فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی
شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه۳۳ تا ۳۹

جداسازی باکتریهای هوازی تجزیه کننده سلولز از دستگاه گوارش کرم خاکی معمولی (*Lumbricus terrestris*) و بررسی فعالیت اندوگلوکنازی آن ها

جعفر همت[۱]،سودابه کریمی[۲]،علی اکبر حداد مشهد ریزه[۳]
۱- سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده بیوتکنولوژی. J:.Hemmat@gmail.com
۲- پارک علم وفناوری یزد
۳-دانشگاه فردوسی مشهد پست الکترونیک

تاریخ دریافت:۹۱/۸/۱۹ تاریخ پذیرش:۹۱/۸/۳۰

چکیده

به منظور بررسی بوم شناختی باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری آبکافت کننده سلولز دستگاه گوارش کرم خاکی و جداسازی باکتری یا باکتری‌های با فعالیت اندوگلوکنازی از روده کرم خاکی، نمونه گیری انجام شد. طی غربال‌گری باکتری های تجزیه کننده سلولز، یک سویه سلولوموناس که به لحاظ تعدادی، غالب باکتری های جدا شده را تشکیل می‌داد و دو سویه باسیلوس با تعداد محدود که فعالیت اندوگلوکنازی نشان دادند، جدا گردیدند. تعداد مشابه شمارش شده در مورد سلولوموناس جدا شده از کرم خاکی با نتایج گزارش شده قبلی در مورد سلولوموناس کرم ابریشم قابل توجه است چرا که هر دو حدود $n\times10^4$ باکتری را نشان دادند. به عبارتی سلولوموناس سویه مشترک تجزیه کننده دو کرم است. گرچه زیستگاه و تغذیه آن ها متفاوت است. سویه غالب و دو سویه دیگر در محیط سلولز مایع حداکثر فعالیت(به ترتیب ۲/۱ U/ml، ۰/۹U/ml و ۲/۹ U/ml) را در روز ششم نشان دادند. کشت همزمان با سلولوموناس همراه باسیلوس‌های معدود جدا شده نه تنها تضاد عملکردی نشان نداد بلکه با بهینه سازی شرایط، به طور معنی داری فعالیتی حداقل معادل مجموع فعالیت کشت جداگانه آن‌ها نشان داد. لذا سلولوموناس یک باکتری همزیست در این دو کرم تغذیه کننده از سلولز است و ممکن است منبعی برای سلولازهای آن‌ها باشد. با توجه به مقدار قابل توجه پروتئین سویه سلولوموناس و غالب بودن این سویه از لحاظ کمی، می‌تواند این سویه علاوه بر منبع آنزیمی منبع پروتئینی نیز برای کرم ایفاء کند.

واژه های کلیدی: کرم خاکی معمولی، سلولوموناس، اندوگلوکناز، کشت همزمان

مقدمه

سلولز فراوانترین پلیمر طبیعی تجدید پذیر قابل دسترس است لذا موجودات زنده زیادی از جمله برخی کرم های گیاه‌خوار همانند کرم ابریشم یا مرتبط با مواد سلولزی ازجمله کرم خاکی از آن به عنوان منبع ماده وانرژی استفاده می‌کنند. آبکافت زیستی این پلیمر طبیعی به واسطه ساختار فیزیکوشیمیایی خاص آن، نیازمند وجود سه نوع آنزیم است که به طور هم افزا آنرا تا سطح تک واحد تشکیل دهنده آن یعنی گلوکز آماده مصرف کنند. این سه نوع آنزیم اندو گلوکناز، اگزو گلوکناز و بتاگلوکوزیداز می-باشند(۱). میشرا چهار گونه کرم خاکی را از لحاظ فعالیت سلولازی مقایسه و میزان آنرا در آن‌ها متفاوت گزارش نمود. او بیشینه فعالیت سلولازی و پروتئازی را در ناحیه خلفی روده کرم گزارش کرد(۵). تاثیرروده بر تعداد کلی باکتری عبوری از جمله باکتری‌های گرم منفی از لوله گوارش کرم‌های خاکی لومبریکوس توسط پدرسن گزارش شد(۶). وین سسلا و همکاران به منظور تعیین منشاء سلولازهای روده کرم خاکی *ایسینیا فتیدا* بافتهای دیواره قسمت‌های مختلف را ضد عفونی کرده و در شرایط درون

