The Libyan Journal of Science
University of Tripoli Vol. 28, No. 01
https://uot.ed.ly/journals/index.php/ljs

تقييم قدرة بعض أنواع البكتيريا المعزولة من البيئة المحلية على إنتاج إنزيم السليولاز تحت ظروف تنمية مختلفة

Ali A. Elagael[1*] and Amani A. Almozogi[2]

1. قسم النبات، كلية العلوم، جامعة طرابلس

2. قسم الأحياء، كلية التربية قصر بن غشير، جامعة طرابلس

Corresponding authors: a.elagael@uot.edu.ly

RTICLE I N F O

Article history:

Received: 15/02/2025

Received in revised form:12/04/2025

Accepted: 12/05/2025

المستخلص

تركزت هذه الدراسة على عزل البكتيريا من التربة المحلية، واختبار قدرتها على تحلل السليلوز وتأثير بعض عوامل تحسين التحلل الإنزيمي، شملت تأثير درجات الحرارة، تركيز أيون الهيدروجين وبعض المضافات الغذائية، من أصل 10 عزلات، أظهرت النتائج أن العزلة البكتيرية (BA10) كانت الأفضل في إنتاج إنزيم السليولاز، وقد عرفت على أنها *Pseudomonas fluorescence*، أظهرت هذه العزلة البكتيرية اختلافا معنويا في اختبار درجات الحرارة وتأثير تركيز أيون الهيدروجين على نشاط إنزيم السليولاز. كما تم في هذه الدراسة تقييم تأثير بعض المضافات الغذائية (المالتوز، البيبتون ومسحوق أوراق وسيقان المورينجا) على إنتاج إنزيم السليولاز، أظهرت النتائج تأثير إضافة المالتوز على نسبة السكر المختزل مقارنة بالشاهد. كما بينت النتائج أن مسحوق أوراق المورينجا أظهر دعماً للعزلة البكتيرية في تحلل للسليلوز مقارنة بالشاهد، بينما مسحوق بذور المورينجا لم يظهر أي فاعلية في زيادة التحلل الإنزيمي للعزلة البكتيرية، فقد كان تقريبا مساوياً للشاهد.

الكلمات المفتاحية: الكتلة الحيوية، السليلوز، أنزيم السليولاز، الأحياء الدقيقة المنتجة للسليولاز.

Abstract: This study focused on the isolation of bacteria and evaluate their ability to degrade cellulose and the effect of some factors to improve enzymatic degradation, included the effect of temperature, pH concentration and some nutritional additives, out of 10 isolates of bacteria, the results showed that, isolate (BA.10) showed the highest in the production of cellulase enzyme, and was identified as *Pseudomonas fluorescence*. The bacterial isolate exhibited a significant difference in their response to temperature and the influence of hydrogen ion concentration on cellulase enzyme activity. Additionally, the study evaluated the effects of several nutritional additives, including maltose, peptone, and powdered moringa leaves and stems, on cellulase production. Results also showed that the addition of maltose significantly increased the percentage of reducing sugars compared to the control. Furthermore, moringa leaf powder was found to enhance the

bacterial isolate's ability to degrade cellulose relative to the control, whereas moringa seed powder did not demonstrate any significant effect on enzymatic degradation Compared to the control.

Keywords: biomass, cellulose, cellulase enzyme, cellulase-producing microorganisms

1. المقدمـــة

أدى استهلاك النفط ومشتقاته كمصادر للطاقة إلى تدهور النظام البيئي في جميع أنحاء العالم ومن المتوقع أن ينمو الطلب على الطاقة بنسبة الثلثين تقريبا في عام 2040، وهو ما يمثل عشر ارتفاع الطلب العالمي[1]. في العقد الماضي، كان هناك اهتمام متجدد، في جميع أنحاء العالم، على الكتلة الحيوية كمصدر للطاقة النظيفة، حيث تلتزم وزارة الطاقة الأمريكية ووزارة الزراعة الأمريكية بشدة بدعم الوقود والمواد الكيميائية الناتجة عن الكتلة الحيوية والمنتجات كوسيلة لتقليل الحاجة إلى واردات النفط والغاز بتصور استبدال 30% من استهلاك النفط بالوقود الحيوي بحلول عام 2030، وذلك للتخفيف من المخاوف المرتبطة بزيادة احتراق الوقود الاعتيادي حيث الاستخدام المباشر للكتلة الحيوية يمكن أن يقلل المخاوف من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون المرتبطة بالطاقة التقليدية [2،3].

السليلوز يمثل الجزء الأكبر من إجمالي الكربوهيدرات في الكتلة اللجنوسليلوزية وهو المنتج الأساسي لعملية التمثيل الضوئي في النباتات الراقية والطحالب حيث تنتج النباتات سنوياً خلال عملية البناء الضوئي حوالي من 75-100 بليون طن من السليلوز، يتراكم بعضها دون استخدام، مسبباً مشاكل بيئية كثير [4-6].

يعتبر السليلوز مقاوماً نسبياً للتحلل المائي وأغلب المحللات العضوية، إلاَّ بوجود الإنزيم القادر على تحلله [7] .التحلل المائي الحمضي الذي له عدة آثار جانبية سلبية، وقد وجد أن التحلل المائي الإنزيمي هو البديل المناسب وكان محور البحث في العقود الماضية، وشمل أنظمة الإنزيم الرئيسية المستخدمة في التحلل المائي للمركبات اللجنوسليلوزية عدة إنزيمات أهمها، السليولاز (Cellulases) والهيميسليولاز (Hemicellulases) ، الزايلينياز (Xylanase) وللجينينا(Ligninases) [8]

السليولازات Cellulases هي إنزيمات صناعية مهمة تستخدم في تطبيقات صناعية مختلفة مثل صناعة المنظفات، المنسوجات، الأغذية والأعلاف وصناعة الورق وكذلك في معالجة النفايات. وتمثل السليولازات حوالي 20٪ من سوق الإنزيم[9]، وهي ثاني أكثر الإنزيمات استهلاكا في الصناعة، ويُبشر الطلب المتزايد على الطاقة الحيوية والمواد الحيوية بمستقبل مشرق من أجل إنتاج السليولاز [10].

