الارتباط بالسليلوز والتي تسمى حاليا (Carbohydrate binding model (CBM 1 1 وان احد اهم صفات هذه المجموعة انها تفتقر لفعالية التحفيز اذ انها ترتبط بسطح السليلوز بواسطة ثلاثة احماض امينية عطرية وان ازالة هذه المجموعة يسبب انخفاض كبير في فعالية الارتباط والتحلل ضد السليلوز البلوري ولا يؤثر على تحلل السليلوز الغير بلوري الامر الذي ادى الى اقتراح ان وظيفة هذه المجموعة (CBM1) تتعلق في تحليل السليلوز البلوري(٦) الانزيمات التي تحلل السليلوز تعمل على تحفيز تحلل السليلوز الذائب وغير الذائب عن طريق كسر الاواصر الكلايكوسيدية (β–1,4) التي تربط بين وحدات الكلوكوز.وتشكل الانزيمات عصب الحياة للأحياء جميعا اذ تشكل جانبا مهما من عمليات التصنيع(٧).

المواد وطرق العمل

أ- عزل البكتريا المحللة للسليلوز

تم عزل البكتريا المحللة للسليلوز من مصادر محلية مختلفة (تربة، امعاء حشرات، اوراق اشجار، كرش المجترات ومياه المجاري) باستخدام اوساط زرعية مختلفة حسب مصدر العزل.

ولغرض اختيار العزلات الاكفاء نشطت العزلات المنتجة لأنزيم السليوليز بنقل مليء عروة الناقل (Loop Full) من المزارع المحفوظة الى وسط الاكار المغذي ثم اعيد زراعة العزلات المنقاة على وسط اكار السليلوز الذي تم وصفه من قبل (١١) في مركز الطبق داخل دائرة لا يتجاوز قطرها ١سم وحضنت في درجة حرارة ٣٠م° لمدة (٢٤، ٤٨، ٧٢) ساعة وسجل قطر التحلل من خلال تكون الهالة الشفافة (حزام تحلل السليلوز حول تلك المستعمرات) وبناء على نتائج هذا الاختبار تم انتخاب خمس عزلات بكتيرية هي (واحدة من التربة واخرى من امعاء الحشرات واخرى من اوراق الاشجار وواحدة من كرش المجترات والاخيرة من عزلات مياه المجاري) باعتبار انها الأكفأ في انتاج انزيم السليوليز لغرض استخدامها في الدراسات اللاحقة

ب- قياس فعالية انزيم السليوليز على الوسط الصلب والسائل

<u>اولا –</u> التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على انتاج انزيم السليوليز في الوسط الصلب

تم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيم السليوليز وذلك بتنمية العزلات قيد الدراسة على وسط اكار السليلوز (حيث تم تنمية كل عزلة بكتيرية على وسط اكار السليلوز الخاص بها تبعا لنوع المصدر المعزولة منه وحسب المصدر في مركز الطبق بدائرة قطرها ١سم وحضنت في درجة حرارة ٣٠ م° ولمدة ٣ ايام. كشف بعدها عن صفة تحليل السليلوز بغمر الوسط بمحلول اليود وترك الطبق لمدة ٥ – ١٠ دقائق ثم سكب المحلول، ملاحظة المنطقة الشفافة حول تلك المستعمرات يدل على تحلل السليلوز بواسطة انزيم السليوليز المنتج من قبل العزلات البكتيرية.

<u>ثانيا –</u> قياس فعالية انزيم السليوليز في الوسط السائل

تم قياس فعالية انزيم السليوليز في الوسط السائل حسب الطريقة التي وصفت من قبل (١٣) المتضمنة خلط او مزج ١.٥ مل من المادة الاساس (CMC%١ مذابة في ٠.٠٥ مولاري من محلول فوسفات الصوديوم المنظم pH 7) مع ٠.٥ مل من مستخلص الانزيم الخام ووضع التفاعل في حمام مائي هزاز لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧م° بعدها تم ايقاف التفاعل بإضافة ٣ مل من كاشف 3,5–DNS ومن ثم وضع الخليط في حمام مائي لمدة ٥–١٠ دقائق بدرجة حرارة ١٠٠م° ترك بعدها الخليط ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم قدر سكر الكلوكوز المختزل بعد قراءة العينات على طول موجي ٥٤٠ نانوميتر وقدرت كمية الكلوكوز الناتج من تحلل السليلوز بالرجوع الى منحنى الكلوكوز القياسي الذي حضر حسب الطريقة التي وصفت من قبل (١٤) حيث ان كل وحدة فعالية انزيمية واحدة تعرف على انها كمية الانزيم التي تتحرر من 1µmol من السكر المختزل في الساعة الواحدة في ظل ظروف الاختبار.

