تقييم كفاءة الطفرات الوراثية المستحثة في بكتريا Cellulomonas gelida على تحفيز النظام الانزيمي المحلل للسيلوز

علي عبد الرحيم الناشئ
قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة القادسية

الـخلاصة

توخى البحث تقدير كفاءة بعض السلالات المطفرة لبكتريا Cellulomonas gelida في فعالية انزيماتها المحللة للسليلوز على الوسط السليلوزي الصلب وفي الوسط السائل حيث تم استحثاث هذه الطفرات مختبرياً بتقنيات تطفيرية كيميائية وفيزيائية. اظهرت السلالات الطافرة لهذه البكتريا تفوقاً في الفعالية الانزيمية المحللة للسليلوز وابدت فروقات معنوية مقارنة مع السلالة الام الطبيعية . فعلى الوسط السليلوزي الصلب كانت فعالية المعقد الانزيمي المحلل للسليلوز لهذه السلالات الطافرة قد ظهر واضحاً من خلال قياس قطر المنطقة الشفافة الخالية من السليلوز حيث بلغت في اليوم الرابع من الحضن (26,30,27,23,27,24) ملم للسلالات (MCB3 , MCB2 , MCB1,MCA3 , MCA2, MCA1) على التوالي بينما في السلالاة الطبيعية كان قطر المنطقة الشفافة (18) ملم تبين ان فعالية الانزيمات المحللة للسيلوز في الوسط السليلوزي السائل لهذه السلالات الطافرة ذات سلوك وانماط مختلفة كما تباينت الفترات الزمنية لظهور النشاط الانزيمي باختلاف هذه السلالات الطافرة وتباين طبيعة الانزيم ففي فعالية انزيم الاندوكلوكاينيز تميز السلالتان MCB2 , MCA2 اذ كانت فعالية الاولى 6.3(IU) في اليوم الثاني من الحضن بينما بلغت فعالية الثانية 6.6(IU) في اليوم الثالث من الحضن مقارنة مع السلالة الام(2.0 , 5.5) IU في اليوم الثاني والثالث على التوالي .

فعالية انزيم الاكسوكلوكاينيز تميزت به السلالتان MCB1 , MCA3 في اليوم الثاني والثالث على التوالي اذ بلغت الفعالية 0.5 , 0.55 (IU) على التوالي ايضاً بينما كانت فعالية السلالة الطبيعية 0.3 , 0.35(IU) في اليومين الثاني والثالث على التوالي .

فعالية انزيم البيتاكلوكوسايديز العالية كانت من نصيب السلالتين MCA2,MCA3 اذ بلغت فعاليتهما 0.82 , 0.97(IU) على التوالي في اليومين الثاني والثالث ايضاً مقارنة مع السلالة الطبيعية 0.4 , 0.44(IU) في اليومين الثاني والثالث على التوالي

ان عملية تكسير الخلايا البكتيرية ادت الى زيادة ضئيلة في فعالية انزيمي الاندوكلوكاينيز والاكسوكلوكاينيز بلغت في احسن حالاتها نسبة ضئيلة هي (3.79 , 2.339) % على التوالي بينما ازدادت هذه الفعالية في انزيم البيتاكلوكوسايديز حتى تجاوزت 100%

المقدمة

خلايا بكتريا **Cellulomonas gelida** ذات شكل عصوي موجب لصبغة كرام، مستعمراتها النامية على على اكار السليلوز ذات لون ابيض مصفر صعبة الازالة من سطح الاكار، تلتصق قسم من الخلايا مع بعضها لتكون على شكل حرف Vقادرة على تحليل السليلوز والنشا بشكل جيد، تستطيع اختزال النترات الى نتريتات. الدرجة الحرارية المثلى لنموها 35م° (Haggett *et al.*, 2002).

السليلوز من المواد الكاربوهيدراتية المتوفرة في الطبيعة وقد صممت تقنيات علمية متطورة تتضمن تنمية احياء مجهرية على السليلوز لانتاج بروتين الخلية المفردة والكحولات والمضادات الحياتية والفيتامينات ومواد اخرى فاحتلت أهمية كبيرة وفتحت افاقاً جديدة في مجالات انتاج الطاقة والغذاء والمواد الكيميائية .(Bollamy , 1994 ; Erikoson and Johnarud , 1993) بالاضافة الى عمليات المسح المستمرة لايجاد كائن مجهري مثالي في انتاج الانزيمات المحللة للسيليلوز ، فان هناك محاولات عديدة وجادة في احداث طفرات وراثية على الاحياء المجهرية المعروفة باتناجها لهذه الانزيمات وانتخاب الفعالية منها باستخدام الاشعة فوق البنفسجية كمطفر فيزيائي او المعاملة بمادة (Nitrosoguanidine) كمطفر كيميائي (Tanaka and Matsuno , 1996 ،العبادي ،1989 ،الكناني ،1989) .