عديد من الدراسات أشارت إلى التخليق الحيوي لإنزيم السليولاز وبكميات كبيرة عن طريق بعض الأنواع من الأحياء الدقيقة، مثل البكتيريا والفطريات الخيطية، باستخدام متبقيات الكتلة الحيوية الزراعية [11-13] . أكدت الدراسات أن السليولازات ذات الأصل البكتيري أكثر جاذبية بسبب التنوع الطبيعي ومعدل النمو المرتفع للبكتيريا وكمية الإنزيمات التي تفرزها. والأهم من ذلك، قابليتها للنمو في الظروف البيئية القاسية، بالإضافة الى ان السلالات البكتيرية تنتج إنزيمات مستقرة تحت هذه الظروف القاسية[14] .لتحسين إنتاجية الأنزيم، يجب تحسين مجموعة متنوعة من العوامل مثل كمية اللقاح ودرجة الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة ووجود المستحثات والمضافات الغذائية [15].

عليه هدفت هذه الدراسة إلى عزل البكتيريا المنتجة لإنزيم السليولاز من التربة المحلية وتقييم تأثير درجات الحرارة والأس الهيدروجيني على إنتاج أنزيم السليولاز. بالإضافة إلى اختبار تأثير بعض المضافات الغذائية إلى وسط النمو على إنتاج إنزيم السليولاز والتي من ضمنها اختبار مسحوق أوراق، سيقان وبذور المورينجا كعامل مستحث لنشاط الأنزيم.

2. المواد وطرق البحث

أجُريت هذه الدراسة بمعمل الأحياء الدقيقة بقسم علم النبات بكلية العلوم جامعة طرابلس في الفصل الدراسي الخريف 2022-2023.

1.2. عزل البكتيريا المحللة للسيليلوز

جُمعت عينتين تربة أحدهما من محطات البحوث والتجارب بكلية الزراعة جامعة طرابلس، والأخرى من المعشبة الطبيعية بكلية العلوم جامعة طرابلس، خلال ربيع 2022، أخذت عينات التربة بحوالي 100 جرام من التربة الرطبة الغنية بالمخلفات النباتية والأخشاب المتفسخة على عمق 5-10 سم من سطح التربة، وضعت عينات التربة في أكياس البولي إيثيلين المعقمة ، وخُزّنَت عند 4 درجات مئوية. استناداً لطريقة Apun وآخرون، (2000) [16].

أُجْري التخفيف المتسلسل بدايةً بواقع 10 جم من كل عينة تربة في 90 مل من الماء المقطر والمعقم ورجت لمدة دقيقتين، ثم خُفِّفَت معلقات التربة بشكل متسلسل (10^{-1} إلى 10^{-6}) في 9 مل من الماء المقطر والمعقم، بعدها أضيف 0.1 مل من كل تخفيف على وسط الآجار الانتقائي

Carboxymethyl cellulose (CMC) وفقا للإجراء الموضح في Holt [17].

2.2. تنقية العزلات البكتيرية

على أساس الخصائص المزرعية للمستعمرات على الوسط المغذي الانتقائي CMC تم تنقية 10 عزلات بكتيرية على وسط الآجار المغذي Nutrient Agar (NA)ورُمزت من AB.1 إلى AB.10.
فُحِصَت الأطباق بانتظام، ونُقِلَت مستعمرة تمثيلية واحدة من كل نوع من الأنواع المختلفة إلى وسط آجار جديد باستخدام طريقة تخطيط الطبق. حُضنت العزلات، وتُحُقِّق من نقاء والخصائص المورفولوجية للمستعمرة. أُعِيد عزل العزلات (مرتين) على الوسط الأصلي والتحقق من نقاوتها. خُزِّنَت العزلات النقية على وسط الآجار المغذي (NA)عند 4 درجات مئوية. أُعْتُبِرَت العزلة نقية بعد ثلاث عمليات نقل متتالية، وأُكِّد نقاء العزلات بناء على خصائص المستعمرة (الشكل والحجم واللون).

3.2. استخدام صبغة الكونغو الأحمر

أُستُدِلّ على إنتاج إنزيم السليولاز باستخدام طريقة Thomas وآخرون [18]، بغمر الأطباق بمحلول مائي بنسبة 0.1٪ من صبغة أحمر الكونغو Congo red لمدة 15 دقيقة، بعد ذلك، غسلت بمحلول كلوريد الصوديوم NaCl تركيزه 1 مولاري ولوحظ وجود هالات شفافة اللون حول المستعمرات المنتجة للسليولاز (شكل 1).
سُجلت النتائج بقياس قطر الهالة للبكتيريا، وتم اختيار أفضل العزلات البكتيرية المكونة لأكبر قطر هالة تحلل من بين 10 عزلات بكتيرية.
حُسبت فاعلية العزلات بقدرتها على إنتاج السليولاز بناءً على المعادلة: (قابلية العزلة على إنتاج إنزيم السليولاز = قطر هالة التحلل/ قطر المستعمرة [18]. العزلات التي أظهرت فاعلية كبيرة في قدرتها على إنتاج إنزيم السليولاز في هذه الدراسة تم اختيارها لاختبارات المقايسة الإنزيمية.

4.2. تعريف العزلة البكتيرية

عُرفت العزلة البكتيرية التي أظهرت اعلى فاعلية في انتاج انزيم السليولاز في اختبارات المقايسة الإنزيمية، إلى مستوى النوع باستخدام الطرق التقليدية وذلك على أساس الخصائص المزرعية والمجهرية (الشكل، اختبار صبغ جرام وتكوين الأبواغ الداخلية Endospore علاوة على ذلك، حُدِّدَت العزلة على أساس الأصباغ القابلة للانتشار في الوسط المغذي والنمو عند 42 درجة مئوية [19]، بالإضافة الى الاختبارات البيوكيميائية باستخدام دليل الملف التحليلي The analytical profile index (API, bioMérieux) (API)، حُقنت الأنابيب الدقيقة وحُضنت شرائط API عند 28 درجة مئوية وفحصها بعد 24 ساعة و48 ساعة. عُرفت العزلة البكتيرية على أساس 12 اختباراً لتحمض الكربوهيدرات (API20NE) وحللت ببرنامج APILAB software، أُجْرِي التحليل وفقا للتعليمات الواردة في دليل المستخدم، وتلك المستخدمة من قبل Logan وBerkeley [20]، وأُكِّد التعريف باستخدام أدوات الأحياء الجزيئية في معمل الأحياء الدقيقة بجامعة المنار بجمهورية تونس.