شیشه‌ای،کشت داده و فعالیت سلولازی آن‌ها را بررسی کردند. آن ها فعالیتاندوگلوکناز واگزوگلوکناز را در دستگاه گوارش کرم مشخص کردند. این امر مبین این است که این آنزیم عمدتاً توسط میکروارگانیسم‌های همزیست تولید می‌شود و به نوعی برای آبکافت سلولز وجود هم افزایی را بین آنزیم‌های سلولی و میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده سلولز به صورت فرضیه ارایه نمودند(۱۰). ایریا تاثیر کرم خاکی ایسینیا فتیدارا روی خصوصیات بیوشیمیایی خاک همچنین فعالیت آنزیم‌های خاک اثبات کرد. در مطالعه‌ای دیگر او و همکارانش تاثیر کرم خاکی ایسینیا فتیدا را در تحریک رشد قارچ و افزایش میزان تجزیه سلولز طی فرایند کمپوستی شدن بوسیله کرم را بررسی نمودند. در حضور این کرم، تجزیه سلولز به طور معنی دار افزایش نشان داده است اما دخالت و مشارکت مستقیم معنی دار نبوده است. گر چه حضورش باعث افزایش توده زیستی میکروبی و فعالیت آنزیمی (سلولازی و بتا گلوکوزیدازی) می‌گردد. جالب آنکه چون قارچ ممکن است بخشی از رژیم غذایی کرم خاکی باشد، فعالیت کرم، رشد قارچی را طی تولید کمپوست کرمی نشانه می‌گیرد. آن ها پیشنهاد کرده‌اند که این فعالیت یک فرایند کلیدی است که به تجزیه کاراتر و شدیدتر ضایعات آلی منجر می‌گردد(۲، ۳).

قبلا یک گونه *سلولوموناس* جدا شده از دستگاه گوارش ابریشم گزارش و خواص اندوگلوکنازی و اگزو گلوکنازی آنرا بررسی شده است(۱). در این پژوهش جهت بررسی بوم شناختی باکتری های تجزیه کننده سلولز دستگاه گوارش یک نوع کرم خاکی ایران و باکتری های دخیل احتمالی در فرایند آبکافت تر کیبات سلولزی و معرفی باکتری های مولد آنزیم نسبت به جداسازی و مطالعه باکتری های تجزیه کننده سلولز اقدام گردید.

مواد و روش ها

جداسازی، خالص سازی و شمارش سویه ها

کرم های خاکی معمولی از خاک مناطق باغات کشاورزی و فضای سبز شهر یزد برداشت و جهت جداسازی باکتری ها استفاده گردید. برای این منظور، کرم ها درآب استریل شده شسته شده و در پتری‌دیش‌استریل واجد رطوبت کافی قرارداده شدند. پس از استریل سطحی بدن آن‌ها به طریق استریل دستگاه گوارش کرم ها خارج گردید و روده میانی آن هاجداگردید. روده‌ها به سرم فیزیولوژیک استریل منتقل و در آن همگن سازی قطعات انجام گردید. توالی رقت 10^{-3} تا 10^{-10} از مایع یکنواخت شده دستگاه گوارش تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر آن پس از تهیه رقت در محیط سلولز آگار کشت داده شد. محیط کشت واجد 0.25% (w/v) yeast extract, 0.5% K_2HPO_4, 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.06% $(NH_4)_2$ SO_4 1.0% carboxymethyl cellulose (CM)بود. نمونه‌ها در گرم‌خانه ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت چهار روز نگهداری و پس از ظهور پرگنه‌ها نسبت به شمارش و خالص سازی آن‌ها اقدام گردید.

شناسایی سویه ها

شناسایی سویه ها باکتری طبق کتاب مرجع شناسایی و طبقه بندی باکتری ها برگی انجام شد(۹).

بررسی خصوصیات اندوگلوکنازی سویه‌ها

پرگنه های خالص شده به ارلن‌های محتوی محیط کشت دارای کربوکسی متیل سلولزبه عنوان منبع کربن با pH معادل ۷ تلقیح و تا شش روز دردمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرم‌خانه گذاری و با سر عت ۱۷۵ rpm شد. جهت مقایسه کمی فعالیت مایه تلقیح با OD مشابه استفاده شد. در پایان پس از تهیه مایع رویی محیط کشت میزان فعالیت بر اساس میزان قند احیای آزاد شده و به روش دی-نیتروسالیسیک‌اسید (DNS) سنجش شد(۲،۱). واحد آنزیمی (U/ml) معادل مقدار آنزیمی است که ۱ میکرو مول قند احیائ را طی ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد از سوبسترا آزاد می کند.

