



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی  
و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جداسازی و مطالعه باکتریهای تجزیه کننده

سلولز (Cellulolytic)

1

▶ در اثر تثبیت  $\text{CO}_2$  بیشتر گیاهان سلولز تولید می کنند. سلولز پلی مری نامحلول است که به وسیله گروه آنزیمی اندوگلوکاناز، بتاگلوکوزیداز و سلولاز تجزیه می شود.

▶ اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز سلولز را به سلوبیوز که محلول است تبدیل می کند. بتاگلوکوزیداز سلوبیوز محلول را به گلوکز تبدیل می کند. برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده سلولز، سلولز به عنوان تنها منبع انرژی استفاده می شود.

➤ سلولز بیش از ۸۰٪ گیاهان علفی را تشکیل می دهد. از ضایعات کشاورزی است و به متان، متانول و اتانول تبدیل می شود و مصرف سوختی و نیز به عنوان غذای دام هم استفاده می شود و چون ۵۰٪ سلولز گیاهان در لیگنین محصور است. لیگنین مانع آزاد شدن سلولز می شود. میکروارگانیزم های دارای آنزیم، سلولز محصور در لیگنین را به غذای مفید تبدیل می کنند.

➤ برخی از باکتریها، قارچها، اکتینومیست و پروتوزوئرها سلولز را تجزیه می کنند که به طور طبیعی در خاک وجود دارند. البته پروتوزوئرها در تجزیه سلولز در خاک نقشی ندارند و بیشتر در شکمبه نشخوار کنندگان عمل می کنند.

از میان باکتریها دو دسته هوازی و بی هوازی سلولز را تجزیه می کنند.

باکتری های هوازی :

- سلولوموناس *Cellulomonas* : میله ای - گرم مثبت

- میکروکوکوس *Micrococcus* : خمیده - گرم منفی

- سلوویبریو *Cellovibrio* : خمیده - گرم منفی

- سیتوفاگا *Cytophaga* : میله ای - گرم منفی

از باکتری سلولوموناس برای تولید Single Cell Protein (SCP) یا پروتئین تک یاخته استفاده می شود (البته مهمترین منبع SCP مخمر ساکاروماسیس سرویزیه است). این باکتریها مزوفیل هستند و در دمای معمولی قادر به رشد هستند.

بی هوازی :

کلستریدیوم : میله ای گرم مثبت

رومینوکوکوس : کوکسی گرم مثبت

کلستریدیوم ها به صورت مزوفیل یا تروموفیل بوده و دارای آنزیم مقاوم به حرارت هستند. مهمترین گونه کلستریدیوم ترموسلوم *C. thermocellum* است. کلستریدیومهای تروموفیل دارای ارزش صنعتی هستند زیرا نیاز به هوا ندارند و با سوبسترای جامد تجزیه را انجام می دهند.

# اکتینومیست ها

6

▶ باکتری هایی مثل استرپتومایسس ، نوکاردیا و میکرومنوسپورا . اینها مزوفیل هستند و همچنین ترمومنوسپورا که ترموفیل است . نقش اکتینومیست ها در تهیه کود آلی کمپوست Compost Curing می باشد، در این مرحله از کود نگهداری می کنند تا تجزیه کامل شده و بوی بدش گرفته شود . کلنی های اکتینومیست گچ مانند سفید رنگ یا سبز رنگ است .

# قارچ ها

7

▶ قارچ ها قدرت آنزیمی بالا و ده برابر باکتری قدرت تجزیه کنندگی دارند . از قارچها می توان موارد زیر را نام برد . آسپرژیلوس ترئوس (*Aspergillus terreus*)، فوزاریوم (*Fusarium*)، نوروسپورا (*Neurospora*) و تریکودرما رئیسی (*Trichoderma ricii*) و تریکودرما ویریدی (*Trichoderma viridi*) .

▶ آنزیم سلولاز قارچ ها کاربرد صنعتی دارد و برای بهینه کردن غذای دام و طیور از آن استفاده می شود .