1.4.2. التعريف الجزيئي للبكتيريا

عُرفت العزلة البكتيرية أيضا إلى مستوى النوع عن طريق التحليل الجزيئي حيث يستند التعريف الجزيئي إلى تحليل تسلسل جين الرنا الريبوزي Sequence of 16S rRNA gene والموصي به باعتباره الباركود العالمي لتحديد الأنواع البكتيرية[21] .

1.1.4.2. عزل الحمض النووي

عُرِّفَت العزلة البكتيرية المختارة بأستخلاص الحمض النووي DNA عن طريق غليان المعلق البكتيري في الماء المقطر المعقم في حمام مائي عند درجة 100 درجة مئوية لمدة 10 دقائق ثم رجت جيدا باستخدام جهاز الرج Vortex لتجانس الوسط. بعد الطرد المركزي عند 13000 لفة في الدقيقة لمدة 10 دقائق، جُمعت المادة الطافية وحُفظت عند -20 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، نفذت هذه الطريقة كما وصفها Silva وآخرون [22].
أُختبرت نقاوة المادة النووية وحجمها باستخدام مقياس الطيف الضوئي النانوي Nano Drop، (Thermo Fisher Scientific, USA). وتم قياس نسب الامتصاص؛ 280/260 نانومتر و230/260 نانومتر لتقييم نقاوة الحمض النووي: 280/260 نانومتر للتلوث بالبروتين و230/260 نانومتر للتلوث بالأملاح والفينول. الحمض النووي معروف بامتصاصه للضوء عند 260 نانومتر ونسبة 280/260؛ هي 1.8-2.0 ونسبة 230/260؛ >1.8 تشير إلى أن العينة نقية مع تلوث قليل أو معدوم [23]، بعد التأكد من نقاوة عينة الحمض النووي، تم التضخيم عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل. وضعت في الطرد المركزي الخاص بأنابيب PCR لإزالة الفقاعات ثم وضعت في جهاز المدور الحراري Thermocyclers، لمدة أربع ساعات حسب البروتكول لتعريف للبكتيريا.
استند تعريف العزلات البكتيرية على طريقة Patagundi وآخرون [24]. والذي اعتمد على تضخيم جين 16rRNA S(1500 قاعدة نيتروجينية مزدوجة)، وهي منطقة محفوظة للغاية في جميع البكتيريا باستخدام سلسة زوج البادئ إلى الأمام (16S F) 5'-AGAG) (F Forward) TTTGATCCTGGCTCAG3')وسلسلة البادئ العكسية R). Reverse) (16S R) (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3').

عُمِل تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR باستخدام حجم نهائي 50 ميكرو لتر من مل مول واحد من البادئات الأمامية والعكسية Forward and reverse primers، 10 مل مول من نوكليوسيد ثلاثي الفوسفات deoxynucleoside triphosphates (dNTP)، 2 مل مول من كلوريد الماغنسيوم $MgCl_2$ ، X1 من PCR buffer ووحدة واحدة (1U)من إنزيم بوليميراز المستحرة المائية (Taq polymerase يتكون برنامج PCR من خطوة التمسخ (Denaturation) في 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق لدورة واحدة، تليها 30-35 دورة من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، خطوة التلدين (ارتباط البادئ) Annealing لمدة 30 ثانية في درجة حرارة محددة، وخطوة التمديد extension في 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة والتمديد النهائي في 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق

أجري بعدها تقنية الرحلان الكهربائي الهلامي باستخدام الاجاروس Agarose gel electrophoresis، تم فصل منتجات PCR على 1.5٪ هلام الاجاروس في واحد ضعف 1 x (Tris-borate-EDTA) buffer المنظم عن طريق Agarose gel electrophoresis في درجة حرارة الغرفة عند 100 فولت، صُوِّرَت الحزم من الجينات تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (UV) باستخدام صبغ بروميد الإيثيديوم Ethidium bromide staining وهو متشعشع لصبغ الحمض النووي لتمكين تصوير حزم الحمض النووي الفردية تحت الأشعة فوق البنفسجية.

أُجري تسلل الرنا الريبوزي Sequencing of 16S rRNA لمنتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل الإيجابية وقُورن التسلسل الجزئي الجيني بالتسلسلات المودعة في بيانات بنك الجينات (www.ncbi.nlm.nih.gov) للكشف عن الأنواع البكتيرية .

5.2. المقايسة الإنزيمية

1.5.2. تجهيز اللقاح البكتيري

حُضر الوسط المغذي السائل LARAIL BERTANI (LB) ، ووزع على 5 دوارق سعة كل منها 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق وعقمت بالاتوكليف عند درجة 121.6°م لمدة 15 دقيقة وبعد التبريد أضيف للوسط مسحة لوب كاملة Loop full من المزارع البكتيرية الأكثر فاعلية المختارة من الاختبار السابق باستخدام صبغة أحمر الكونغو. حُضنت المزرعة لمدة يومين عند درجة حرارة 30 درجة مئوية في الحمام المائي بالهزاز.

2.5.2. تلقيح العزلات المختبرة لتقييم فعاليتها في إنتاج الإنزيم

باستخدام الوسط المغذى المغذي كربوكسي مثايل سيليلوز، عُدل تركيز أيون الهيدروجين عند 7، ولقحت العزلة البكتيرية لاختبار كفاءتها في إنتاج الإنزيم، بإضافة 1 مل من المعلق البكتيري في دوارق سعة 250 مل تحتوي على 100 مل من الوسط .CMC حضنت في الحمام المائي بالهزاز لمدة 3 أيام عند درجات حرارة مختلفة (45-35-25) درجة مئوية.

أُستُخْدِمَت طريقة الفحص الكمي لتحديد نشاط السليولاز للعزلة البكتيرية المختارة في الوسط السائل بالطرق المستخدمة من قبلMiller [25]. قِيس نشاط السليولاز للمزرعة البكتيرية من خلال تحديد كمية السكريات المختزلة المحررة باستخدام Dinitrosalicylic Acid (DNS) (كاشف حمض دي نيترو ساليسيليك لتحديد السكر المختزل). حُضِّر محلول الجلوكوز القياسي بإذابة 100 ملجم سكر الجلوكوز في 100 مل ماء مقطر للحصول على محلول قياسي بتركيز 1000 ميكروجرام/مل، حيث جهزت 7 أنابيب اختبار وعُلم عليها من رقم 1 إلى 7، الأنبوبة الأولى بدون إضافة الجلوكوز (BLANK) والأنبوبة السابعة للمجهول UNKNOWN والتي تمثل العينات (جدول 1).