بررسی روند تولید اندوگلوکناز سویه‌ها

جهت روند تولیدآنزیمی سویه های جداشده برای هرسویه طی شش روز، تولید آنزیم اندوگلوکناز در محیط مایع در گرم‌خانه هوادهی و بررسی گردید. شرایط کشت و سنجش فعالیت همانند مورد فوق بود.

کشت همزمان دو سویه جداشده

جهت بررسی و شبیه سازی همزیستیِ حالت هم افزاییِ

احتمالی سویه‌ها در روده کرم خاکی، فعالیت سویه های جدا شده به همراه هم در محیط کشت مایع سلولز همچنین کشت جداگانه آن ها طی پنج روز مقایسه گردید. برای این هدف دو سویه w2 و ew1 به نسبت حجمی و شرایط رشدی یکسان به تنهایی و همراه هم به محیط کشت سلولز مایع تلقیح و گرم‌خانه گذاری شدند و روز پنجم میزان فعالیت اندوگلوکنازی محیط سنجش شد. همین رویه نسبت به دو سویه ew3 و ew1 اعمال گردید.

نتایج و بحث

مشاهده وبررسی کلنی های ظاهر شده در روی محیط کشت سلولز آگار و خالص سازی آن ها از کرم‌های مختلف به شناسایی سه باکتری تجزیه کننده سلولز منجر شد که یکی غالب (ew1) و بقیه(ew2 و ew3) تعداد معدودی را شامل می‌شدند. سویه غالب ew1 $۶/۲۵ \times ۱۰^{۴}$ واحد زنده تشکیل دهنده پرگنه (CFU) در واحد حجم میلی لیتر مایع همگن شده نمونه‌گیری شده قابل جدا سازی بود و بقیه بین $۱ - ۳ \times ۱۰^{۲}$ واحد زنده تشکیل دهنده پرگنه متغییر بودند.

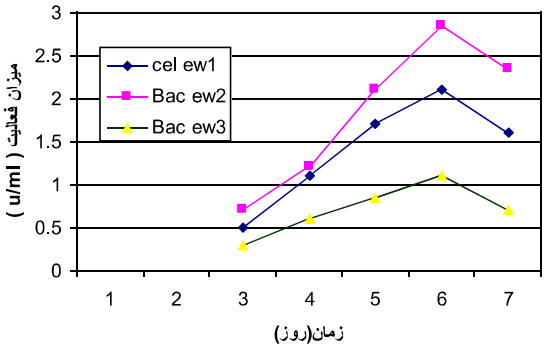
شناسایی سویه ها

براساس خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیک و کتاب مرجع باکتری شناسی برگی کلنی غالب سویه سلولوموناس،فیمی و سویه‌های دیگر باسیلوس پومیلیس تشخیص داده شدند(۹).

تولید اندوگلوکناز در رابطه با زمان

از آنجاییکه تمام سویه‌های جدا شده دارای فعالیت اندوگلوکنازی بودند الگوی تولید آن ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. گر چه به لحاظ کمی یکسان نبودند اما طی شش روز مقایسه شده از الگوی تقریباً یکسانی تبعیت می کردند و بین روز پنجم و ششم حداکثر فعالیت اندوگلوکنازی را نشان دادند (نمودار۱).

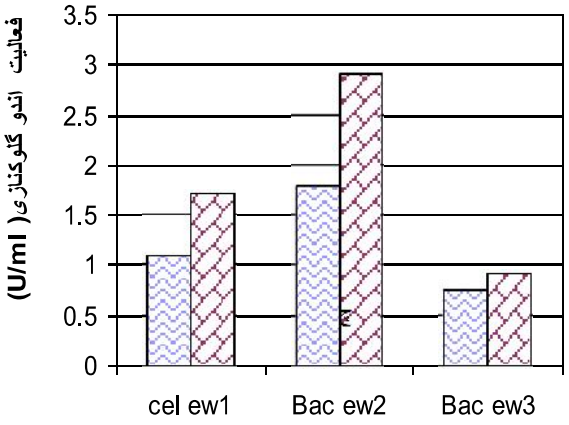
نمودار ۱- بررسی و مقایسه فعالیت اندوگلوکنازی سویه‌های جدا شده از کرم خاکی طی شش روز. سلولوموناس جدا شده (Cel ew1) و دو باسیلوس جدا شده (Bac ew2 و Bac ew3).