في مجال نقل الجينات فتحت تكنولوجيا الهندسة الوراثية امكانيات جديدة في مجال التحول الحيوي للمواد السليلوزية وذلك عن طريق نقل الجينات المسؤولة عن انتاج نوع واحد من هذه الانزيمات الى كائن مجهري جديد لانتاج ذلك الانزيم بشكل مستقل (البغدادي ،1982) . واول محاولة ناجحة قام بها Wittle et.al(1982) حيث نقلوا جينين من بكتريا Cellulomonas fimi الى بكتريا Escherichia coli احداهما لانزيم الاندوكلوكاينيز والاخر للاكسوكلوكاينيز .

توصل choi et.al (1998) الى الحصول على سلالتين مطفرتين لبكتريا Cellulomonas gelida اظهرتا قابلية اعلى من السلالة الام في انتاج وفعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز واكثر مقاومة للمثبطات مع وجود اختلاف كبير بالمحتوى الانزيمي المحلل للسيليلوز الحر والمقيد مقارنة مع السلالة الاصلية .

وضمن التوجه الحالي في البحث عن بكتريا جديدة ذات امكانيات عالية في انتاج الانزيمات التي تستخدم في الصناعات ، ونظراً لاهمية الانزيمات المحللة للسيليلوز في انتاج سكر الكلكوز فقد ارتأينا استحثاث الطفرات الوراثية على البكتريا Cellulomonas gelida لزيادة كفاءتها في انتاج وافراز الانزيمات المحللة للسيليلوز بالكمية والنوعية المطلوبة والملائمة للتقنيات العلمية الاقتصادية.

المواد وطرائق العمل

جلبت العزلة البكتيرية الطبيعية لبكتريا Cellulomonas gelida من قسم الصناعات الغذائية في كلية الزراعة–جامعة بغداد .

كان المصدر الكاربوني المستخدم في الاوساط السائلة والصلبة المستخدمة في تنمية البكتريا الطبيعية وسلالاتها الطافرة هو السيليلوز النقي GFJI شركة Watman ، حضرت الاوساط الزرعية حسب طريقة Kauri & Kushner (1995) لغرض نمو السلالات البكتيرية وانتاجها للانزيمات المحللة للسيليلوز .جرى الكشف عن فعالية المعقد الانزيمي المحلل للسيليلوز على وسط اكار السيليلوز حسب طريقة Yoeh ,et.al.(2000) و ذلك بزرع جزء من مستعمرات البكتريا في مركز الطبق ثم حضنت بدرجة 35^{0}م لمدة 5 أيام ، وفي كل يوم تقاس المنطقة الشفافة حول النمو حيث تدل على تحلل السيليلوز بفعل هذا المعقد الانزيمي .

قيست فعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في الوسط السائل بالوحدة العالمية International unit (IU) التي تمثل كمية السكريات المختزلة المتحررة بالمايكرومول خلال دقيقة واحدة وكما ياتي :

فعالية انزيم الاندوكلوكاينيز

قيست هذه الفعالية حسب طريقة Taya et.al.(2001) وذلك باخذ 0.5 مل من راشح المزرعة ويضاف اليه 2 مل من محلول Carboxyl-methyl Cellulose ثم يحضن بدرجة 50 ^{0}م لمدة ساعتين بعدها تقاس السكريات المختزلة باستخدام محلول Dinitrosalicylic acid حسب طريقة Miller التي وردت في Mendels et.al.(1999) .

فعالية انزيم الاكسوكلوكاينيز

تم أخذ 1 مل من راشح المزرعة البكتيرية واضيف اليه 1.2 مل من محلول منظم تركيز 50 مليمول ورقمه الهيدروجيني يساوي 6 ، ثم اضيف اليه شريط من ورق الترشيح ابعاده 6×1 سم ،بعدها يحضن بدرجة 60 ^{0}م في حمام مائي لمدة 24 ساعة ثم قيست السكريات المتحررة بفعل فعالية هذا الانزيم كما في الاندوكلوكاينيز.

فعالية انزيم البيتاكلوكوسايديز

قيست هذه الفعالية باخذ 1 مل من راشح المزرعة واضيف اليه 1.2 مل من محلول PNPG ثم يحضن بدرجة 65 ^{0}م لمدة 30 دقيقة بعدها يضاف اليه 0.5 مل من Na2Co3 ثم تقدر مادة (P.Nitrophnol) المتحررة حسب الطريقة التي اوردها Taya et.al.(2001) .

اما الحصول على السلالات الطافرة فجرى بطريقتين :

التطفير الكيميائي

زرعت البكتريا على وسط Nutrient broth وحضنت لحين وصولها الى الطور الاسي ثم اجري لها طرد مركزي وبعدها غسلت بالمحلول المنظم الفوسفاتي مرتين ،ثم اعيد تعليقها بالمحلول المنظم واضيفت المادة المطفرة (N-nitrosoguanidine) بتركيز 100 مايكروغرام/مل ،حضنت الخلايا بدرجة 35 ^{0}م لمدة 60 دقيقة وبعدهاغسلت الخلايا بالمحلول المنظم ثم زرعت على وسط المرق المغذي لمدة 24 ساعة ،ثم استخدمت مجموعة من التخافيف ونشر حجم 1 مل على وسط السيليلوز الصلب وحضنت لمدة 72 ساعة . اختبر عدد من المستعمرات الظاهرة اعتماداً على قطر التحلل والكفاءة في تحليل السيليلوز حسب طريقة Adelberg (2002) .