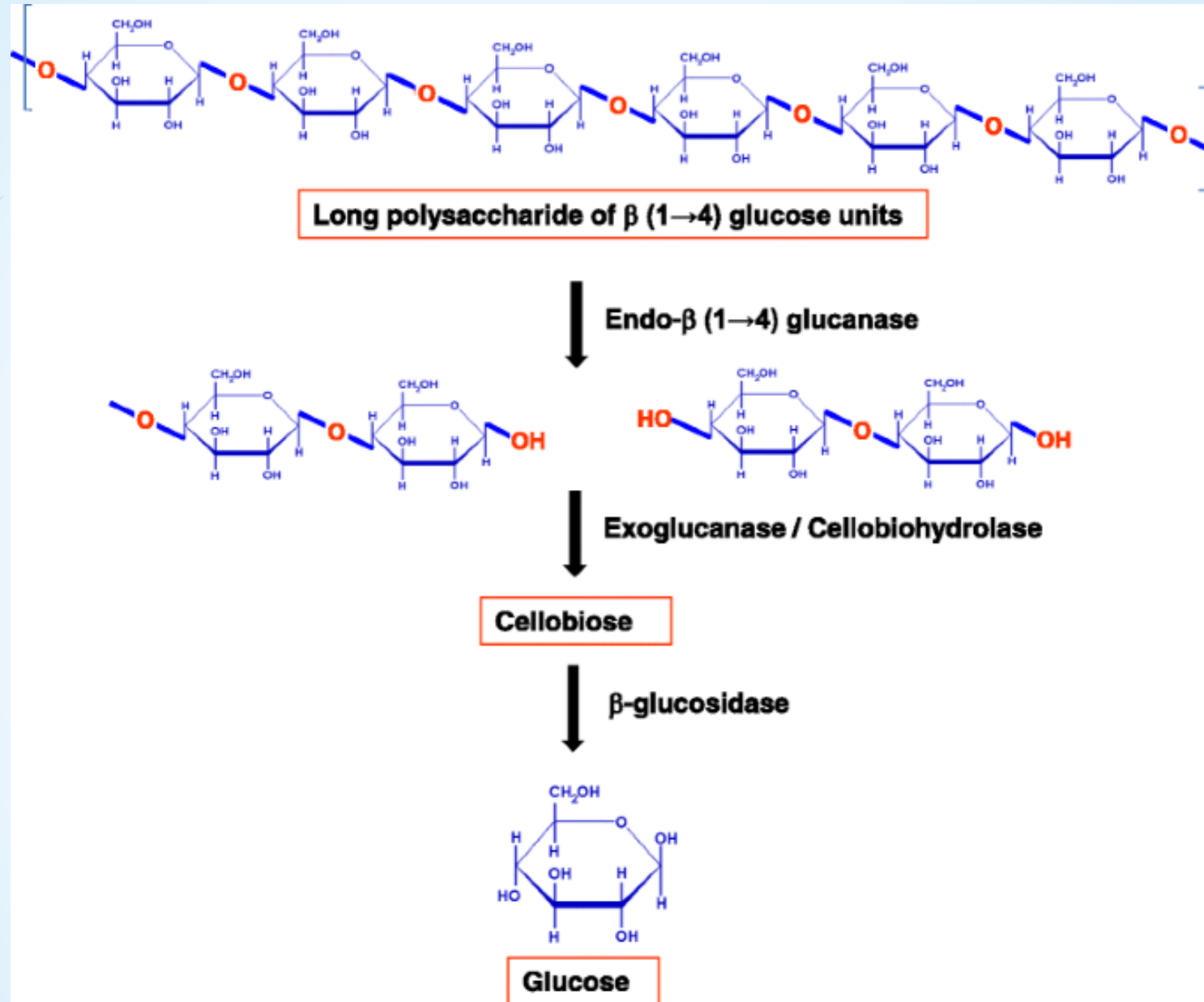
## چهار گروه آنزیمی برای تجزیه سلولز کاربرد دارند :

▶ **اندوگلوکانازها** : پیوندهای هیدروژن و گلیکوزیدی را می شکند و سبب شکستن پیوندهای داخل گلیکوزیدی می شود و رشته سلولزی کوتاه (دکسترین سلولز) می شود . این آنزیم کربوکسی متیل سلولاز یا CMCase نام دارد .

▶ **اگزوگلوکانازها** : پیوند  $\beta(1 \rightarrow 4)$  را از انتهای زنجیره سلولزی می شکند ، خارج سلولی است و تولید سلوبیوز و گلوکز می کند و روی سوبسترای نامحلول اثر دارد. این آنزیم Filter Paper-ase یا FPase نامیده می شود .

▶ **سلوبیاز ( $\beta$  - *glucosidase*)** : اثر بر روی سلوبیوز و ایجاد قند گلوکز





- **دکترین سلولاز :** دکترین حاصل از تجزیه سلولز را به قند تجزیه می کند و کمک به دو آنزیم آگزوگلوکوناز و اندوگلوکوناز می شود. ترشح همزمان این آنزیم ها برای شکستن سلولز ضروری است.
- **فعالیت آنزیم تحت تأثیر محیط است .** از عوامل بسیار موثر در خاک pH می باشد . در pH زیر ۵/۵ بیشتر آنزیمهای قارچ فعال هستند . باکتریها در pH خنثی قادر به فعالیت هستند.
- **دما :** درمورد تحمل دما بستگی به نوع میکروارگانیزم دارد . اکثر ترموفیل ها که سلولاز دارند تا ۵۰ درجه قادر به تحمل هستند ، به جز کلستریدیوم که تا ۷۰ درجه را تحمل می نماید.
- **مواد آلی :** اگر مواد آلی غیر سلولز مثل قند (گلوکز) زیاد باشد مانع تجزیه سلولز شده و فعالیت سلولازی متوقف می شود. البته میزان جزئی قند تحریک کننده است ، زیرا اگر قند زیاد باشد نیاز به فراهم آوردن انرژی از تجزیه سلولز نیست.

➤ **منبع ازت:** به صورت ازت معدنی و آلی مورد استفاده قرار می گیرد. ازت آلی پپتون و عصاره مخمر به همراه سولفات آمونیوم برای سنجش سلولاز، اگر اندوگلوکاناز را بسنجند از سوبسترای سلولزی CMC استفاده می کنند. این سوبسترا را به محیط اضافه کرده و میزان قند آزاد شده را اندازه گیری می کند.

➤ یکی از معرف های لازم برای سنجش میزان گلوکز آزاد شده دی نیتروسالیسیلیک اسید DNS است که ایجاد کمپلکس رنگی قهوه ای رنگ می کنند که این ترکیب دارای جذب نوری است و با اسپکتروفتومتر جذب نوری را اندازه گیری می کنند.

# روش کار

12 محیط کشت اختصاصی جهت جداسازی تجزیه کننده های سلولز باید تنها دارای منبع کربن سلولز باشد ، در این صورت فقط باکتریهای تجزیه کننده سلولز قادر به رشد می باشند .