ج – تشخيص البكتريا

تم تشخيص العزلات البكتيرية الخمسة المنتجة لأنزيم السليوليز باستخدام الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتمادا على المصادر

العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا ولتأكيد التشخيص تم استخدام نظام (Api – Strep.، Api – Staph.، Api – 20E) و كذلك جهاز Vitek 2 system.

د – تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم السليوليز في وسط السليلوز السائل

لتحديد العوامل المؤثرة في انتاج الانزيم استخدم وسط السليلوز السائل المحور من قبل الباحث والمتكون من (10 gm CMC، 0.3 gm $MgSo_4.7H_2O$، 2 gm K_2HPo_4 ، 2.5 gm $(NH_4)_2So_4$ ، 0.04 gm $CaCl_2$، 10 gm Malt extract and 1 gm D–Glucose في لتر ماء مقطر مع ضبط الـ pH الى ٧) ووزع في دوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مل حيث وضع في كل منها ٥٠ مل من الوسط وتم استخدام معايير مختلفة شملت درجات الحرارة، الرقم الهيدروجيني، التهوية ومدة الحضن وكما يلي

- مدة الحضن.

اختبرت العزلات البكتيرية قيد الدراسة على الوسط السائل وبنفس الظروف من درجة حرارة (٣٧) م° ورقم هيدروجيني (٧) وسرعة دوران (١٥٠ دورة/دقيقة) ولأوقات حضن مختلفة (١٢، ٢٤، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠) ساعة

- الرقم الهيدروجيني

ضبط الرقم الهيدروجيني لوسط النمو وبنفس ظروف الزرع لمكونات الوسط ودرجة حرارة (٣٧ م°) وسرعة دوران (١٥٠ دورة / دقيقة) حيث تم اخذ مدى واسع من درجة الحموضة وكالآتي (٤، ٤.٥، ٥، ٥.٥، ٦، ٦.٥، ٧، ٧.٥، ٨، ٨.٥، ٩، ٩.٥، ١٠) ولمدة حضن ٤٨ ساعة باعتبارها هي الفترة المثلى لإنتاج الانزيم بعد تحديدها في الخطوة الاولى.

- درجة الحرارة.

اختبرت درجات حرارة مختلفة وهي (٢٠، ٢٥، ٣٠، ٣٥، ٤٠، ٤٥، ٥٠، ٥٥، ٦٠) م° لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج انزيم السليوليز في الوسط السائل.

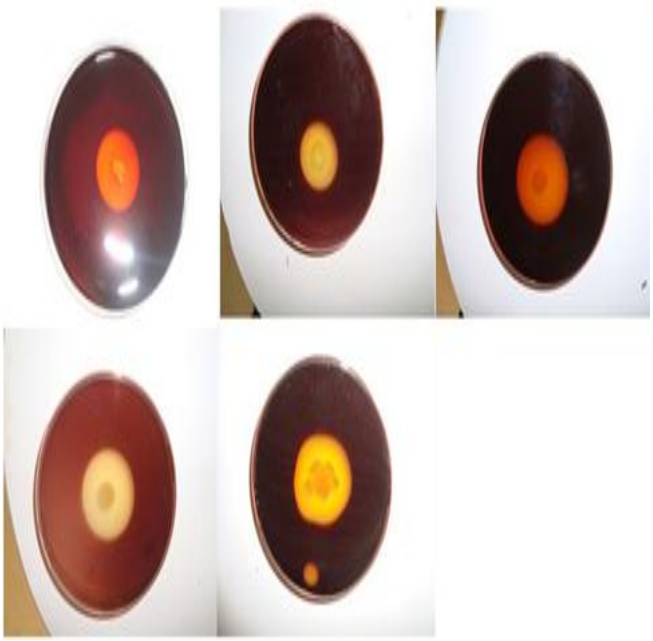
- سرعة الدوران او التهوية

لغرض اختبار تأثير سرعة الدوران على نمو العزلات البكتيرية قيد الدراسة لإنتاج انزيم السليوليز في الوسط السائل لقد استخدم عدد دورات مختلفة للحاضنة الهزازة وهي (٥٠، ١٠٠، ١٥٠، ٢٠٠) دورة/دقيقة.

النتائج والمناقشة

العزل

تم عزل وتشخيص خمس عزلات بكتيرية من بين ٩٥ عزلة بكتيرية محللة للسليلوز تم الحصول عليها من ١٨٠ عينة هي عينات (التربة، امعاء الحشرات، اوراق الاشجار، كرش المجترات ومياه المجاري) بعد إذ تباينت العديد من العزلات في قدرتها على تحليل السليلوز على اساس قطر المنطقة الشفافة النامية بعد زراعتها على اوساط السليلوز الصلبة المستخدمة في الدراسة وحسب مصدر العزل وبناءا على نتائج التحلل تلك فقد اختيرت خمسة عزلات فقط من عينات (التربة، امعاء الحشرات، اوراق الاشجار، كرش المجترات، ومياه المجاري) وبواقع عزلة واحدة لكل مصدر عزل حيث بلغت اقطار التحلل لها (٤٢، ٢٨، ٣٩، ٣٥، ٣٢) ملم على التوالي صورة (١).