سنجش مقایسه‌ای فعالیت اندوگلوکناز

تمام سویه های جدا شده دارای فعالیت اندوگلوکنازی بودند گر چه به لحاظ کمی یکسان نبودند اما بر اساس نتایج قبلی روز چهارم و ششم به عنوان معیار مقایسه اولیه سنجش فعالیت اندو گلوکنازی انتخاب شد. براین اساس Bac ew2 و بیشترین فعالیت و Bac ew3 کمترین و سلولوموناس Cel ew1 در حد واسط آن ها فعالیت اندو گلوکنازی نشان داد (نمودار۲).

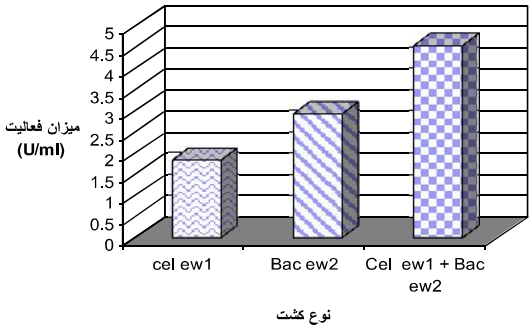
نمودار ۲- بررسی و مقایسه فعالیت اندوگلوکنازی سویه‌های جدا شده از کرم خاکی در روز های چهارم و ششم. سلولوموناس جدا شده (Cel ew1) و دو باسیلوس جدا شده (Bac ew2 و Bac ew3).



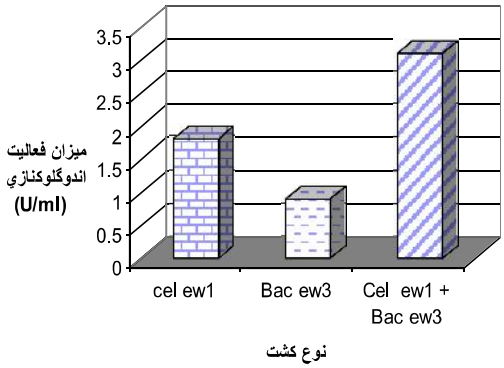
کشت هم‌زمان دو سویه

کشت جداگانه سویه سلولوموناس Cel ew1 و باسیلوس Bac ew2 در پایان روز پنجم به ترتیب فعالیتی معادل ۱/۷ و ۲/۹ واحد آنزیمی در واحد حجم نشان داند. در حالیکه کشت هم-زمان آن ها فعالیتی تقریبا معادل مجموع آن ها و برابر ۴/۴۲ واحد آنزیمی نشان داد. بنابراین ضمن اینکه دو سویه تضادی از نظر عملکرد ی نشان ندادند هم افزایی آنزیمی را در آبکافت سلولز نشان می‌دهند (شکل۳). در مورد کشت جداگانه و کشت مخلوط Cel ew1 و (Bac ew3 به ترتیب ۱/۷ و۹/ ۰و مجموع ۳/۱)گرچه مقدار کل فعالیت آنزیمی کمتر از حالت قبل بود ولی تضاد عملکردی مشاهده نشد و شدت هم افزایی اندکی بیشتر از مورد ew1و ew2 بود (شکل ۴).

نمودار ۳- بررسی و مقایسه فعالیت اندوگلوکنازی سویه‌های جدا شده ازکرم خاکی در روز پنجم در کشت جدا گانه و همزمان. سلولوموناس جدا شده (Cel ew1) و باسیلوس جدا شده (Bac ew2).



نمودار۴- بررسی و مقایسه فعالیت اندو گلوکنازی سویه های جدا شده از کرم خاکی در روز پنجم در کشت جدا گانه و همزمان. سلولوموناس جدا شده (Cel ew1) و باسیلوس جدا شده(Bac ew3).



با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان دستاوردهای کاربردی بدست آورد.