مواد مورد نیاز جهت محیط کشت سلولز آگار به شرح زیر می باشد :

0/1 gr	عصاره مخمر
0/1 gr	$*(NH_4)_2SO_4$
0/5 gr	$K_2HPO_4$
0/5 gr	$KH_2PO_4$
0/6 gr	NaCl
0/1 gr	$CaCl_2$
15 gr	Agar
0/1 Lit	آب مقطر

در این محیط به جای منبع کربن سلولز از کاغذ به عنوان منبع سلولز استفاده می کنیم و باکتریها روی کاغذ رشد می کنند .

تهیه کننده : سهیلا عباسی

➔ **روش دیگر :** استفاده از کاغذ فیلتر است که با رشد باکتریها تغییر رنگ پیدا می کند و کلنی

هایی که ایجاد می شود گرد و محدب است و از نظر رنگ بسته به نوع باکتری متفاوت است :

➔ سیتوفاگا : صورتی رنگ

➔ میکروکوکوس : نارنجی

➔ سلووایرو یا سلولوموناس : زرد رنگ

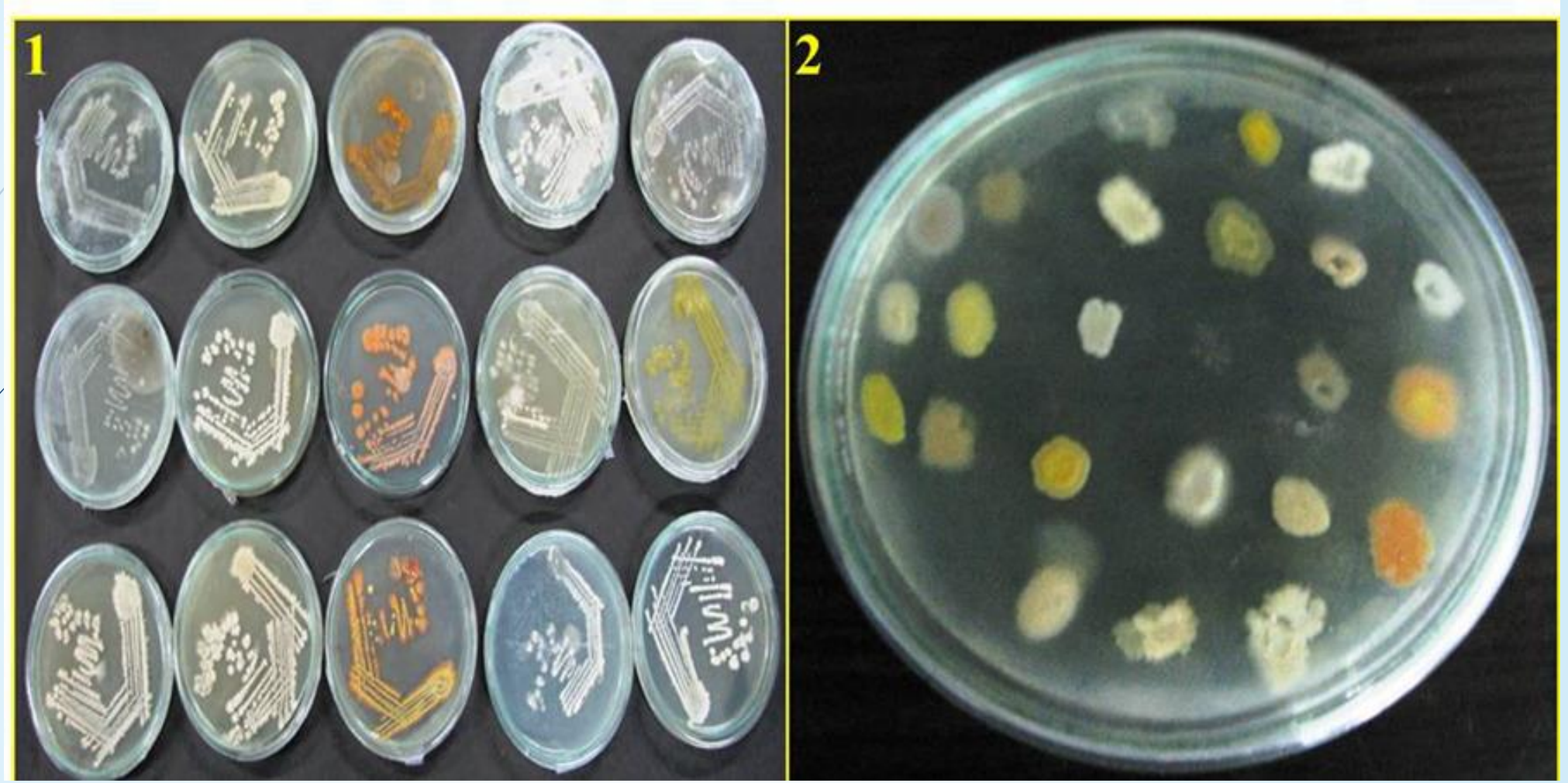
► \* گاهی اوقات به جای کاغذ از پودر سلولز به میزان 10 gr/lit استفاده می شود . در این هنگام باید به جای عصار مخمر از  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  به میزان 1 gr/lit به عنوان منبع ازت استفاده می کنیم.

► در این صورت اگر آگار کاملاً خالص باشد فقط باکتریهای تجزیه کننده سلولز روی این محیط رشد می کند.