التطفير الفيزيائي

جرى حسب طريقة Choi et.al.(1998) وذلك باخذ الخلايا وهي في الطور الاسي وتغسل بالمحلول المنظم ثم يعاد مزجها بالمحلول المنظم وتوزع في أطباق بتري وتسلط عليها الاشعة فوق البنفسجية لمدة 60 ثانية ، بعدها اكملت التجربة كما في الطريقة التي اوردها Anderson and Han (2002) .

- ولغرض معرفة كم من الانزيم حراً في سائل المزرعة وكم منه يكون مرتبطاً بسطوح الخلايا ، نميت السلالات المختلفة في وسط السيليلوز السائل وقيست فعالية الانزيمات في راشح المزرعة ، ثم كسرت الخلايا البكتيرية بواسطة جهاز التكسير الصوتي (Fisher sonic dismembrakor) لمدة عشر دقائق وأعيد قياس الفعالية الانزيمية وقورن بين الحالتين حسب الطريقة التي اوردها Taya et.al (2001) .
- اجريت غربلة للسلالات الطافرة من حيث تفوقها في الفعالية الانزيمية المحللة للسيليلوز مقارنة مع السلالة البكتيرية الطبيعية الام ، وتم على هذا الاساس اختيار ثلاث سلالات مطفرة كيميائياً رمز لها بـ (MCA3, MCA2, MCA1) وعلى نفس الاساس اختيرت ثلاث سلالات مطفرة فيزيائياً رمز لها بـ (MCB3,MCB2 , MCB1) .

النتائج والمناقشة

يظهر الجدول (1) قدرة المعقد الانزيمي في تحليل السيليلوز على الوسط الصلب ويبدو ان السلالات البكتيرية الطافرة قد اظهرت تفوقاً في فعالياتها الانزيمية مقارنة مع السلالة الام ومنذ اليوم الاول من الحضن ، وكانت العزلة المطفرة فيزيائياً (M.CB3) هي الاكثر كفاءة في اليوم الاول من الحضن حيث بلغ قطر المنطقة الشفافة (19)ملم مقارنة مع السلالة الطبيعية (8)ملم ، بينما في اليوم الثاني والثالث والرابع والخامس تفوقت السلالة (M.CB2) الطافرة فيزيائياً اذ بلغ قطر المنطقة الشفافة حول المستعرة (28 ،30،30،30) ملم على التوالي في حين بلغت هذه الاقطار في السلالة الطبيعة (22،18،15،11) ملم على التوالي ايضاً ،وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه الباحثان Hallsal and Gibson (1996): من قدرة بعض السلالات الطافرة لبكتريا Cellulomonas spp من التفوق على السلالة الام في التحليل السيليلوز وبنسب مختلفة تجاوزت نسبة 12% .

يبين الجدول(2) فعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في الوسط السيليلوزي السائل وهي الاندوكلوكاينيز ، الاكسوكلوكاينيز والبيتاكلوكوسايديز حيث يبدو ان الاندوكلوكاينيز كان اكثر هذه الانزيمات فعالية في هذه البكتريا وعند مقارنة السلالات الطافرة مع السلالة الام الطبيعية كما في الاشكال (3،2،1) يظهرجلياً قدرة هذه السلالات الطافرة على انتاج انزيمات محللة للسيليلوز بفعالية اعلى مما في السلالة الاصلية ، فقد تميزت السلالة (M.CA2) المطفرة كيميائياً بتفوقها في اليوم الثالث من الحضن في فعالية انزيم الاندوكلوكاينيز حيث بلغت فعاليته 6.6(IU) مقارنة مع السلالة الام التي كانت 5.5(IU) ، بينما تفوقت السلالة (MC.B2) المطفرة فيزيائياً في فعالية انزيم الاندوكلوكاينيز في اليوم الثاني من الحضن اذ بلغت فعالية هذا الانزيم 6.3(IU) بينما في السلالة الاصلية بلغت فعاليته 2.0(IU) . (انظر الشكل 1 والجدول 2) .

اما فعالية انزيم الاكسوكلوكاينيز كما يبدو من الجدول (2)والشكل (2)فقد كانت منخفضة مقارنة مع الاندوكلوكاينيز بشكل كبير ،وقد سجلت السلالة (M.CA3) المطفرة كيميائياً اعلى فعالية انزيمية اذ بلغت 0.50(IU) في اليوم الثالث من الحضن تلتها السلالة (M.CB1) المطفرة فيزيائياً اذ بلغت 0.49(IU) في اليوم الثالث من الحضن ايضاً تبين من النتائج كما في الجدول (2)والشكل (3)ان اعلى فعالية لانزيم البيتاكلوكوسايديز في اليوم الثاني من الحضن في السلالة MCB3 اذ بلغت 0.82(IU) مقارنة مع السلالة الاصلية الذي بلغت فعالية هذا الانزيم فيها 0.40(IU) اما في اليوم الثالث من الحضن فتميزت .السلالة (MCA2) المطفرة كيميائياً حيث كانت فعالية هذا الانزيم 0.97(IU) مقارنة مع السلالة الاصيلة الام التي كانت الفعالية فيها 0.44(IU) .كما ظهرت فروقات معنوية في الفعالية الانزيم بين البكتريا الام وسلالاتها الطافرة يظهر من النتائج في الجدول (3)ان عملية تكسير الخلايا البكتيرية قد ادت الى زيادة فعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في هذه البكتريا