سلولز فروانترین ماده آلی موجود در طبیعت به عنوان منبع کربن و انرژی مطمئن و همیشه در دسترس و اولویت اول زنجیره غذایی مصرف کننده بوده وهست. از اینرو میکروارگانیسم‌ها و ارگانیسم‌های متعددی تلاش کرده‌اند طی تکامل با ایجاد و توسعه توان زیستی خود شرایط بهره-مندی از آن را فراهم کنند. سلولز به واسطه ماهیت ساختاری خود آنگاه که بخواهد مورد مصرف قرار گیرد مستلزم همکاری آنزیم‌های سلولاز است. بنابراین استفاده از سلولاز توسط جانوران از جمله نشخوارکنندگان ودر سطوح پایین آن توسط حشرات و کرم‌ها نیازمند وجود این آنزیم‌ها است. گرچه بیشترین اطلاعات ما از اکولوژی شکمبه نشخوارکنندگان است اما در واقع به لحاظ تکاملی رده‌های پایین‌تر زنجیره غذایی ازجمله کرم‌ها بایست استفاده از میکروارگانیسم‌های مولد آنزیمهای هیدرولیزکننده سلولز را در دستورکارخود قرار داده باشند. بر این اساس پیدا کردن روابطی مشابه آن‌چه درردههای عالی‌تر جانوری کشف گردیده است در رده‌های ابتدایی‌تر نیز مورد توجه قرارگرفته است.

تبعاً بسته به هوازی یا بی هوازی بودن شرایط، میکروارگانیسم‌های دخیل در فرآیند هیدرولیز سلولز تفاوت دارند. در شرایط هوازی قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و باکتری‌ها و در شرایط بی هوازی باکتری مولد سلولازدرفرآیند هضم سلولز نقش دارند(۴، ۱۱و۱۵). به دست آوردن اطلاعات دقیق از میکروفلور تجزیه کننده سلولز کرم خاکی ضمن افزایش آگاهی ما از اکولوژی حاکم بر این میکرومحیط، زمینه‌ساز توسعه فرآیند تهیه ورمی‌کمپوست می‌تواند باشد(۸).

وجود $۶/۲۵ \times ۱۰^{۴}$ باکتری غالب در واحد حجم میلی لیتر نمونه همگن شده روده کرم خاکی می‌تواند از جنبه های گوناگون مورد توجه قرار گیرد. یافته قبلی گزارش شده ما در مورد کرم ابریشم که طی آن $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ عدد باکتری سلولومونواس شمارش شده بود جنبه دیگر یافته را تقویت می‌کند که در دستگاه گوارش کرم خاکی همانند کرم ابریشم یک نوع باکتری می‌تواند تعداد غالب را تشکیل دهد. ضمن آن‌که جنس باکتری جدا شده یکی است. پس سلولومونواس یک باکتری تجزیه کننده سلولز مشترک در هر دو کرم می‌باشد. در حالت متمم می‌توان دیگر سویه‌ها را همزیست و یا گذرا در نظر گرفت. جهت بررسی دقیق‌تر و اثبات هر یک از حالات فوق مطالعات در جا نیاز می‌باشد.

نگاهی عمقی‌تر به تعداد تقریباً نزدیک به هم باکتری دو کرم ابریشم و کرم خاکی از لحاظ مبنای لگاریتمی $۱۰^{۴}$ قابل توجه و تامل بیشتر است. تعداد سلولومونواس شمارش شده در کرم ابریشم که از برگ درخت توت جمع آوری از محیط تغذیه شده بود با کرم خاکی که به لحاظ تغذیه‌ایی با خاک در تماس می‌باشد تفاوت در حد انتظار نشان نمی-دهد. در حالیکه در مورد کرم خاکی انتظار تفاوت چشمگیری می‌رود چرا که در واحد حجم غذای مصرفی آن تعداد و تنوع باکتری‌ها به مراتب از برگ بیشتر است. به عبارتی علیرغم میزان ورودی متفاوت باکتری‌ها به لحاظ تنوع و تعداد، نوع نهایی باکتری غالب یکسان وحتی تعداد تفاوتی بیش از نسبت یک به چهار نشان نمی‌دهد. این مهم نقش کلیدی وتعیین کننده جایگاه را در تعیین تراکم باکتری-های غالب و گذرا تاکید می‌کند. لذا این تشابهات می‌تواند ریشه در انتخاب طبیعی داشته و براساس نیاز مشابه و تغذیه نسبتاً مشابه قابل توجیه باشد.

از طرف دیگر بررسی کشت همزمان سویه‌های جدا شده ضمن آن‌که تضادی بین آن‌ها نشان نداد حالت هم افزایی فعالیت اندوگلوکناز و همکاری دو سویه را به خوبی نشان داد. این امر می‌تواند در روده کرم نیز اتفاق بیفتد و همکاری و هم افزایی بین آن ها باعث تولید افزون‌تر آنزیم-های سلولاز و بهبود عملکرد گردد. وین سسلا و همکاران با مطالعه قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش کرم خاکی گونه فتیدا به این نتیجه رسیدند که سلولاز موجود در روده کرم عمدتاً توسط ریزوارهای همزیست تولید می‌شود و به نوعی برای آبکافت سلولز وجود هم افزایی را بین آنزیم-های سلولی و ریزواره‌های تجزیه کننده سلولز به صورت فرضیه ارایه نمودند. یافته ما موید این نظریه است.