جدول 1. تحضير المحلول القياسي للجلوكوز

Tube No	Standard Glucose (ml)	DW (ml)	DNS Reagent (ml)	DW (ml)
1	0.0	1.0	2.0	7.0
2	0.2	0.8	2.0	7.0
3	0.4	0.6	2.0	7.0
4	0.6	0.4	2.0	7.0
5	0.8	0.2	2.0	7.0
6	1.0	0.0	2.0	7.0

قِيس نشاط السليولاز حيث حُضِّر خليط تفاعل يتكون من 2 مل من رواشح النمو للعزلات البكتيرية بعد إضافة 3 مل من الكاشف (DNS) وحضن في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 15 دقيقة بُرِّد في حمام ثلجي لمدة 5 دقائق بعد ذلك إضافة 5 مل من الماء المقطر للأنابيب الاختبار وملاحظة التغير اللوني للأنابيب (شكل 1).

تمت المقايسة الإنزيمية عن طريق جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، عند طول موجي 540 نانومتر لقياس نسبة السكر المختزل. حُدِّدَت الامتصاصية Absorbance لكل تركيز عند 540 نانومتر. حُدِّدَت الامتصاصية للأنبوبة الأولى بدون جلوكوز (BLANK)وتم تصفير الطيف الضوئي. سجلت القراءات للأنابيب من 2 إلى 6 لرسم المنحنى القياسيStandard curve ، ورسم المنحنى

البياني القياسي باستخدام برنامج الإكسل، بعد ذلك أخذت قراءات العينات للعزلة المختبرة وتحديد التركيزات من خلال المنحنى القياسي.

شكل 1. إضافة الكاشف Dinitrosalicylic Acid (DNS) للمعاملات

6.2. اختبار بعض العوامل المؤثرة على إنتاج إنزيم السليولاز

1.6.2. اختبار تأثير درجة الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين على إنتاج السليولاز

اختبر تأثير درجة الحرارة عند (25، 35 و45) درجات مئوية، وتأثير الرقم الهيدروجيني pH (4.5، 5.5، 6.5، 8.5 و10) بنفس الطريقة السابقة باستخدام (DNS) وتمت المقايسة الإنزيمية كم تم أعلاه. في هذا الاختبار ثُبِّت الرقم الهيدروجيني عند 7 واختبرت درجات الحرارة. حددت أفضل درجة حرارة بناء على المقايسة الإنزيمية وتم بعدها اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني عند الدرجات المذكورة أعلاه مع تثبيت أفضل درجة حرارة.

2.6.2. تحسين إنتاج السليولاز

أُختُبِرَت قدرة العزلات في تحسين إنتاج السليولاز باستخدام الوسط المغذي CMC وذلك بإضافة بعض المركبات الكيميائية لاختبار تأثيرهم على إنتاج الإنزيم عند أفضل درجة pH ودرجة حرارة على النحو الآتي:

1. إضافة 2.5 جرام/لتر من الببتون Peptone

2. إضافة 5 جم من مسحوق أوراق وسيقان المورينجا *Moringa oleifera*إلى الوسط المغذي (CMC) لاختباره كعامل مستحث.

3. إضافة 10 جرام من المالتوز.Maltose

3. النتائج والمناقشة

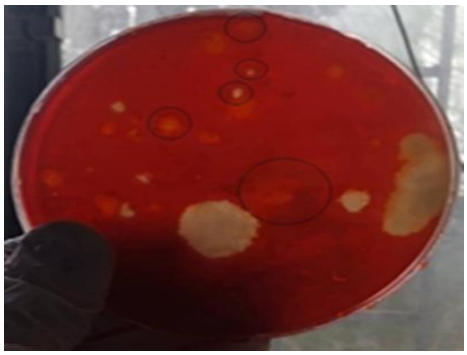
استهدف هذا البحث تحسين المعرفة العلمية سويا مع نجاح تلبية الطلب المتزايد لأنزيم السليولاز لإنتاج المواد الصديقة للبيئة، وعلاوة على ذلك، فإنها تفتح سبلاً جديدة لاستخدام مختلف النفايات الزراعية والملوثات العضوية كمصدر للطاقة المتجددة عوضا عن إلقائها لإحداث تلوث بيئي.

فإن المعرفة لأحدث أنظمة التحلل السليلوزي والهيميسليلوزي واعتماد استراتيجيات التقنيات الحيوية المختلفة ستجلب بالتأكيد آفاقا كبيرة في مجال الكيمياء الخضراء الصناعية[26]، حيث تشير التقديرات إلى أن البيع العالمي للإنزيمات الصناعية منها السليلوز قد وصل بالفعل إلى قيمة سوقية تبلغ 1.6 مليارات دولار أمريكي.

1.3. عزل البكتيريا واختبار تحلل السليلوز على الوسط لمغذي

عزلت البكتيريا المحللة للسليلوز من التربة الليبية باستخدام الوسط المغذي المحتوي على كربوكسي ميثيل السليلوز كمصدر وحيد للكربون وهذا يتوافق مع أغلب الدراسات التي تم فيها عزل واختيار العزلات المنتجة لأنزيم السليلوز باستخدام هذا الوسط [27-29].

حُصِل على 10 عزلات كمجموع للعزلات البكتيرية من عينات التربة المخففة بشكل متسلسل، رمزت كل منها بأربعة أكواد من (AB.1 إلى AB.10)، أظهرت هذه العزلات هالات شفافة حول النمو البكتيري على الوسط المغذي الذي يحتوي على 1 ٪ كربوكسي ميثيل السليلوز كمصدر وحيد للكربون، وذلك بعد الصبغ باستخدام 1 ٪ الكونغو الأحمر وملاحظة الهالات الشفافة (شكل 2).



شكل 2. اختيار العزلات التي أظهرت هالات شفافة نتيجة تحلل السليلوز حول المستعمرات على الوسط المغذي Carboxymethyl cellulose.