► برای انجام آزمایش می توان نمونه از خاک برگ ، کمپوست ، خاک های آلوده به مدفوع حیوانات گیاهخوار مانند خرگوش استفاده نمود.

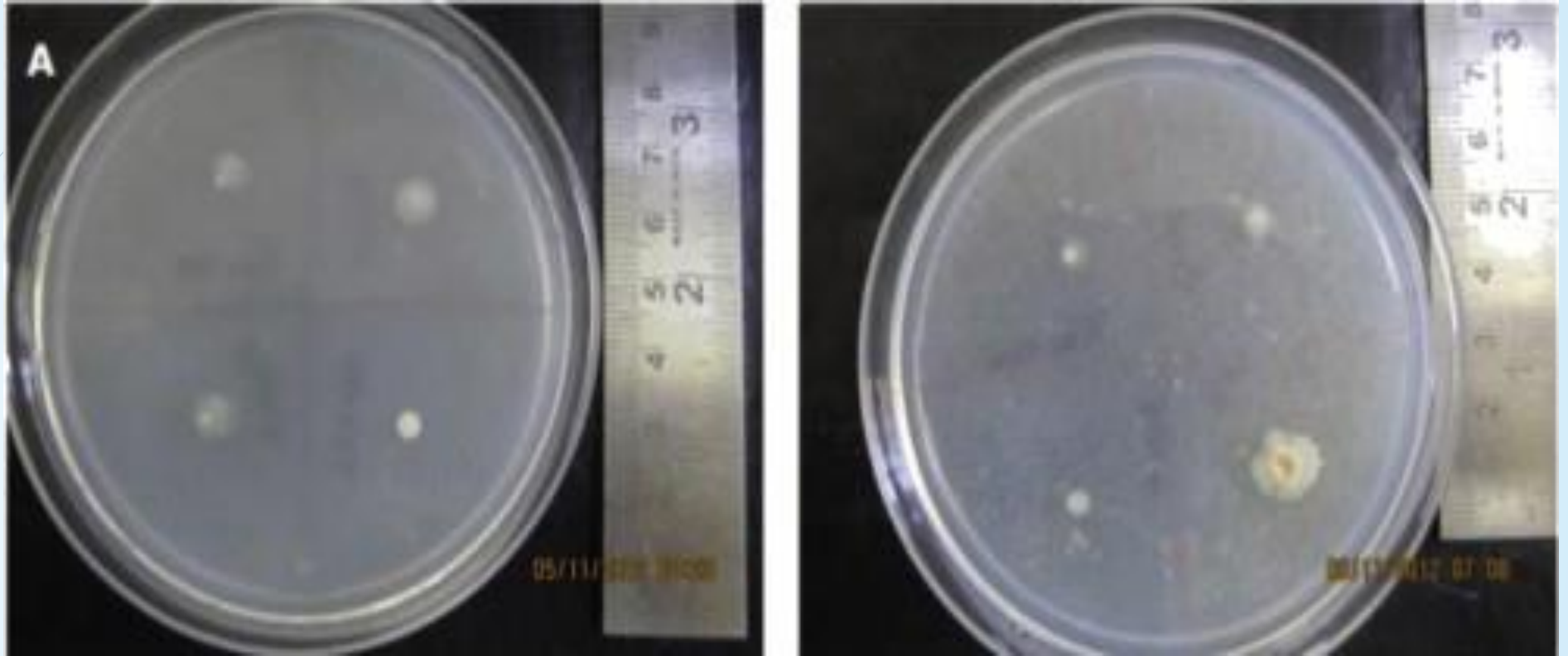
► یک پلیت از محیط کشت برداشته و چند تکه کاغذ استریل روی آن می گذاریم و مقداری از نمونه را روی کاغذ می ریزیم یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم . سپس کلنی های رنگی را بررسی و از آن ها فروتی تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم.





