جداسازی یک سویه سلولوموناس از روده کرم ابریشم و ارزیابی فعالیت اندوگلوکنازی 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 دردمای 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 اندوگلوکنازی 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، اندوگلوکناز

مقدمه

موجودات زیادی در طبیعت سلولز را جهت تامین نیاز کربنی و انرژی خود انتخاب نموداند چراکه سلولز زنجیره پلیمری قابل تجزیه از گلوکز است که در آن زیر واحدهای گلوکز بوسیله پیوندهای بتا - ۱ و ۴ - گلوکوزیدی بهم متصل شده‌اند. 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 ، ٦). کرم ابریشم[1] 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 ، مالتوز و پکتین را نیز شامل می شود .فیبر خام شامل سلولز ، پنتوزان و لیگنین است . ولی اینها بوسیله لارو کرم ابریشم قابل هضم و جذب نیستند (۲). از طرفی امروزه سلولاز در روده‌های کرم ابریشم برگخوار مشخص شده است . منبع سلولاز را در حشرات به میکرو ارگانیسمهای همزیست نسبت می دهند (۸،٦،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 - اندوگلوکناز[2] است که با حمله به انتهای غیر احیای سلولز ، برای آنزیم بعدی سیستم یعنی بتا - ۱ و ۴ - اگزوگلوکناز[3] ،محل اثر ایجاد میکند . انواعی از آنزیم اخیر ، سلوبیوز را از سلولز آزاد می کنند . در نهایت آنزیم بتا ۱ - و ۴ - گلوکوزیداز[4]،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)

می کند (۳). سویه جدا شده مورد مطالعه دارای سیستم آنزیمی ذکر شده‌است .دراین پژوهش جداسازی‌یک سویه سلولوموناس[1] 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 قرارداده شدند .پس از طی مراحل رشدی و پوست اندازی آنها ،روزانه چند کرم بالغ بطور اتفاقی انتخاب واز روده آنها در شرایط استریل نمونه‌گیری به عمل آمد . نمونه های همگن شده از روده و همولنف خارج شده در یک محیط سلولز آگار در دمای ۳۰C کشت داده شدند (۴).کلنیهای ظاهر شده ،خالص گردید و خواص ریخت شناسی وفیزیولوژیک باکتریها مورد بررسی قرارگرفت .کلیه عملیات دوبار در سالهای ۱۳۷۵ و ۱۳۷۶ انجام گردید .

– شمارش باکتری جدا شده

در حین جداساز ی نکته‌ایکه 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 برگی[2] و باتوجه به خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیک آن انجام گرفت (۱۲ و۷).

– 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 سانتریفوژ یخچالدار با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه مایع رویی[3] عاری از سلول تهیه و جهت سنجش فعالیت اندوگلوکنازی استفاده شد . سنجش فعالیت آنزیمی طبق دو روش استاندارد یکی به روش DNS[4] و دیگری روش پلیتی انجام شد (۱۱ و ۱۰). باروش پلیتی 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[5] 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٪[6] باpH برابر ۷ بمیزان ۱٪ (حجم به حجم)تلقیح وبمدت یک هفته در گرمخانه شیکردار در دمای ۳۰c قرارداده شد .طی آن روند رشد با نمونه گیریهای متعدد در فواصل زمانی مختلف و خواندن جذب نوری در ۶۰۰ nm 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 هاهمانند 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 کره‌ای و حاشیه صاف وقطر ۲ تا ۲/۵ میلیمتر می باشد قابل جداسازی است .

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

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)

	ریخت شناسی	وجود بیسلیوم	رنگ آمیزی	نیازمندی به اکسیژن	حرکت	کاتالاز	زیستگاه	فعالیت سلولازی
سلولوموناس	میله ای بینظم			بیهوازی			خاک و مواد	
	بعضی	-	b+	اختیاری	D	+	در حال تجزیه	+
باکتری	کوکوسی			بیهوازی			روده کرم	+
جداشده	میله ای بینظم	-	b+	اختیاری	-	+		
	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 .

با توجه به خصوصیات بیوشیمیائی جنسهای مزبور و با توجه‌به خصوصیات شاخص باکتری جدا شده یعنی ریخت شناسی سلولی (میله ای نامنظم ،بعضی کوکوس)، عدم وجود هیف انشعابی وسیع وسهولت 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 و۷). این سویه را sw97نامگذاری 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 $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ - ۱ 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