استخدمت صبغة الكونغو الأحمر أساسا للكشف عن مناطق التحلل وهي المستخدمة في أغلب الدراسات إلا أنه في بعض الدراسات استخدمت صبغة اليود، ولذلك استخدمت في هذه الدراسة أيضا صبغة اليود للمقارنة مع الكونغو الأحمر، وأظهرت النتائج أن كلتا الصبغتين أعطت نتائج فعالة مساوية مع الأفضلية لصبغة اليود، وهذا يتفق مع ما توصل إليه Kasana وآخرون [30]، حيث أظهرت صبغة اليود Gram's iodine هالات مميزة للغاية مقارنة بالكونغو الأحمر.

حُصِل على مزارع نقية وإعادة هذا الاختبار للعزلات البكتيرية كل على حدة وقِيس قطر الهالات الشفافة، من بين هذه العزلات، أُختِيرَت أفضل 5 عزلات على أساس قطر منطقة الهالة (جدول 2).

جدول 2. العزلات البكتيرية المحللة للسيليولوز بعد المعاملة بأحمر الكونغو وقياس قطر الهالة ا (مم)

Code of isolate	Mean of clear zone (mm)	(SD)*
AB.3	9	0.42
AB.5	10	0.25
AB.7	4	0.31
AB.8	2	0.24
AB.10	14	0.32

2.3. المقايسة الأنزيمية

عملية إنتاج السليولاز تختلف باختلاف ظروف التنمية، ولتحسين إنتاجيتها، هناك مجموعة متنوعة من العوامل مثل درجات الحرارة ودرجة تركيز ايون الهيدروجين (قيمة الأس الهيدروجيني)، نسبة الرطوبة والتهوية وبعض العوامل الأخرى مثل المضافات الغذائية المختلفة خاصة مصادر الكربون والنيتروجين واضافة بعض الاملاح المعدنية ووجود المحرضات، وايضا حجم اللقاح، ووقت النمو [31-33] ذلك فإن ظروف الوسط المغذي وعوامل النمو المختلفة تختلف من عزلة بكتيرية إلى أخرى، كما أن فترة التحضين اللازمة لإنتاج أنزيم السليولاز تختلف أيضا باختلاف العزلات ا المختلفة واختلاف ظروف التخمر تؤدي إلى تباين نشاط العزلات البكتيرية [34،35].

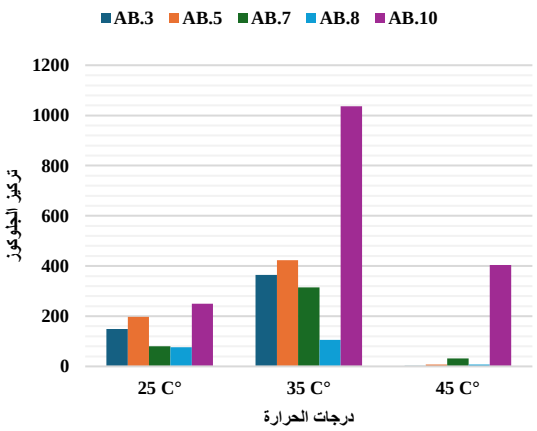
هذه الدراسة اختبرت بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية ، وجد ان العزلة البكتيرية (AB10)والتي عرفت لاحقاً على انها *Pseudomonas fluorescens* تأثرت بشكل واضح وبفروق معنوية في أغلب عوامل التنمية الفيزيائية والمضافات الغذائية مقارنة بالشاهد.

من بين العوامل الجوهرية الأكثر أهمية، هي درجة الحرارة حيث تؤدي دورا رئيسيا في بدء إنتاج السليولاز. أشارت العديد من الدراسات على درجة الحرارة المثلى لنشاط أغلب الإنزيمات ومنها السليولاز هي 32 م°، واظهرت الدراسات ان ارتفاع درجة الحرارة، يوثر على الأحياء الدقيقة وذلك لاستخدام الكثير من الطاقة، اما في درجة الحرارة المنخفضة يتم إعاقة نقل العناصر الغذائية مما يؤثر سلباً على انتاج الانزيم [36] .

1.2.3 تأثير درجات الحرارة على تحلل السليلوز

رُسم المنحنى القياسي للجلوكوز بناءً على المحلول القياسي الذي تم تحضيره وباستخدام المضواء الطيفي لهذا الغرض حيث تم قياس الامتصاصية عند كل تركيز من التركيزات المعلومة للمحلول القياسي للجلوكوز، وحُددت تراكيز الانزيم بالمول للعزلات البكتيرية (5 عزلات) عند 3 درجات حرارة مختلفة (25، 35، 45 درجة مئوية) على الوسط السائل لميثايل الكربوكسي عند pH = 7.0.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن العزلة البكتيرية AB.10 في هذا الاختبار فرق معنوي ($P\leq0.01$) عند درجة الحرارة 35 درجة مئوية (1037 مول) مقارنة بالدرجات الأخرى، يليها العزلة AB.5 (364 مول) وكانت عند نفس الدرجة (الشكل 3).



شكل 3. تأثير متوسط درجات الحرارة المختلفة على تحلل السليلوز وإنتاج السكر المختزل بالمول للعزلات البكتيرية

هذه النتائج مشابهة تماما مع Abou-Taleb وآخرون، (2009) [37] وجد أن إنزيم السليولاز الذي ينتجه *Pseudomonas fluorescence* تم تنشيطه عند 30 إلى 35 درجة مئوية مما يدل على درجة الحرارة المثلى عند 35 درجة مئوية. وهذا يتوافق مع الدراسة التي قام بها Islam وآخرون [38]، الذي اختبر فيها تأثير درجة الحرارة على إنتاج الإنزيم، أُجْري التخمير في درجات حرارة مختلفة (32، 35، 37، 40 و42 درجة مئوية). بينت الدراسة أن إنتاج الإنزيم للعزلات البكتيرية (*Paenibacillus* sp.، *Aeromonas* sp و.*Bacillus* sp)، أنتجت السليولاز في جميع درجات الحرارة المختلفة المختبرة، ولكن تم تحقيق أقصى إنتاج للإنزيم عند 35 درجة مئوية. لوحظ انخفاض في إنتاج الإنزيم عند درجة حرارة أعلى من 40 درجة مئوية، ويتوافق أيضا مع الدراسة التي قام بها Bakare وآخرون، (2005) [39] ، التي أظهرت أن *Pseudomonas fluorescence* أنتجت إنزيم السليولاز عند 30 إلى 35 درجة مئوية مع إظهار أفضل نتيجة عند درجة حرارة 35 درجة مئوية. من ناحية أخرى، أظهر Ray وآخرون (2007)[40] . بكتيريا *Bacillus subtilis* العزلة 115 أنتجت على النحو الأمثل للسليولاز عند 40 درجة مئوية، وهذا ما أكده أيضا Immanuel وآخرون، [32]، بأن *Bacillus subtilis* و*Bacillus circulans* العائد الأمثل للإنزيم عند 40 درجة مئوية.