تهیه کننده : سهیلا عباسی

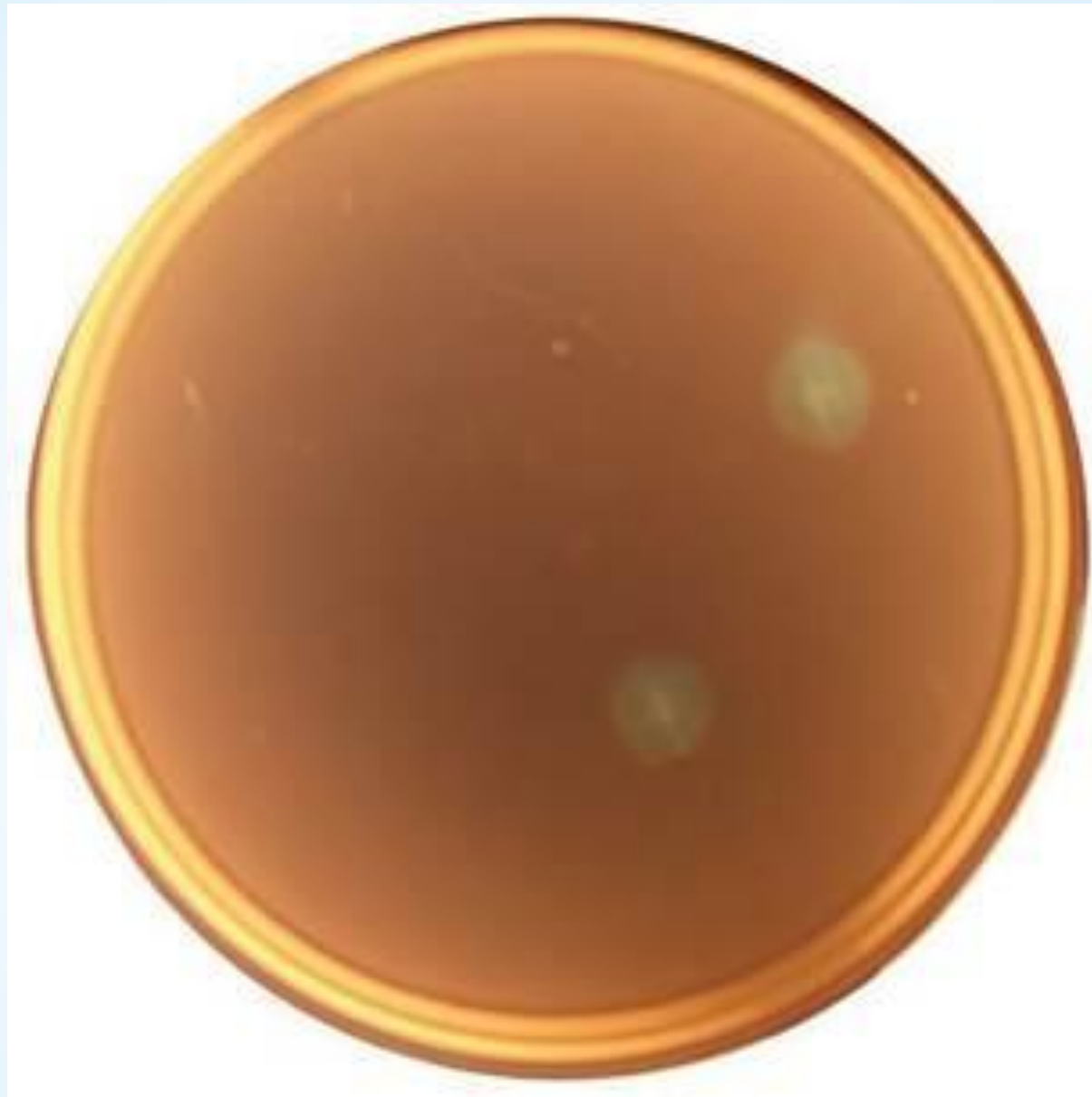




تهیه کننده : سهیلا عباسی

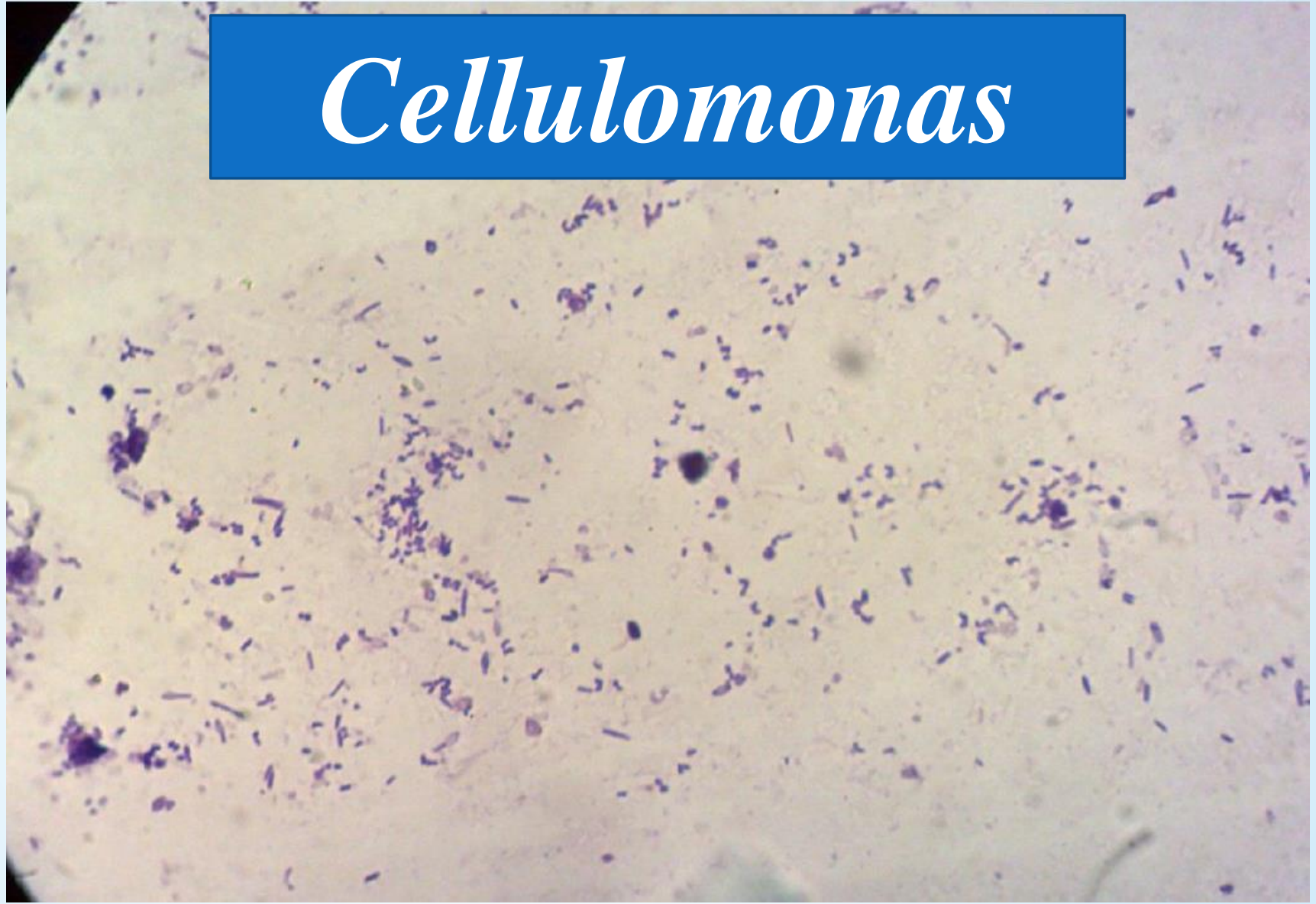