صورة (١) اقطار تحلل السليلوز من قبل العزلات البكتيرية الاكفأ

وفي هذا المجال استطاع (٨) عزل البكتريا المحللة للسليلوز من التربة على اوساط زرعية خاصة بواقع سبع عزلات اختلفت كفاءتها في عملية التحلل. في حين استطاع (١٥) لحصول على ١١ عزلة بكتيرية محللة للسليلوز من مياه المجاري حيث كانت لها القدرة العالية على التحليل بشكل كبير جدا عند ٤٠م° وافضل قطر للتحلل كان عند ١٠ ايام. استطاع (١٠) الحصول على ٢٨ عزلة بكتيرية محللة للسليلوز من مجموع ٧٢ عزلة تم جمعها من اوراق الاشجار المتساقطة. في حين تمكن (١٦) من الحصول على ١٥ عزلة بكتيرية من امعاء المجترات لها القابلية على تحليل السليلوز.

Open Access
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (2) :47-55

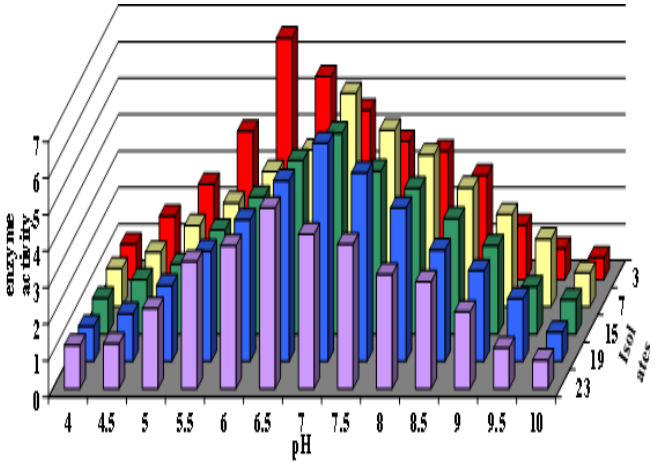
التشخيص

اظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام نظام Api Strep.)، Api Staph.، Api – 20E) وجهاز Vitek 2 system للعزلات البكتيرية الخمس المنتخبة كعزلات بكتيرية كفوءة في تحليل السليلوز والمعزولة من (التربة، امعاء الحشرات، اوراق الاشجار، كرش المجترات و مياه المجاري) انها تعود الى الاجناس البكتيرية *Staphylococcus sciuri*، *Streptococcus parasanguinis*، *Sphingomonas paucimobilis*، *Rhizobium radiobacter*، *Escherichia coli* وعلى التوالي وجاءت نتائج التشخيص هذه متوافقة مع نتائج العديد من الباحثين الذين استطاعوا عزل وتشخيص البكتريا المحللة للسليلوز فقد شخص (١٧) بكتريا *Sphingomonas sp.* كأكفاء عزلة بكتيرية محللة لسليلوز ومعزولة من التربة. في حين استطاع (١٨) من تشخيص بكتريا *Rhizobium radiobacter* المعزولة من مياه المجاري من بين ٨٠ عينة تم الحصول عليها كأكفاء عزلة بكتيرية محللة للسليلوز. اما (١٩) فقد شخص البكتريا المعزولة من كرش المجترات بانها تعود الى بكتريا *Bacillus licheniformis* والتي كانت مقاومة لدرجات الحرارة العالية ولحد ٥٠ م°. في حين شخص (١٠) بكتريا *Bacillus subtilis* التي عزلها من اوراق الاشجار المتساقطة واثبت انها افضل عزلة بكتيرية محللة للسليلوز من بين ٢٨ عزلة تم الحصول عليها من هذه الاوراق والتي كانت جميعها محللة للسليلوز.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج انزيم السليليلز