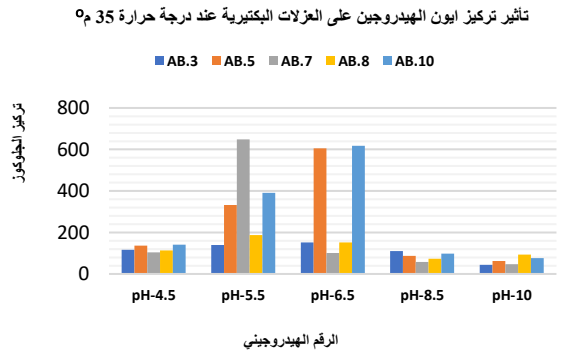
2.2.3. تأثير الرقم الهيدروجيني

الرقم الهيدروجيني لوسط النمو دورا مهما من خلال إحداث تغييرات مورفولوجية في الأحياء الدقيقة وإفراز الإنزيم، كما يؤثر أيضا على استقرار الإنزيم في وسط التخمر، حيث يسبب التغيير في الرقم الهيدروجيني في حدوث تغييرات في موقع الإنزيم النشط [41].

الرقم الهيدروجيني الابتدائي له دور فعال في عملية إنتاج أنزيم السليولاز، وإن الرقم الهيدروجيني الذي يكون ملائماً لعزلة قد لا يكون ملائماً لعزلة أخرى [42]، وذلك لأن قيم الأس الهيدروجيني تؤثر في خصوصية فعالية الأنزيمات التي تعمل على تحلل مادة التفاعل أو تؤثر في نفاذية جدار الخلية للأنزيم.

كانت نتائج اختبار فاعلية الانزيم بالمول عند 4 تراكيز من أيون الهيدروجين عند درجة حرارة ثابتة وهي 35 درجة مئوية للعزلات البكتيرية، اظهرت العزلتين AB.10 و AB.5 فروق معنوية ($P\leq0.01$) واضحة حيث سجلت العزلتين اعلى تركيز لسكر الجلوكوز المختزل 617 و606 على التوالي عند تركيز أيون الهيدروجين 6.5، في حين ان العزلة AB.7 كانت الأفضل بين جميع العزلات المختبرة بفرق معنوي عن باقي العزلات باستثناء العزلة AB10 والعزلة AB5 حيث سجلت 678 مول كناتج لسكر للجلوكوز المختزل عند درجة تركيز ايون الهيدروجين 5.5، يليهم العزلتين AB.10 و AB.5 عند نفس الدرجة بتركيز للجلوكوز المختزل قدر بحوالي 391.5 و332 على التوالي (الشكل 4)، هذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت بنشاط إنزيم السليولاز لأغلب أنواع البكتيريا على درجة حموضة مثالية تبلغ 6.5 ومستقرة في نطاق الرقم الهيدروجيني من (6-8) [43-44].

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك ارتباطاً بين درجات الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين حيث أظهرت العزلة البكتيرية *Pseudomonas fluorescens* تفوقا واضحاً عند تركيز أيون الهيدروجين 7 ودرجة حرارة 35 درجة مئوية حيث كان تركيز الجلوكوز 1037 مل مول مقارنة بالنتائج عند تركيز أيون الهيدروجين 6.5 وعند نفس درجة الحرارة حيث كان تركيز الجلوكوز المنتج 617 مل مول.



شكل 4. تأثير تركيز أيون الهيدروجين على تحلل السليلوز للعزلات البكتيرية وإنتاج السكر المختزل بالمول

3.2.3. اختبار بعض المضافات الغذائية

عامل مهم آخر يؤثر في إفراز البروتين في البكتيريا هو مصادر النيتروجين والكربون. يكون إنتاج الإنزيم مستقرا عند النسبة المثلى للكربون والنيتروجين، وجود مصدر النيتروجين الخارجي ضروري في والوسط المغذي، كما وجد أن استخدام مصادر النيتروجين العضوي مقارنة بالمصادر غير العضوية أكثر ملاءمة لإنتاج الحد الأقصى من السليولاز [40].

يمكن تضمين مصدر نيتروجين مختلف في الوسط المغذي لإنتاج السليولاز، من بينها النيتروجين العضوي التي يمكن استخدامه مثل الببتون، الخميرة، مستخلص اللحم البقري، التربتون أو وجبة فول الصويا، كما يمكن أيضا استخدام مصدر النيتروجين غير العضوي مثل كبريتات الأمونيوم، كلوريد الأمونيوم وفوسفات هيدروجين الأمونيوم كمصدر للنيتروجين [45].

العديد من الدراسات ذكرت أن الببتون هو مصدر جيد للنيتروجين لإنتاج السليولاز لما له من تأثير إيجابي جدا في إنتاج السليولاز للبكتيريا [46].

اختبرت في هذه الدراسة، تأثيرات بعض المضافات الغذائية إلى وسط النمو CMC على إنتاج إنزيم السليولاز، وقد أظهرت النتائج (الشكل 5)، إن إضافة 10 جرامات/لتر من سكر المالتوز أظهر فروق معنوية عند ($P\leq0.01$)للعزلة البكتيرية AB.10 مقارنة بالشاهد، حيث كانت نسبة السكر المختزل 1243.5 مول مقارنة بالشاهد الذي كان 519 مول .