وسلالاتها الطافرة بنسب مختلفة مما يشير الى ان هذه الانزيمات المحللة للسيليلوز قسم منها خارج خلوي معظمه حرفي سائل المزرعة كما في انزيمي الاندوكلوكاينيز والاكسوكلوكاينيز بحيث ان عملية التكسير لم تؤد الا في زيادة ضئيلة في الفعالية تراوحت بين (3.79-2.13)% في الاندوكلوكاينيز بينما تراوحت نسبتها بين (2.33-1.47)% في الاكسوكلوكاينيز ، في حين كانت هذه الفعالية الانزيمية عالية جداً في البيتاكلوسايديز بعد تكسير الخلايا تجاوزت نسبة 100% اذ تراوحت بين (113.3-104.76) % مما يشير الى قلة ارتباط الانزيمين الاولين بجدار الخلية بينما لبيتاكلوكوسايديز معظمه مرتبط بجدار الخلية البكتيرية وان عملية التكسير تؤدي الى تحرره من جدار الخلية وزيادة فعاليته بتماسه مع جزيئات السيليلوز في الوسط الغذائي وهذا ما اكده الباحثون Ait , et.al.(2000) حيث اشاروا الى ان انزيما الاندوكلوكاينيز والاكسوكلوكاينيز يوجدان بصورة حرة في سائل المزرعة بينما معظم انزيم البيتاكلوكاسايديز مرتبط بسطوح الخلايا في دراستهم لبكتريا Cellumonas sp. وكذلك مطابق لدراسة العلياوي 1988 على البكتريا Cellumonas flavigenaان الحصول على سلالات مطفرة ذات قدرة على انتاج انزيمات اكثر فعالية من السلالة الام في تحليل السيليلوز يفتح افاقاً جديدة في انتاج مواد غذائية وصناعية مهمة كانتاج الكلكوز والايثانول والمضادات الحياتية ومواد اخرى ، ففي هذا المجال تمكن Haggett et.al(2002) من الحصول على سلالات مطفرة من البكتريا Cellulomonas sp لها القابلية على تحليل السيليلوز البلوري كما توصل Sulrestre and Klueful (1998) ان السلالة المطفرة من البكتريا Cellulomona sp تظهر فعالية انزيمية محللة للسيليلوز .اعلى من السلالة الطبيعية الام وذلك بمقارنة تكوين المنطقة الشفافة حول المستعمرات النامية ، وفي دراستنا هذه كانت هناك فروقات معنوية بين السلالات الطافرة المختلفة والسلالة الاصلية في الفعالية الانزيمية .يبدو ان سلوك وفعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في هذه العزلات البكتيرية الطافرة من البكتريا الام Cellulomonas gelida ذات انماط مختلفة وربما يعود ذلك الى طبيعة عمل المعقد الانزيمي في مهاجمة جزيئة السيليلوز فقد اشار Saddler (2003) الى ان انزيم الاندوكلوكاينيز يهاجم المناطق غير البلورية في سلسلة السيليلوز بطريقة عشوائية مسبباً تحللاً داخلياً مكوناً سلاسل اقصر في حين يهاجم انزيم الأكسوكلوكاينيز النهايات غير المختزلة او الحرة المتكونة بفعل انزيم الاندوكلوكاينيز مكوناً سكر السلوبايوز او خليطاً من السلوبايوز والكلوكوز بينما يحلل انزيم البيتاكلوكاسايديز سكر السلوبايوز الى كلوكوز ، كما يمكن لنواتج التحلل السيليلوزي ان تثبط عمل بعض هذه الانزيمات .

نستنتج من هذه الدراسة انه من الممكن استحثاث بعض البكتريا المعروفة بانتاجها للانزيمات المحللة للسيليلوز على تكوين سلالات طافرة ذات فعالية اعلى من السلالة الاصلية في تحليل السيليلوز وتوظيف ذلك في صناعات عديدة كانتاج الكلوكوز والايثانول والحوامض المختلفة بفعل نشاط هذه الانزيمات ، رغم ان هذه الطفرات البكتيرية التي تم الحصول عليها في هذا البحث لم تعط

نمطاً ثابتاً في فعاليتها الانزيمية المحللة للسيليلوز فبعضها سريع في افراز الانزيم وبعضها بطئ فهي متذبذبة في فعاليتها ولا توجد تفسيرات واضحة عما يحدث في داخل الخلية من اثر التطفير على الية تحليل السيليلوز .

نوصي باجراء تجارب وراثية على هذه البكتريا عن طريق نقل الجينات المسؤولة عن انتاج الانزيمات المحللة للسيليلوز بين سلالات بكتريا Cellulomonas للحصول على سلالة ذات مستوى امثل في تحليل السيليلوز .