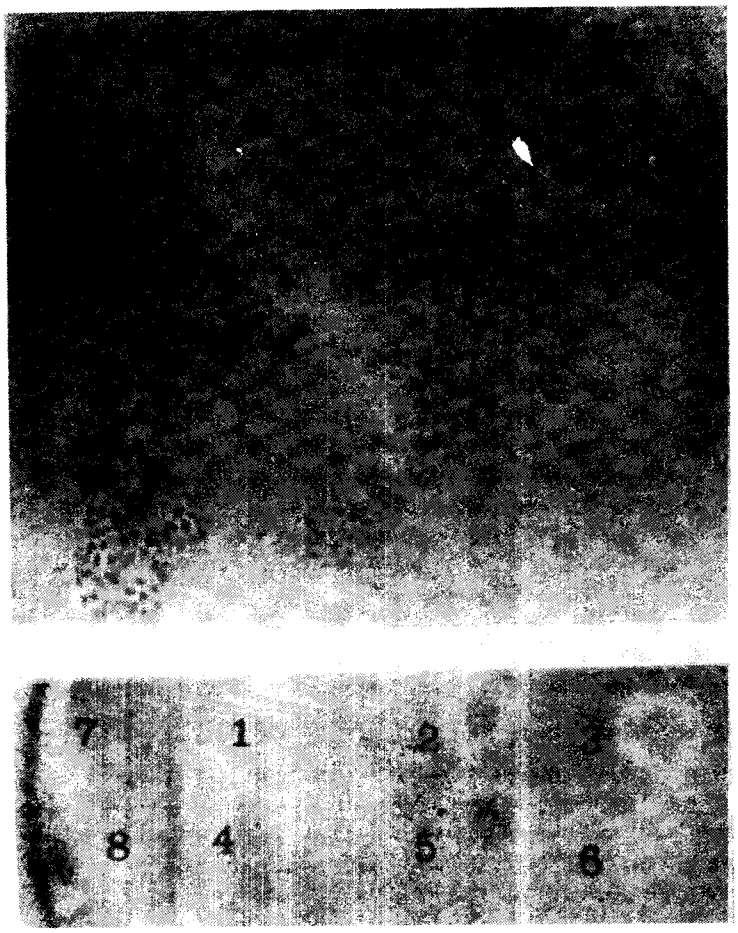
همانطور که قبلا ذکر شد بررسی فعالیت اندوگلوکنازی سویه جداشده به دو روش DNS و پلیتی انجام گرفت . مزیت روش پلیتی این است که با مقدار کمی محلول آنزیمی (مثلا ۵۰ میکرولیتر)در یک زمان می توان وجود یا عدم وجود فعالیت آنزیمی چند باکتری جدا شده را در یک پلیت با حداقل امکانات بررسی کرد.همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می شود محل اثر فعالیت بصورت هاله بیرنگ در زمینه تیره محیط قابل رویت است . بر این اساس سویه sw97 در محیط سلولز و کربوکسی متیل سلولز فعالیت اندوگلوکنازی نشان می‌دهد . محلهایی که بصورت هاله تو خالی است محلول رویی محیط کشت عاری از باکتری و محلهایی 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

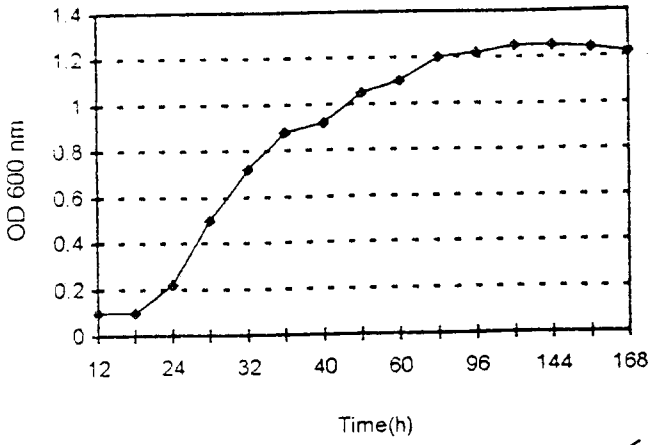
جداسازی سویه سلولوموناس از روده کرم ابریشم طی دو سال مجزا از دو سری کرم مجزا مبین آن است که روده کرم ابریشم شرایط لازم برای زیست باکتری مزوفیل بیهوازی اختیاری همانند باکتری‌تجزیه کننده سلولز موجود در روده کرم است اما می توان گفت در شرایط عمل شده سویه sw97یکی از باکتریهای موجود و احتمالا منبع سلولاز شیر 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 دستگاه گوارش کرم ابریشم است . بگویین و ایسن نیز قبلا خواص سلولازی یک گونه سلولوموناس جدا شده از مجرای گوارشی کرم خاکی را بررسی کرده بودند (۴). ملکزاده 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



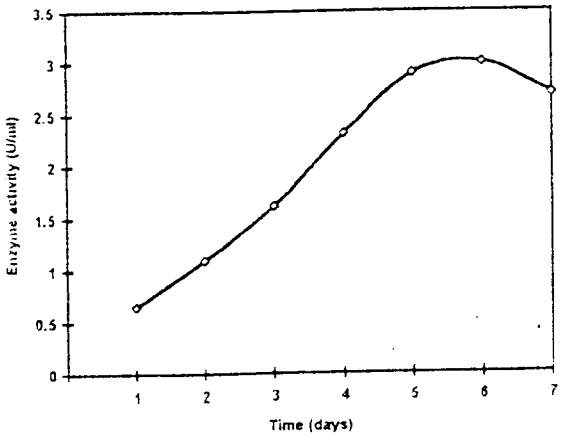
الف

ب

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



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



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

دیگری که به صورتی با خاک در ارتباط هستند) می تواند زیستگاه اکولوژیک سلولوموناس باشد . از این جنبه که آیا سویه جدا شده می‌تواند در برآوردن نیاز های 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 ، احتمالا 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 ابریشم نیز از لحاظ وجود یا عدم وجود فعالیت آنزیم سلولاز مورد بررسی قرار گرفت که با این روش فعالیتی 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 .

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ . بافری زنوز. ا. ۱۳۷۲. اصول مورفولوژی و فیزیولوژی حشرات . انتشارات دانشگاه تهران . ۳۱۹.

۲ . جوانشیر .ک . ۱۳۷۴. توت برای ابریشم و ابریشمهای بدون توت . انتشارات دانشگاه تهران . ٦٦ - ۲٦۳ .

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. (sw97[1])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.