تهیه کننده : سهیلا عباسی



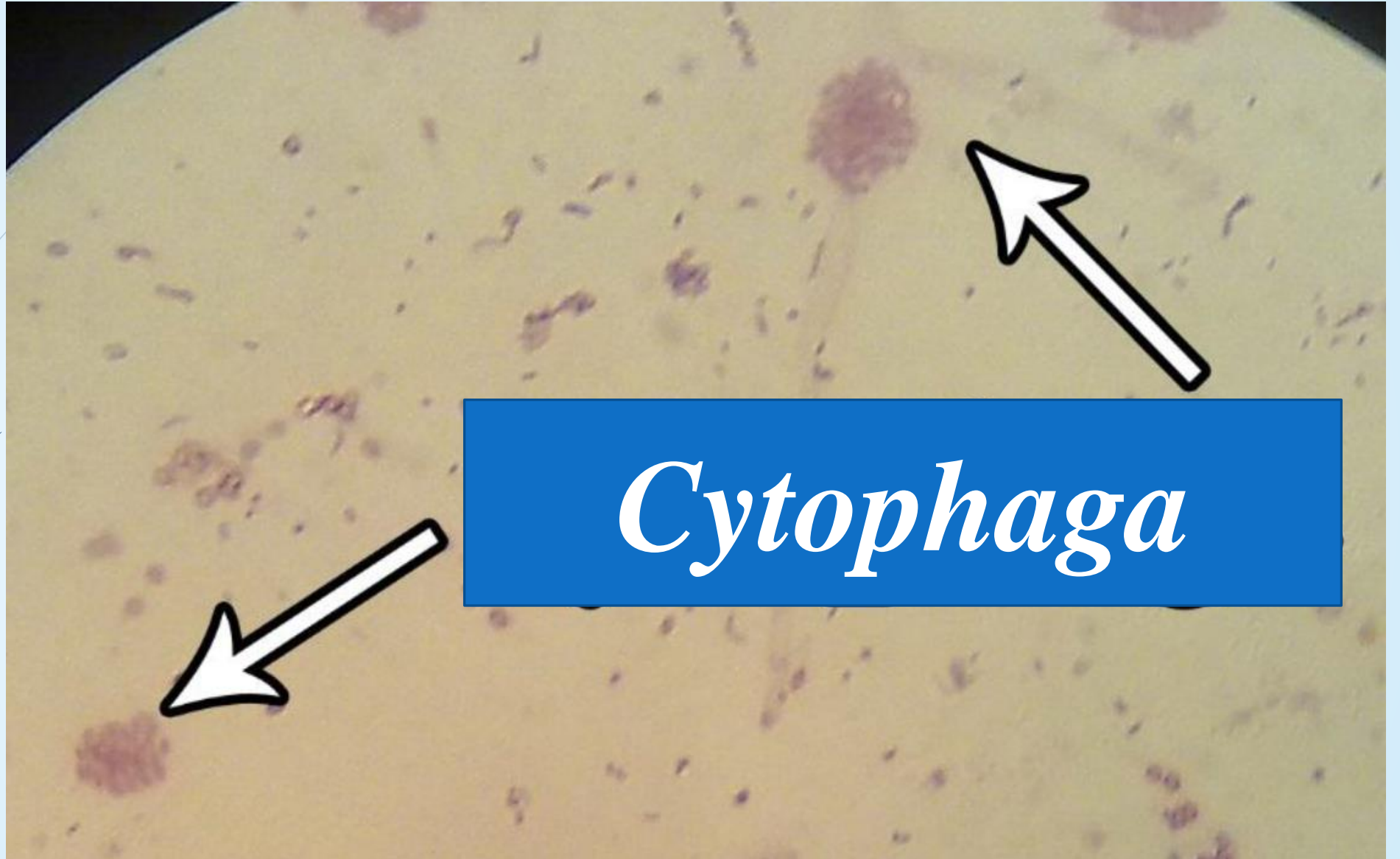
تهیه کننده : سهیلا عباسی