جدول (1)فعالية المعقد الانزيمي المحلل للسيليلوز في بكتريا Cellulomonas gelida المطفرة والنامية على وسط اكار السيليلوز

العزلة البكتيرية*	قطر المنطقة الشفافة (ملم) مدة الحضن بالايام				
	1	2	3	4	5
Wild type	8أ	11 ا	15 أ	18 أ	22 أ**
MCA1	13 ب	15 ج	23 ج	24 ب ج	24 ب ج
MCA2	11 اج	17 ج	24 ب	27 أ ب	27 ب
MCA3	17 ب	20 ج	22 ب	23 ب ج	23 ب
MCB1	15 ج	26 أ	27 ب	27 ب ج	27 ب ج
MCB2	16 ب	28 ب	30 ب	30 أ ج	30 ب ج
MCB3	19 ب	24 ب	25 أ ج	26 أ ب	26 ج

* (MCA3 , MCA2 , MCA1) تشير الى السلالات المطفرة كيميائياً

بينما (MCB3 , MCB2 , MCB1) تشير الى السلالات المطفرة فيزيائياً

**المتوسطات التي تشترك بالاحرف الابجدية نفسها لا تختلف عن بعضها معنوياً حسب اختبار دنكن تخت مستوى 5%

جدول (2)فعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في بكتريا Cellulomonas gelida وفي بعض سلالاتها المطفرة

العزلة البكتيرية*	Endoglucanase (IU)		Exoglucanase (IU)		B-glucosidase (IU)	
	مدة الحضن بالايام		مدة الحضن بالايام		مدة الحضن بالايام	
	2	3	2	3	2	3
Wild type	2.0 أ	5.5 أ	0.3 أ	0.35 أ	0.40 أ	0.44 أ**
MCA1	4.7 ج	6.0 ب	0.22 ب	0.28 ج	0.45ب ج	0.61 ج
MCA2	4.0ب ج	6.6 ب	0.41 ج	0.44 أ	0.60 ب	0.97 أ
MCA3	5.9 ب	4.7 ج	0.38 ب	0.5 أ ج	0.70 ج	0.76 أ
MCB1	5.8 ب	6.2 ب	0.50 ج	0.49 ب	0.31 ج	0.65 أ ج
MCB2	6.3 ج	5.5 ب	0.34 ج	0.40 أ ج	0.72 ب	0.92 ب
MCB3	5.2 ب	4.3 ج	0.45 ب	0.27 أ ج	0.82 أب	0.87 أ ب

* (MCA3 , MCA2 , MCA1) تشير الى السلالات المطفرة كيميائياً

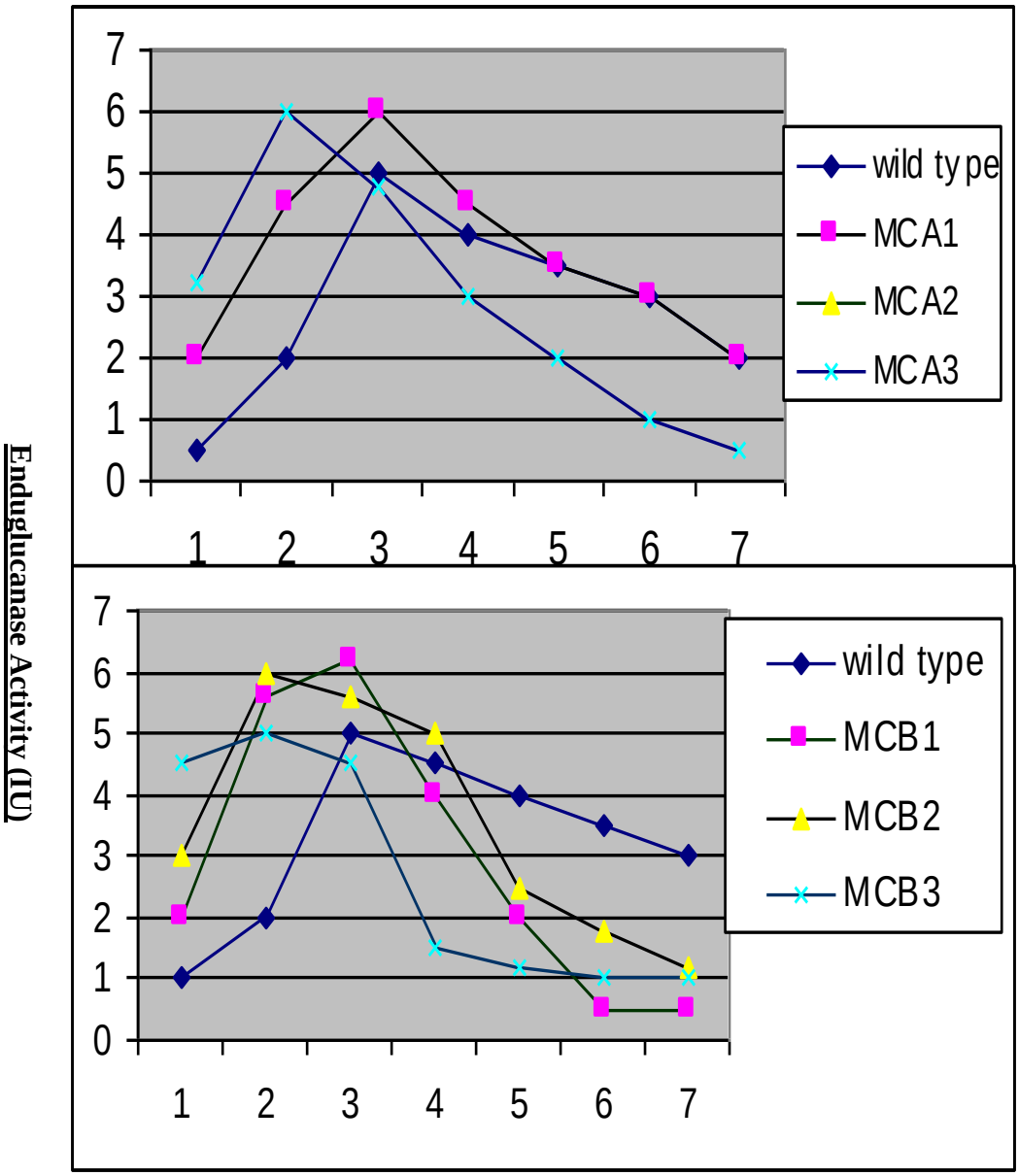
بينما (MCB3 , MCB2 , MCB1) تشير الى السلالات المطفرة فيزيائياً