نکته دیگر وجود سلولوموناس در کرم‌های مورد بحث می‌تواند از جنبه تولید پروتئین تک یاخته برای میزبان آن ها نیزمورد توجه قرار گیرد. به عبارتی همان‌طور که در فرآیند تکنولوژی میکروبی یکی از جنبه‌های مهم دیگر باکتری سلولوموناس ویژگی قابلیت تولید پروتئین تک یاخته آن است. بعید نیست کرم خاکی و ابریشم نیز علاوه بر استفاده از آنزیم سلولاز تولیدی توسط سویه سلولوموناس از جسم و محتوی پروتئینی آن به عنوان منبع پروتئین نیز استفاده کنند موردی که در مورد استفاده از قارچها گزارش گردیده است(۶).

تشکر و قدردانی

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به خاطر تقبل بخشی از هزینه‌های این پژوهش تقدیر میگردد.

منابع

۱–همت، ج.، امتیازی، گ.۱۳۷۹.جداسازی یک سویه سلولومو ناس از دستگاه گوارش کر م ابریشم و بررسی خصوصیات اندو گلوکنازی آن. مجله علوم کشاورزی ایران. ج ۳۱. شماره (۲).۲۶۰–۲۵۵.

2.Aira, M., F. Monroy., J. Domínguez. (2003). Effects of two species of earthworms (*Allolobophora* spp.) on soil systems: a micro faunal and biochemical analysis. Pedobiogia, 47, 877–881.

3.Aira, M., F. Monroy., DomÃnguez, J. (2006). *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) activates fungal growth, triggering cellulose decomposition during vermicomposting. Microb Ecol, 52(4),738-47.

4.Lynd, L.R., P.J. Weimer., Van Zyl,W.H., Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol.Biol. Rev, 66,506-577.

5.Mishra, P.C., Dash, M.C.(1980). Digestive enzymes of some earthworms.Experientia, 36(10),1156-7.

6.Moody, S.A., Briones, M.J.I., Pierce,T.G., Dighton, J. (1995). Selective consumption ofdecomposing wheat straw by earthworms. Soil BiolBiochem, 27, 1209-1213.

7.Pedersen, E.J.C., Hendriksen, N.B. (1993). Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. Biology and Fertility of Soils, 16 (3), 227-232.

8.Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E. (1993). Statistical modeling of litter decomposition integrated fromcellulose activity. Ecol, 74, 1594-1597.

9.Sneath, P. A., Mair, N. S.,. Sharpe, M. E., Holt, J. G. Bergey's manual of systematic Bacteriology.1st Ed. Baltimore USA: Williams & Wilkins; 1986, 1104-39, 1325-29.

10.Vinceslas-Akpa, M., Loquet, M. (1996). Contribution to the study of the origin of cellulase activities of the gut in earthworm *Eiseniafetida* Andrei. C R Acad Sci III, 319(12), 1113-7.

11. Zhou, S., Ingram, L. O. (2000). Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from Erwinia chrysanthemi. J. Bacteriol, 182,5676-5682.

12. Zhou, S., Ingram, L. O. (2001). imultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant Klebsiella oxytoca SZ21 without supplemental cellulase. Biotechnol, Lett, 23, 1455-1462.

13. Zhou, S., Yomano, L. P., Saleh, A. Z., Davis, F. C., Aldrich, H. C., Ingram, L. O. (1999). Enhancement of expression and apparent secretion of Erwinia chrysanthemi endoglucanase (encoded by celZ) in Escherichia coli B. Appl. Environ. Microbiol, 65,2439-2445.

14. Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Kellermann, J., Staudenbauer, W. L. (1998). Multidomain structure and cellulosomal localization of the Clostridium thermocellum cellobiohydrolase CbhA. J. Bacteriol, 180,3091-3099.

15. Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., Schwarz, W. H., Kellermann, J., Staudenbauer, W. L. (1999). Duplicated Clostridium thermocellum cellobiohydrolase gene encoding cellulosomal subunits S3 and S5. Appl. Microbiol. Biotechnol, 51,852-859.