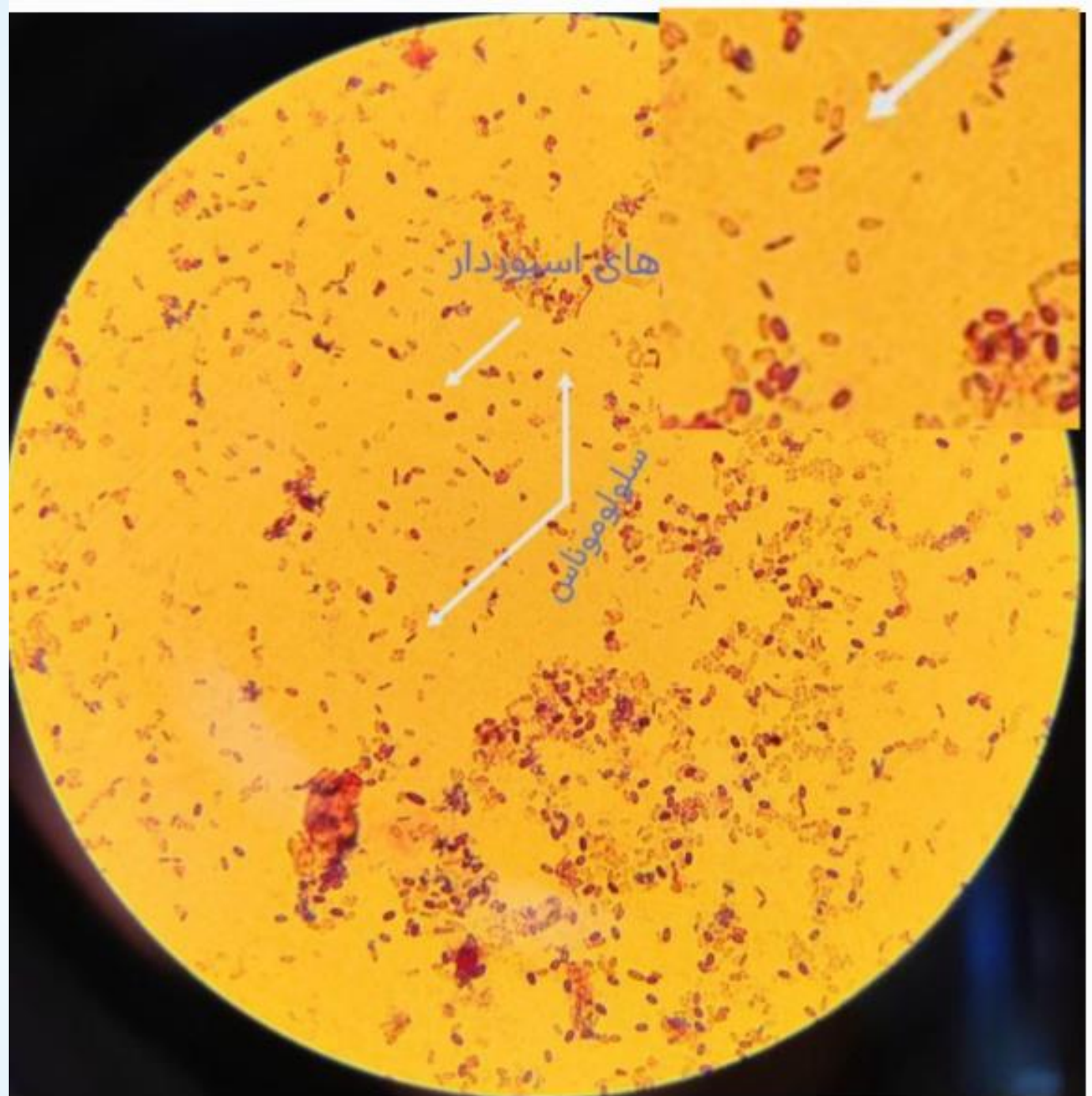
# *Cellulomonas*



تهیه کننده : سهیلا عباسی

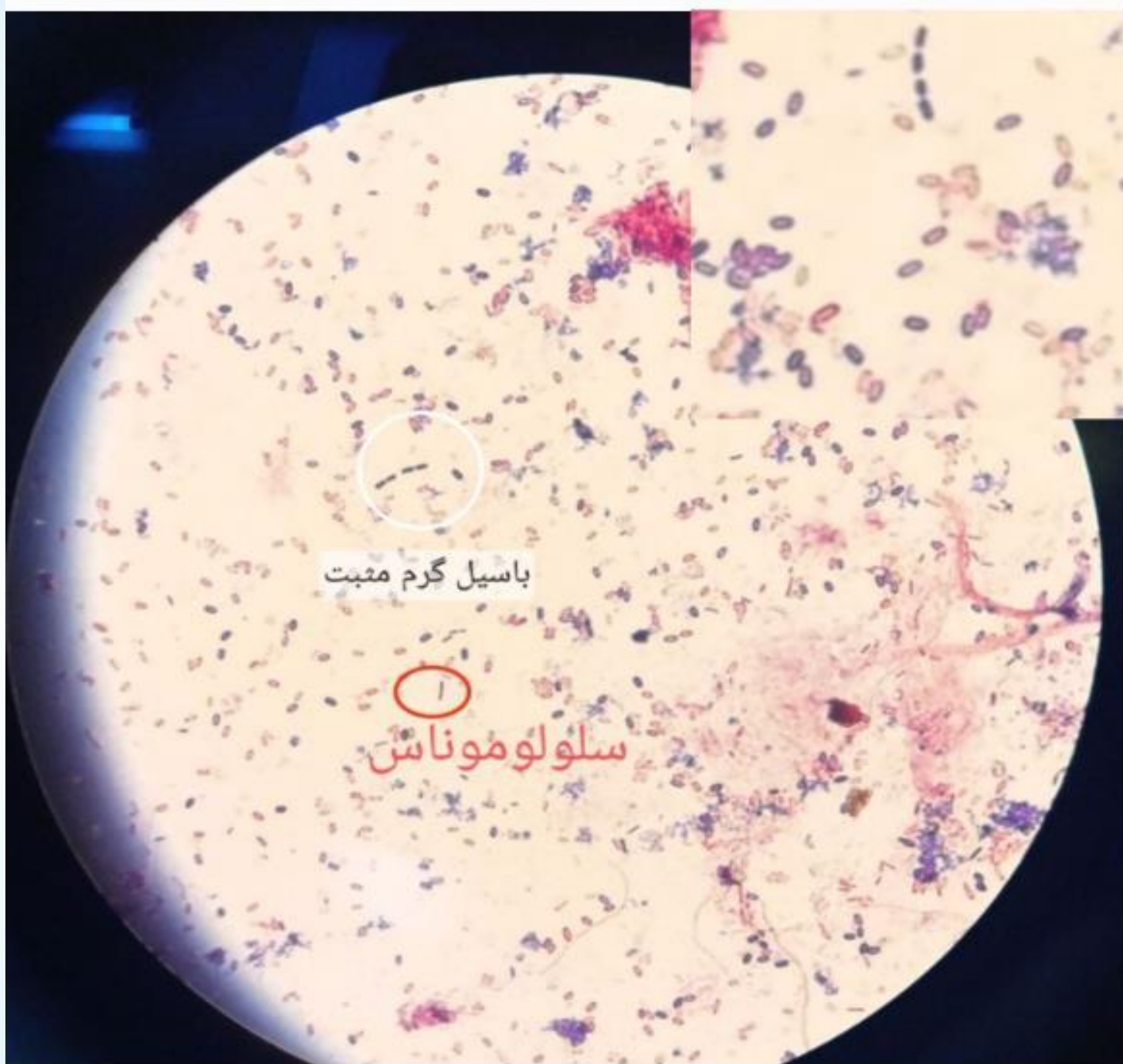