**المتوسطات التي تشترك بالاحرف الابجدية نفسها لا تختلف عن بعضها معنوياً حسب اختبار دنكن تخت مستوى 5%

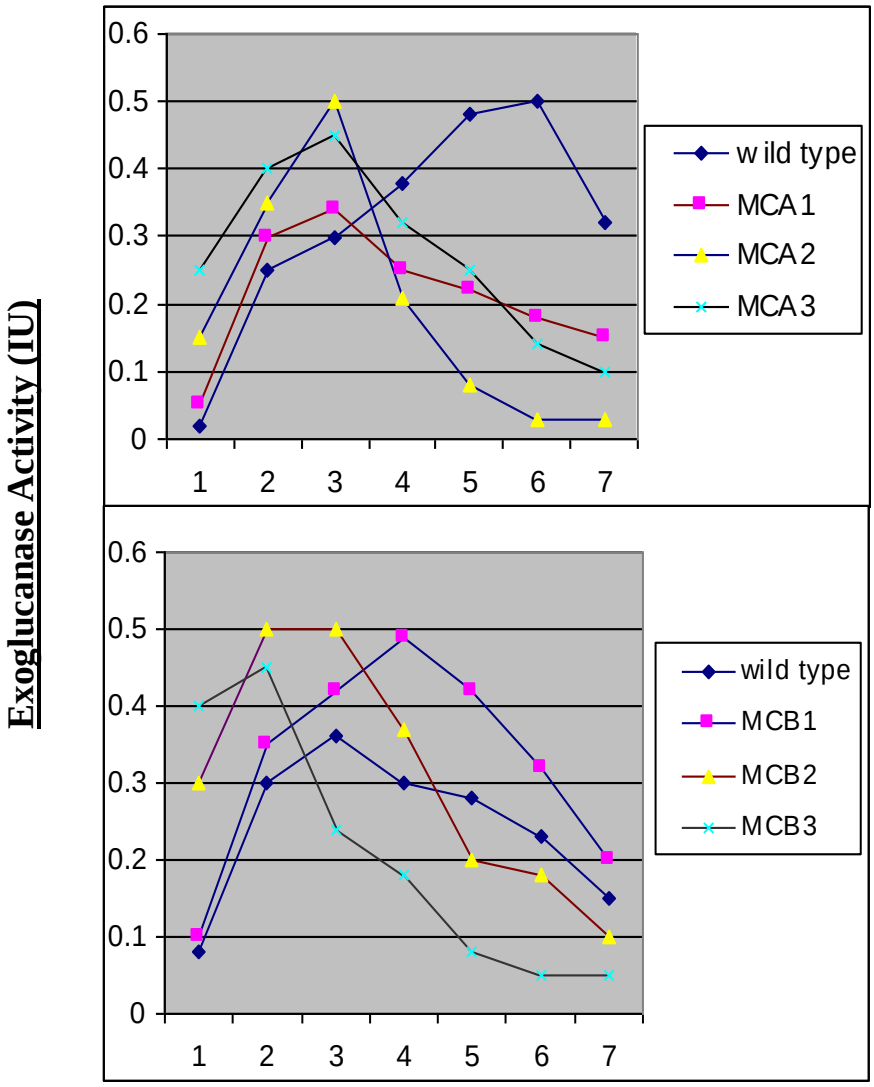
جدول (3)فعالية الانزيمات المحللة للسيليلوز في بكتريا Cellulomonas gelida الطبيعية والمطفرة بعد 60 ساعة من الحضن قبل وبعد تكسير الخلايا