الرقم الهيدروجيني

درس تأثير تغير الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي السائل (المنتخب كأفضل وسط) لإنتاج انزيم السليوليز وبأرقام هيدروجينية مختلفة (٤، ٤.٥، ٥، ٥.٥، ٦، ٦.٥، ٧، ٧.٥، ٨، ٨.٥، ٩، ٩.٥، ١٠) وذلك من خلال قياس فعالية الانزيم المنتج في الوسط الزرعي السائل ويظهر من الشكل (١) ان افضل انتاجية للأنزيم بلغت ٦.٦٢٧ وحدة/مل عند الرقم الهيدروجيني ٦ وذلك باستخدام العزلة المحلية 3 *Staph. Sciuri* في حين بلغت الفعالية الانزيمية (٥.٨٥٧، ٥.٥١٨، ٥.٩٩٦) وحدة/مل للعزلات المحلية 7 *Strep. parasanguinis*، 15 *Sphingo. paucimobilis*، 19 *Rhizo. radiobacter*) على التوالي عند الرقم الهيدروجيني ٧، بينما اعطت العزلة المحلية *E. coli* 23 افضل انتاجية لأنزيم السليوليز عند الرقم الهيدروجيني ٦.٥ والتي بلغت ٤.٩٦٣ وحدة/مل، كما لوحظ ان افضل عزلة بكتيرية انتجت انزيم السليوليز وبمعدل فعالية عام بلغ ٣.٠٥٧ وحدة/مل هي العزلة المحلية 19 *Rhizo. radiobacter*، اما افضل رقم هيدروجيني تم عنده افضل انتاج للأنزيم هو ٧ وبمعدل بلغ ٥.٢٥٣ وحدة/مل.



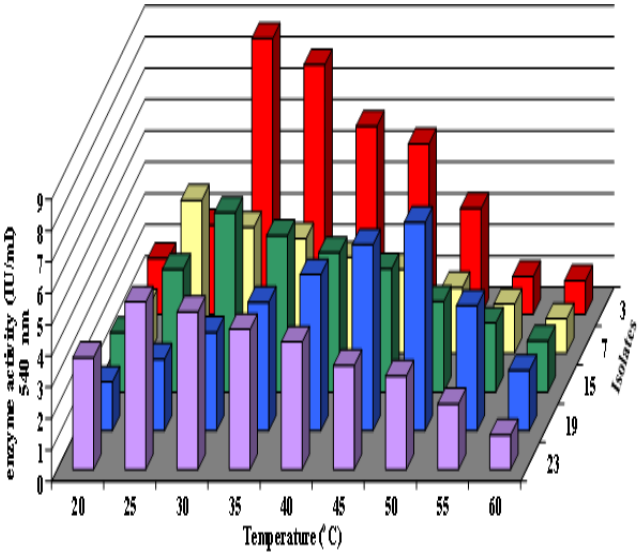
شكل (١) تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم السليوليز من قبل العزلات البكتيرية الخمسة قيد الدراسة.

حيث ان هذا التأثير للرقم الهيدروجيني في انتاج الانزيم متأتي من خلال تأثيره على الوسط الغذائي السائل (٢٠) وبالتالي تأثيره على عملية تحلل وانتاج الانزيمات (٢١) وهذه النتائج تتوافق الى حد ما مع ما وجده (٨) من ان افضل نشاط لانزيم السليوليز وجد عند الرقم الهيدروجيني ٧.٥. بينما ذكر (٢٢) ان افضل رقم هيدروجيني لإنتاج انزيم السليوليز هو ٧. اما (٢٣) فقد وجد ان الرقم الهيدروجيني ١٠ هو الافضل لإنتاج الانزيم. في حين بين (٢٤) ان افضل رقم هيدروجيني لانتاج انزيم السليوليز كان يتراوح ما بين(٨.٥– ١٠.٥) وبحسب العزلة المستخدمة. بينما (٢٥) وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم تراوح بين (٦.٥– ٧.٥). فيما ذكرا (٢٦) ان افضل انتاج للانزيم تحقق عند استخدام وسط CMC 1% وبرقم هيدروجيني تراوح (٤.٥–٥). وكل هذا يتوافق نوعا ما مع ما وجدناه من ان افضل pH لإنتاج انزيم السليوليز كان بين (٦–٧) وحسب طبيعة العزلة المدروسة والذي يعتمد على طبيعة المنطقة التي عزلت منها والظروف البيئية التي جرى بها البحث اضافة الى ظروف ومكان العمل.

درجة الحرارة

يظهر من الشكل (٢) تباين كفاءة العزلات البكتيرية الخمسة خلال مدة الدراسة في قدرتها على انتاج انزيم السليوليز في الوسط الزرعي السائل وتحت مستويات مختلفة من درجات الحرارة، اذ يظهر

وبعد ٤٨ ساعة من الحضن ان افضل درجة حرارة لإنتاج انزيم السليوليز للعزلتين المحليتين(3 *Staph. Sciuri*، 15 *Sphingo. Paucimobilis*) هي ٣٠م° اذ بلغت الفعالية الانزيمية (٨.٨١٤ و ٥.٧٣٤) وحدة/مل على التوالي ثم اخذت الفعالية بالانخفاض عند ٣٥م° وصولا لدرجة الحرارة ٦٠م°، اما بالنسبة لانتاج الانزيم من قبل العزلتين المحليتين (7 *Strep. parasanguinis*، 23 *E. coli*) فقد كانت افضل انتاجية لهما عند درجة حرارة ٢٥م° حيث بلغت الفعالية الانزيمية (٤.٨٨٩ و ٥.٣٥٤) وحدة/مل على التوالي، بينما كانت افضل درجة حرارية هي ٥٠م° لإنتاج انزيم السليوليز من قبل العزلة المحلية 19 *Rhizo. radiobacter* اذ بلغت الفعالية الانزيمية لها ٦.٦٥٦ وحدة/مل.