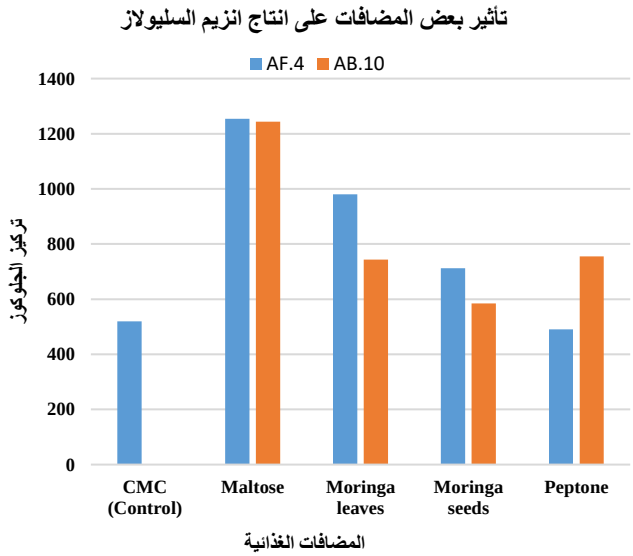
في هذه الدراسة أيضا أختبر إضافة الببتون (2.5 جرام/لتر) أظهر فاعلية وبفرق معنوي للعزلة البكتيرية AB10 حيث كان تركيز الجلوكوز المختزل 755 مول، هذا يتوافق مع بعض الدراسات، فافي الدراسة التي قام بها Lugani وآخرون[47]، كان نشاط إنزيم السليولاز أكثر وضوحا مع استخدام الببتون كمصدر للنيتروجين في وسط التخمير (3.51 وحدة/مل). كما وجد Paudel و Qin [48]، أن الببتون هو أفضل مصدر للنيتروجين لأقصى إنتاج للسليولاز لبكتيريا *Bacillus* العزلة Y3 وبكتيريا *Bacillus* العزلة K1.

التركيزات المختلفة لمصادر النيتروجين تؤثر إلى حد بعيد على إنتاج الإنزيم، حيث ذكر Robson و Chambliss [31]، أن أقصى إنتاج للسليولاز لبكتيريا *Enterobacter cloacae* كان بإضافة الببتون (2.0 ٪، وزن/حجم)، للوسط المغذي.

Irfanوآخرون [49]، أكد ان النيتروجين هو لبنة البناء الرئيسية للبروتينات وهو أحد المكونات الرئيسية للبروتوبلازم، وجد أن جميع مصادر النيتروجين، التي استخدمت في دراسته، دعمت إنتاج إنزيم السليولاز بما في ذلك NH_4Cl والبيبتون مما أدى إلى ارتفاع النشاط السليولاز في الوسط المغذي .

قيمت هذه الدراسة ايضاً مسحوق أوراق وبذور المورينجا كعامل محفز لإنتاج إنزيم السليولاز، أظهر إضافة 5 جرام/لتر من مسحوق أوراق المورينجا فروق معنوية عند ($P\leq0.01$) للعزلة البكتيرية AB10، حيث دعم العزلة بتحلل للسيللوز بمقدار 744 مول مقارنة بالشاهد، بينما مسحوق بذور المورينجا (5 جرام/ لتر) لم يظهر أي فاعلية في زيادة التحلل الانزيمي للعزلة البكتيرية فقد تقريبا مساويا للشاهد بدون اي فرق معنوي. مقارنة بالشاهد 519 مول (شكل 5).

لا توجد دراسات عن اختبار مسحوق أوراق وبذور المورينجا كعامل محفز لإنتاج السليولاز، إلا في الدراسة التي قام بها Vázquez-Montoya [50]، والتي تم فيها تقييم إنتاج السليولاز لفطر *Penicillium funiculosum* باستخدام قش المورينجا كمصدر للكربون، أظهرت النتائج تحسنا في الإنتاجية الحجمية للسليولازات التي كانت أعلى بمقدار 2.77 و8.26 و2.30 ضعفا بالنسبة Endoglucanase، Exoglucanase و β-Glucosidase على التوالي. ومن ثم يعتبر اختبار مسحوق أوراق وبذور المورينجا في هذه الدراسة الحالية الأول من نوعه والذي أعطى نتائج مقبولة في دعم إنتاج السليولاز للبكتيريا.



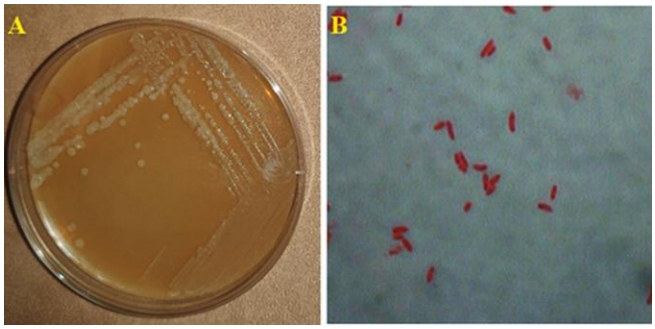
شكل 5. اختبار تأثير بعض المضافات الغذائية الى وسط النمو CMC على فاعلية الانزيم.

3.3. تعريف العزلة البكتيرية AB10

على أساس النشاط الأنزيمي، تم اختيار العزلة AB10 كأفضل عزلة حيث أظهرت أفضل مناطق تحلل بقياس قطر الهالات الشفافة وأيضا أظهرت افضلية كبيرة في المقياسات الإنزيمية، عرفت هذه العزلة بالطرق التقليدية (خصائصها المورفولوجية والمزرعية والكيموحيوية Biochemical Tests باستخدام The analytical profile index API)، كما وصفها دليل Benson 50؛ Bergey و Holt[51]، أيضا باستخدام تقنيات الأحياء الجزئية (تسلسل الحمض النووي الريبوزي 16S rRNA) الذي يعتبر من أهم طرق تعريف البكتيريا حيث استخدمت في تعريف العديد من أنواع البكتيريا المحللة للسليلوز [52]، عرفت العزلة AB10 على أنها *P. fluorescence*.

1.3.3. الخصائص المورفولوجية

لوحظ النمو البكتيري النقي للبكتيريا بعد 24 ساعة من الحضانة عند 35 درجة مئوية، حيث زرعت على وسط الأجار المغذي Nutrient agar ، وتم الفحص المورفولوجي للمستعمرات. كانت المستعمرات النموذجية للعزلة AB.10 شكليا، مستعمرات صغيرة، كريمي اللون، مقعرة، ذو حواف ملساء (الشكل A6)، أنتجت العزلة صبغة فلورية على King's B medium شوهدت هالات من أصباغ (صفراء) حول المستعمرات. يمكن ملاحظة مستعمرات الفلورسنت بسهولة تحت الأشعة فوق البنفسجية. باستخدام المعايير المظهرية، ظهر أن العزلة لا تكون أبواغ داخلية، سالبة لصبغة جرام (الشكل B6)، وباستخدام نظام API20NE ، حُدِّدَت العزلة مع نسبة عالية (99 ٪) على أنها *Pseudomonas fluorescens* (الجدول 3).