العزلات البكتيرية*	الفعالية الانزيمية	Endoglucanase(IU)	Exoglucanase (IU)	B-glucosidase (IU)
Wild type السلالة الام	قبل تكسير الخلايا	5.20	0.341	0.42
	بعد تكسير الخلايا	5.32	0.346	0.8
	النسبة المئوية للزيادة	%2.3	%1.47	%104.76
MCA1	قبل تكسير الخلايا	5.80	0.300	0.60
	بعد تكسير الخلايا	6.02	0.307	1.28
	النسبة المئوية للزيادة	%3.79	%2.33	%113.3
MCB1	قبل تكسير الخلايا	6.10	0.462	0.55
	بعد تكسير الخلايا	6.23	0.469	1.15
	النسبة المئوية للزيادة	%2.13	%1.51	%109

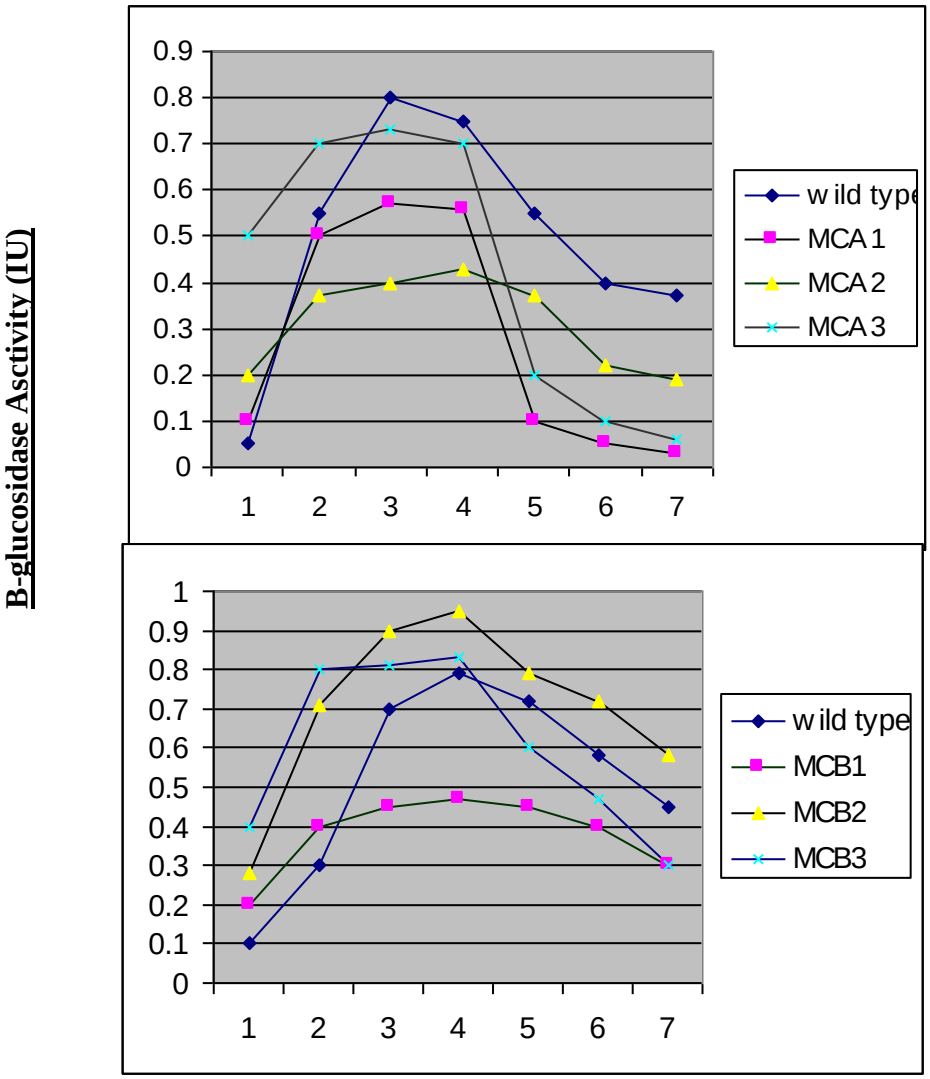
* MCA1 و MCB1 تشير الى عزلات مطفرة لنفس البكتريا



شكل (1) فعالية انزيم الاندوكلوكاينيز في بكتريا Cellulomonas gelida المطفرة والنامية على وسط السليلوز النقي



شكل (2) فعالية انزيم الاكسوكلوكاينيز لبكتريا
Cellulomonas gelida وسلامتها المطفرة والنامية على
السليلوز النقي



شكل (3) فعالية انزيم البتاكلكوسايديز لبكتريا Cellulomonas gelida وسلامتها المطفرة والنامية على السليلوز النقي

المراجع

1- البغدادي ، غازي جدوع محمد(1982). كفاءة الطفرات الوراثية امقاومة المضادات الحياتية لبكتريا Cellulomonas flavigna على تحطيم السيليلوز ، رسالة ماجستير ، كيلية العلوم /جامعة بغداد .

2- العبادي ، أنمار خليل ابراهيم (1989) دراسة الانزيمات المحللة للسيليلوز ، في بكتريا Cellulomanas flavigena والمعزولة من اهوار البصرة ، رسالة ماجستير .كلية التربية –جامعة البصرة .