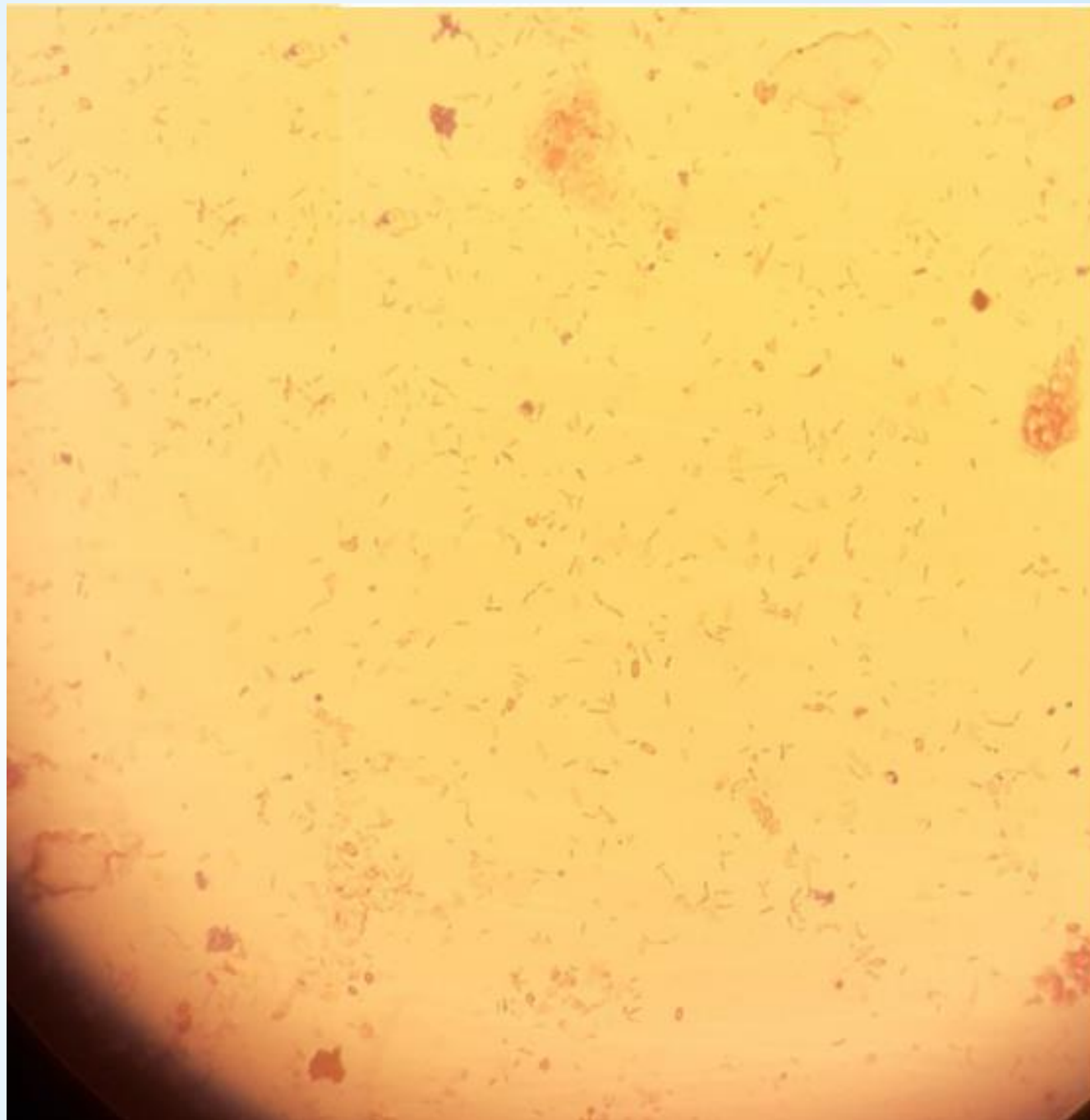
تهیه کننده : سهیلا عباسی







تهیه کننده : سهیلا عباسی







با سیاس فراوان از توجه شما