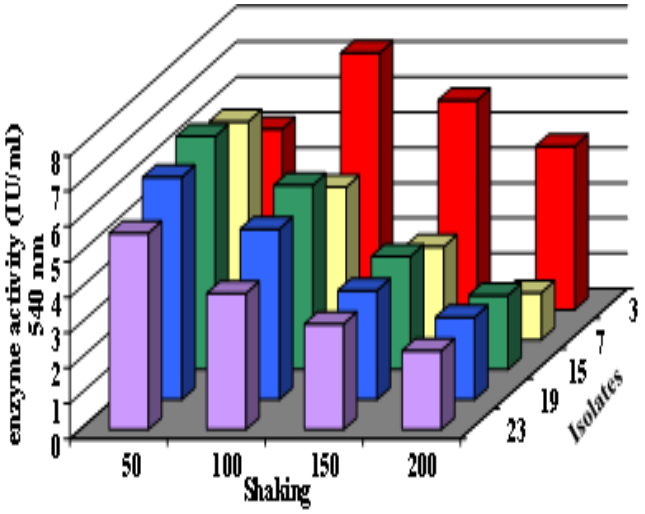
شكل (٢) تأثير درجات الحرارة في انتاج انزيم السليوليز من قبل العزلات البكتيرية الخمس.

ان الزيادة في انتاجية الانزيم بزيادة او انخفاض درجة الحرارة تتفق نوعا ما الى ما اشارت اليه الابحاث السابقة. اذ وجد (٢٧) ان افضل درجة هي ٤٠م° لانتاج انزيم السليوليز من عزلة *Clostridium thermocellum*. اما (٢٨) فقد وجد ان افضل درجة حرارية لانتاج انزيم السليوليز هي ٥٠م° بعد ٧٢ ساعة من الحضن. بينما استطاع (٢٩) من عزل بكتريا *Bacillus sbtilis* المنتجة لانزيم السليوليز حيث كانت درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم ٣٧م° عند ٣٦ ساعة من الحضن.

تنسجم نتائجنا مع ما توصلا اليه (٣٠ و ٣١) اللذان حصلا على افضل انتاج لأنزيم السليوليز عند درجة حرارة ٥٠م° وهذا منسجم مع ما حصلنا عليه للعزلة المحلية 19 *Rhizo. radiobacter* ويعزى السبب في زيادة انتاجية الانزيم مع زيادة الارتفاع بدرجة الحرارة الى تاثيرها على التفاعلات الانزيمية وسرعتها داخل الخلية. اما (٣٢ و ٣٣) فحصلا على افضل نشاط لعزلة الـ *Bacillus* عند درجة حرارة ٥٠م° لإنتاج انزيم السليوليز وهذا النشاط ينخفض او يتوقف في درجات الحرارة المنخفضة وهذا عائد الى بطأ نموها وتأخر تخليق الانزيم. بينما وجد (٣٤) ان افضل انتاج لأنزيم السليوليز حصل عند ٤٠م° باستخدام 1% CMC للعزلة البكتيرية *Bacillus thuringiensis*

التحريك والتهوية

تشير النتائج الموضحة في الشكل (٣) الى ان افضل انتاج لأنزيم السليوليز سجل عند استعمال ١٠٠ دورة/دقيقة وكانت الفعالية الانزيمية ٧.٢٦٥ وحدة/مل عند استخدام العزلة المحلية *Staph. Sciuri* 3، في حين كانت افضل انتاجية للانزيم عند عدد دورات ٥٠ دورة/دقيقة للعزلات المحلية (7 *Strep. parasanguinis*، 15 *Sphingo. paucimobilis*، 19 *Rhizo. Radiobacter*، *E. coli* 23) اذ بلغت الفعالية الانزيمية (٦.١٧٨، ٦.٥٩٧، ٦.٢٩٩، ٥.٥٦٦) وحدة/مل على التوالي:



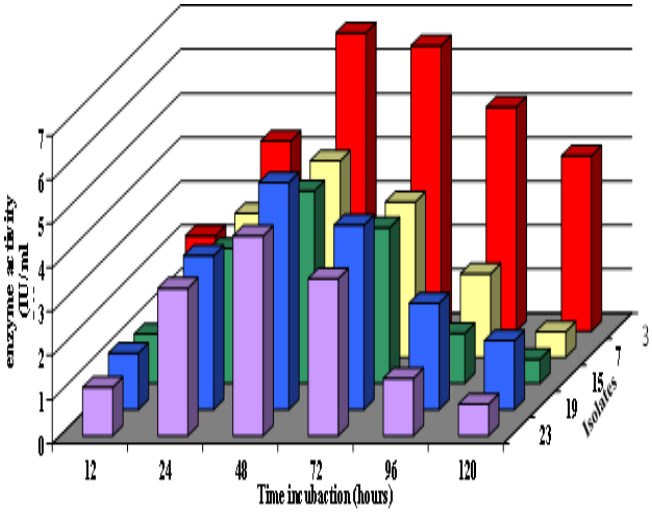
شكل (٣) تأثير التحريك والتهوية في انتاج انزيم السليوليز من قبل العزلات البكتيرية الخمس

تكمن اهمية التحريك والتهوية في المزارع السائلة الى توفير الاوكسجين الذائب للكائن الحي خاصة اذا كان من الاحياء المجهرية ذات التهوية الاجبارية وهذا يعد مهم حيث ان التحريك والتهوية تؤدي الى تجانس الوسط وزيادة المساحة المعرضة لها البكتريا (٣٥) وفي هذا السياق فقد حصل (٣٦) على افضل انتاج للانزيم عند استخدام حاضنة

هزازة بسرعة (١٥٠ و ٢٠٠) دورة/دقيقة. في حين وجد (٣٧) ان افضل انتاج للانزيم كان عند سرعة تحريك ٢٠٠ دورة/دقيقة. اما (٣٨) فقد ذكر ان التهوية مهمة جدا في زيادة نمو الخلية وبالتالي زيادة قابليتها على انتاج الانزيم.

مدة الحضن

يبين الشكل (٤) نتائج اختبار افضل مدد زمنية لانتاج انزيم السليوليز من قبل العزلات المحلية الخمسة التي تم الحصول عليها من مصادر مختلفة والتي اظهرت وجود تباين في مدى قدرتها على انتاج انزيم السليوليز خلال هذه المدد الزمنية المختلفة حيث نلاحظ ان انتاج الانزيم يزداد مع تقادم مدد الحضن فقد ظهر ان افضل انتاج تحقق للعزلات المحلية الخمسة (7 *Strep. parasanguinis*، 3 *Sciuri*، 15 *Sphingo. paucimobilis*، 19 *Rhizo. Radiobacter*، 23 *E. coli*) بعد ٤٨ ساعة من الحضن وبفعالية انزيمية (٦.٧٨٧، ٤.٤٦٨، ٤.٣٨٤، ٥.١٦٣، ٤.٥٤١) وحدة/مل على التوالي ثم انخفض انتاج الانزيم لهذه العزلات مع زيادة مدة الحضن ليصل اقل انتاجية بعد ١٢٠ ساعة من الحضن.



شكل (٤) تأثير مدد الحضن في انتاج انزيم السليوليز من قبل العزلات البكتيرية الخمس

وقد عزى (٢٤) ذلك الانخفاض في الفعالية الانزيمية مع تقادم مدة الحضن الى حصول تغيرات بيئية في وسط الانتاج فضلا عن امكانية حصول تحلل ذاتي للخلايا وما يرافق ذلك من اطلاق مواد ايضية تؤثر سلبا على انتاجية الانزيم. تقترب نتائج الدراسة الحالية مع نتائج بعض الباحثين الذين اكدوا على قدرة العزلات البكتيرية في انتاج انزيم السليوليز خلال مدد تحضين مختلفة اذ توافقت نتائجنا مع ما حصل عليه كل من (٢٥ و ٣١) من ان افضل انتاج لأنزيم السليوليز تحقق بعد ٤٨ ساعة من الحضن. اما (٣٠) فقد حصل على افضل انتاج للأنزيم بعد مدة حضن يومين وهذا منسجم مع ما حصلنا عليه. الا ان (٣٩) حصلا على افضل انتاج للأنزيم بعد مدة حضن ٧ ايام. اما (١٣) فقد وجد ان افضل فعالية للأنزيم كانت عند ٧٢ ساعة وبفعالية انزيمية بلغت ٣٠ وحدة/مل.