3- العلياوي ، فعال نعمة ذهيب (1989) دراسة حول البكتريا المحللة للسيليوز المعزولة من مصادر مختلفة .رسالة ماجستير ، كلية التربية –جامعة البصرة .

4- الكناني ،خالد اسماعيل طاهر (1999)النظام الانزيمي المحلل للسيليلوز في الفطر Aspergellus niveus. ، رسالة ماجستير ، كلية التربية –جامعة البصرة

5- Adelberg , E.A.(2002) Optimal conditions for mutagenesis is by N-methyl –N-nitroguandine in Escherichia coli.k2Biochem .Biophys .Res.Comm.16:140-148.

6- Aia,N.L; Creuzet , N.B. and Cattaneo , J.T.(2000) Properties of B-glucosidase puried from Clostridium thermocellum .J.Biol.Chem. 24:244-304.

7- Anderson , A.W. and Han , Y.W.(2002)Increasing the nutritive value of straw by microbial groweth in semisold straw matrix J.Bacteriol . 11:197-207.

8- Bollamy,N.M.(1994) Characterization and structure of an endoglucanase gene of Celluomonas fimi Gene .J.Bacteriol. 23:207-216.

9- Choi ,W.Y.;Haggat, K.O.and Dunn , N.W.(1998) Isolation of a cotton wool degrading strains of Cellulomonas mutants .with altered ability to degrade cotton wod , Aust .J.Biol.Sci. 37:442-449.

10- Eriksson,K.M.and Johnsrud,s.c.(1993)Mutants of the Sporotrichum pulverulentum with increased Cellulase and B-glucosidase production enzyme .Microbiol .Technol. 8:325-329.

11- Haggett,K.D.;Choi,W.Y. and Dunn ,N.W.(2002) Mutants of Cellulomonas which produce increased levels of B-glucosidase Eur.J.Appl.Microbiol .18:114-120.

12- Halsall,D.M. and Gibson , A.H. (1996)Cellulose decomposition by mixed culture of Cellulomonas gelida and Bacillus macerans .Appl and Environ . Microbiol , 21:553-556.

13- Kauri ,T.L. and Kushner ,D.J.(1995)Growth and Cellulytic activity of Cellulomonas gelida .J.Microbiol.36:1150-1157.

14- Mandels , M.H.;Andreotti ,R.B. and Roche ,C.M.(1999) Measurement of sacharifying cellulose .J.Biol.Sci. 17:92-103.

15- Saddler,J.N.(2003) Factors limiting the efficiencies of Cellulase enzymes.J.Microbiol.45:227-234.

16- Sulvester ,N.D.and Kluepfel ,D.R.(1998) Method for rapid screening of cellulytic Streptomyces and their mutants .Can .J.Microbiol.22:668-680.

17- Tanaka ,M.T.and Matsuno ,R.M.(1996)Comparison of different strains of Celluomonas for production of cellulolytic and xylanolytic enzymes from biomas produced on salino lands .Biotechnol.Lett.10:22-30.

18- Taya , M.;Hinoki,H.;Suzyki,Y. and Kobayashi , T.(2001) New thermophilic anaerobes that decompose crystalline cellulose.J.Ferment.Technol .51:379-385.

19- Whittle ,D.J.;Killburn,D.G.and Miller , J.R.(1982) Molecular cloning of Cellulomonas fimi cellulose gene in Escherichia coli Gene .

20- Yeoh ,H.H.;Khow ,E.S and Lim ,G.H.(2000)Free and cellulose-bound cellulases in cellulomonas spps.J.Gen. Microbiol . 101:195-206.

Evaluation of Efficiency Genetic Mutations at Cellulomonas gelida In Stimullating of Cellulase System

Ali .A . R.Al-Nashe.
Department of Biology ,College of Education
University of Al-Qadisiya

Summary

The aim of this study was evaluation of efficiency of some mulation strains Cellulomonas gelida in their cellulase activity in solid and lequid cellulose media .These mutations were stimulated by chemical and physical technique.

The mutational strains of this bacteria appeared best cellulase activity compared with original bacteria .

On solid cellulose medium the cellulase activity has been cleary through meserment of radial of soft region that empty of cellulose were been in 4^{th} days of incubation: (24 , 27,23,27,30,26) mm .For (MCA1,MCA2,MCA3,MCB1,MCB2,MCB3) respectively.Where the redial of this region was 18 mm in original strain .It was seemed the cellulase activity of these mutation strains in lequid cellulose medium were different behavior and types , also different in periods of appearing with differents of these stains The strains (MCB2 and MCA2) had been higher Endoglucanas activity 6.3 and 6.6 (IU) in 2^{nd} and 3^{rd} days respectively. The strains (MCB1 and MCA3) had been high Exoglucanase activity 0.5 and 0.55 (IU) in 2^{nd} and 3th day respectively.

The strains (MCA3 and MCA2) had been higher B-glucosidase activity (0.82 and 0.97)IU in 2^{nd} and 3th days respectivily

The study appeared that Endoglucanase and Exoglucanase were Exocellular enzymes which found free in culture while B-glucosidase found cell wall linked enzyme or endocellular enzyme .