المصادر

1. Teymouri, F., Alizadeh، H., Laureano – perez، L., Dale, B. E. and sticklen، M. B. 2004, Effects of ammonia fiber explosion treatment on activity of endoglucanase from *Acidothermus cellulolyticus* in transgenic plant. Appl. Biochem. Biotechnol. 116: 1183 – 1192.
2. Maki, M., Leung, K.T. and Qin, W. 2009, the prospects of cellulose – producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. J. Biological Sciences 5(5): 500 – 516.
3. Levy, I., Shani, Z. and Shoseyov, O. 2002, Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo -1, 4-β-glucanase (E Gase) and cellulose binding domains (CBD). J. Biomol. Eng. 19:17 – 30.
4. Mohammadkazemi, F., Azin, M. and Ashori, A. 2015, Production of bacterial cellulose using different carbon sources andculture media. J. Carbo. Poly. 117. p: 518 – 523.
5. Zou, N. and Plank, J. 2015, Intercalation of cellulase enzyme into a hydrotalcite layer structure. J. Physics and Chemistry of Solids. 76. P: 34 – 39
6. Tonozuka, T., Yoshida, M. and Takeuchi, M. 2014, Enzymes for Cellulosic Biomass Conversion. Research Approaches to Sustainable Biomass Systems. p: 225 – 242.
7. Nagaraju, M., Narasimha, G. and Rangaswamy, V. 2009, impact of sugar industry effluents on soil

growth of cellulolytic bacteria in the rumen. J. Microiological Ecol. 67: 183 – 197.

17. Chen, H. J., Chang, H. J., Fan, C., Chen, W. H. and Lee, M. S. 2011, Screening, isolation and characterization of cellulose biotransformation bacteria from specific soils. j. International Conference on Environment and Industrial Innovation**.** vol. 12، p: 216 – 220.
18. Nakayama, M., Nakajima – kambe, T., Katayama, H., Higuchi, K., Kawasaki, Y. and Fuji, R. 2008, High catalase production by *Rhizobium radiobacter* strain 2 – 1. J. Bioscie. Bioengi. 106 (6) : 554 – 558.
19. Fujimoto, N., Kosaka, T., Nakao, T. and Yamada, M. 2011, *Bacillus licheniformis* Bearing a High Cellulose-Degrading Activity, which was Isolated as a Heat-Resistant and Micro- Aerophilic Microorganism from Bovine Rumen. J. The Open Biotechnology. 5. P: 7 – 13.
20. Chung-Yi, W., Yi-Ru, H., Chang-Chai, N. G., Helen, C., Hsin-Tang, L., Wen- Sheng, T. and Yuan-Tay, S. 2009, Purification and Characterization of a novel halostable cellulose from Salinivibrio sp. strain NTU-05. Enzyme and Microbial Technology-ELSEVIER, 44: 373-379.
21. Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P. and Palavesam, A. 2006, Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Int. J. Env. Sci. Technol, 3, 25 – 34.
22. Balamurugan, A., Jayanthi, R., Nepolean, P., Vidhya, P. R. and premkumar، R. 2011, Studies on cellulose degrading bacteria in tea garden soils. Afr. J. plant. Sci. 5(1): 22 – 27.
23. Sonia, S., Aparna D., Gupta, B. L. and Saksham, G. 2013, Optimization of Cellulase Production from cellulose activity. J. Int. Biodeter. Biodegr. 63:1088 – 1092.
8. Muhammad, I., Safdar, A., Quratulain, S. and Muhammad, N. 2012, Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. Turkish Journal of Biochemistry. 37(3): 287–293.
9. Pratima, G., Kalpana, S. and Avinash, S. 2012, Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. Int. J. Microbiology. p: 1 – 5.
10. Ardhiani, K. H., Nungki, A. P. K. and Endang, S. S. 2013, Role of Bacteria and Mold as Agent Plant Litter Composting. J. Biological and Environment Sciences : 73 – 76.
11. Puspita, L., Eko, S., Niken, F. G. and Wiwik, R. 2012, Isolation and Characterization of Cellulase Produced by Cellulolytic Bacteria from Peat Soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera. Int. J. Environ. And Bioene. 3 (3) : 145 – 153.
12. Kasing, A. and Sarawak, 1995, cellulase production. National center for Biotechnology Eduction.
13. Saraswati, B., Ravi Kumar, M., Makesh Kumar, D. J., Balashanmugam, P., Bala Kumaran, M. D. and Kalaichelvan, P. T. 2012, cellulose production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. Archives of Applied Science Research. 4(1): 269 – 279.
14. Adney, B. and Baker, J. 1996, Chemical Analysis and Testing Task, Measurement of Cellulase Activities. P: 1 – 9.
15. Murray, W. D., Sowden, L. C. and Colvin, J. R. 1984, Bacteroides cellulosolvens sp. nov. a Cellulolytic Species from Sewage Sludge. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 34, no. 2, p: 185 – 187.
16. James, B. R., Richard, E. M. and paul, J.W. 2009, Quantitative analysis of cellulose degradation and

32. Harshvardhan, K., Mishra, A. and Jha, B. 2013, Purification and characterization of cellulase from a marine Bacillus sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. j. Molecular Catalysis B: Enzymatic. 93، p: 51– 56.
33. Sadhu, S., Saha, P., Sen, S. K., Mayilraj, S. and Maiti, T. K. 2013, Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from Bacillus strain isolated from cow dung.j. SpringerPlus. 2: 10.
34. Lin, L., Kan, X., Yan, H. and Wang, D. 2012, Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. Electron. J. Biotechnol. 1 – 7.
35. الخفاجي ، زهرة محمود (٢٠٠٨). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزئية) ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، بغداد
36. Abou-Taleb, K. A. A., Mashhoor, W. A., Nasr, S. A., Sharaf, M.S. and Abdel-Azeem, H. H. M. 2009, Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. Aust. J. Basic & Appl. Sci., 3(3): 2429-2436.
37. Ferreira، J. R., Davallillo, Chandler, C., Paez, G., Marmoly, Z. and Ramones, E. 2004, Microbial Protein Production from Waste of Sugar Cane Processing (bagas septic) Arch. Latinoam. Prod. Anim. 12 (2) : 59 – 65.
38. Li – Liu, Zhi – Ping, W., Jie, Y., and Wei – Min, C. 2009, The Effects of different aeration Patterns on aerobic granulation.J. Environmental and Pollution. 37(1) 5 – 19.
39. Fagade, O. E. and Bamigboye, O. O. 2012, Effect of cultural conditions on the cellulase activity of bacteria species isolated from degrading corn cob. Arch. Appl. Sci. Res. 4 (6) : 2540 – 2545.
Bacteria Isolated from Soil. ISRN Biotechnology. P : 1 – 7.
24. الراوي، ظافر فخري عبد القادر (٢٠٠٤) عزل وتشخيص البكتريا المحللة للسليلوز ودراسة بعض الخصائص الانزيمية، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الانبار.
25. Vipul, V., Alpika, V. and Akhilesh, K. 2012, Isolation & production of cellulase enzyme from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi, Uttar Pradesh, India. Adv. Appl. Sci. Res. 3 (1) : 171 – 174.
26. Goyal, M. and Soni, G. 2011, Production and characterization of cellulolytic enzymes by Pleurotus florida. Mycosphere. 2 (3) : 249–254
27. Otajevwo, F. D. and Aluyi, H. S. A. 2011, Cultural condition necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacteria organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. J. Canadian center of Science and Education، vol. 5، no. 3، p : 141 – 146.
28. Rai, P., Tiwari, S. and Gaur, R. 2012, Optimization of Process Parameters for Cellulase Production by Novel Thermotolerant Yeast. j. BioResources. 7 (4): 5401-5414.
29. Yin, L. J., Lin, H. H. and Xiao, Z. R. 2010, Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. J. Marine Science and Technology, Vol. 18, No. 3, pp. 466-471.
30. Rathnan, R. K., Gopal, S., Thomas, M. and Antony, S. 2012, Effective utilization of an aquatic weed Salvinia Molesta as a substarte for the production of Cellulase Enzyme –Eradication through utilization. Inte. J. of Enviro. Sci. Vol. 3, No.1, p: 36 – 43.
31. Mukhtaruddin, M. T., Alam, Z. and Salleh, M. H. 2012, Characterization of Purified Cellulase from Fermentation of Sewage Sludge. Aust. J. Basic & Appl. Sci. 6 (1) : 74-78.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (2) :47-55

Abstract

One hundred eighty samples were collected from (soil, insect intestine, leaves, stomach of ruminants, and sewage water) and only five isolates were selected depend on its ability to lyses cellulose and they were one from each isolation source، the selected isolates were belonged to (*Staphylococcus sciuri* ،*Streptococcus parasanguinis* ، *Sphingomonaspaucimobilis* ،*Rhizobium radiobacter* ،*Escherichia coli*) with lyses zone (42,28,39,35,32 mm respectively). The PH effect change showed that best activity for cellulase enzyme was 6.627 IU/ml at PH 6 when local isolate *Staph. Sciuri* was used, and the enzyme activity were 5.857,5.518,5.996 IU/ml for *strep. parasanguinis* ، *Sphingo. paucimobilis* ،*Rhizo. Radiobacter* respectively at PH 7, while local isolate *E. coli* gave best cellulase activity at PH 6.5 reached to 4.963 IU/ml. Efficiency of five isolates were varied in their ability of cellulase activity in liquid media under different temperature, best activity of enzyme for local isolates *Sphingo. Paucimobilis* and *Staph. Sciuri* 30 C°, while best enzyme activity was recorded at 25C° for local isolates *Strep. Parasanguinis* and *E. coli*, and optimum temperature for enzyme production for *Rhizo. Radiobacter* was 50 C°. Also aeration and agitation effect was studied for their effect on cellulase activity, and the results showed increasing in activity of enzyme at 50 rpm in local isolates *Strep. parasanguinis* ،*Sphingo. paucimobilis* ،*Rhizo. Radiobacter* and *E. coli* while the best enzyme activity for *Staph. Sciuri* was at 100 rpm. Results also shown that the best productivity of enzyme was after two days of incubation for all isolates.