شكل 6. الخصائص المورفولوجية للمستعمرات للعزلة البكتيرية *Pseudomonas fluorescens* (A) Nutrient على وسط الأجار المغذي agar، صبغ جرام تحت قوة تكبير 1000 X (B).

جدول 3. تعريف بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* باستخدام نظام API20NE

Isolate	API 20NE					
	1st choice	% Id.	*T*-value	2nd choice	% Id.	*T*-value
AB.10	*P. fluorescens*	99.9	0.77	*P. aeruginosa*	0.1	0.07

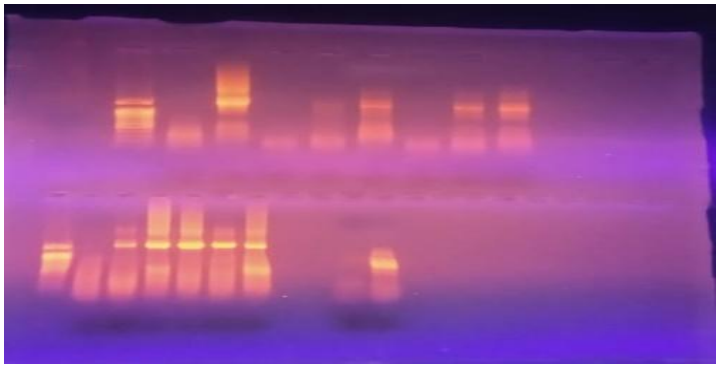
2.3.3. التعريف الجزيئي

1.2.3.3. تضخيم المنطقة 16S rRNA باستخدام PCR

التسلسل الجيني 16S rRNA هو الطريقة المستخدمة بشكل شائع للتمييز بين الأنواع البكتيرية وهو أحد الاستخدامات المحتملة الأكثر جاذبية

لمعلوماتية التسلسل الجيني 16S rRNA هو توفير وتأكيد تعريف الجنس والأنواع للعزلات البكتيرية التي لا تتناسب مع أي الاختبارات البيوكيميائية، او غير مؤكدة التعريف [52].

لتأكيد تعريف العزلات البكتيرية، أُجْري تحليل التسلسل الجيني (16S rRNA) بقسم الأحياء الدقيقة بجامعة المنار بتونس. ضُخِّمَت جينات الحمض النووي الريبي للعزلة البكتيرية كما تم ذكره في طرق البحث للعزلة التي أعطت أفضل النتائج في تحليل السليلوز (AB.10) ، وباستخدام جهاز الرحلان الكهربائي في هلام الاجاروس (شكل 7)، حُدد التسلسل الجيني (16S rRNA) بشكل واضح تحت الاشعة فوق البنفسجية للعزلة البكتيرية التي تم تعريفها (شكل 7).



شكل 7. الرحلان الكهربائي على 1.5 % لهلام الاجاروز للحمض الريبوزي المتسلسل (16S rRNA) للعزلة البكتيرية(AB.10) .

باستخدام المكتبة الوطنية للطب Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)، أظهرت العزلة AB.10 هوية 99.71٪ لبكتيريا (*Pseudomonas fluorescens*) وقد توافقت مع أكثر من عزلة في بنك الجينات. وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي استخدمت تقنيات الاحياء الجزئية باستخدام تسلسل الحمض النووي الريبوزي 16S rRNA لتعريف العديد من الأنواع البكتيرية المنتجة لإنزيم السليولاز والذي يعتبر من اهم طرق تعريف البكتيريا [52-57]

العزلة (AB.10) والتي عُرفت في هذه الدراسة على أنها *Pseudomonas fluorescens* أظهرت فاعلية كبيرة مقارنة بالعزلات البكتيرية الاخرى، أشارت العديد من الدراسات الى فاعلية *P. fluorescens*في تحلل السليلوز، وصنفت على انها أعلى منتج للسليولاز مقارنة بالأنواع البكتيرية الأخرى، ايضاً [39،58،59]، أيضا تتوافق مع النتائج التي تحصل عليها Sethi وآخرون [42]، التي تم فيها عزل *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis*، *E. coli*، *Serratia marcescens*، من التربة واختبار قدرتها في انتاج انزيم السليولاز، أظهرت النتائج أن بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* كانت الأكثر فاعلية كمنتج للسليولاز يليها *Bacillus subtilis* .

4.الاستنتاجات

عزِلَت سلالات مهمة من البكتيريا القادرة على إنتاج إنزيم السليولاز من التربة الليبية، والتي قد تدخل في العديد من الصناعات أهما الصناعات الغذائية، صناعة الأعلاف الحيوانية، الورق، النسيج ومساحيق الغسيل بالإضافة الى إنتاج الإيثانول الحيوي، والذي قد يدعم خفض نسبة التلوث البيئي. أظهرت العزلة البكتيرية(AB.10) قدرة كبيرة على إنتاج الإنزيم في اختبار المقايسة الإنزيمية والتي عُرِّفَت على أنها بكتيريا *Pseudomonas fluorescens*.

يقترح من خلال هذه الدراسة مزيدا من البحث في هذا المجال؛ مما يدعم مجال الصناعة للاستفادة من الكتلة الحيوية المهدورة كمصدر هام للسيليلوز.

5. المراجع

1. International Energy Agency, 2012. Oil in World in 2009. Country-code = 29. Accessed 11/14/2013.
2. Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J., Erbach, D. C. (2005). Biomass as Feedstock for A Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply; Department of Energy: Oak Ridge, TN, U.S. 79. pp.
3. Drożyner, P., Rejmer. W., Piotr Starowicz, P., Klasa, A., Skibniewska, K.A. (2013). Biomass as a renewable s of energy. Technical Sciences 16(3), 211–220.
4. Zhang, Y.H.P. and Lynd, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering. 88: 797–824.
5. Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., and Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. Carbohydr. Polym. 209, 130–144.
6. Kang, X., Kirui, A., Widanage, M. C. D., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J., and Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in

14. Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P. (2012). Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. Biofuels. 3 (4):463-477.
15. Delabona, P. D.S., Lima1, D. J., Robl1, D., Rabelo, S. C., Farinas, C. S., Pradella, J.G. da Cruz (2016). Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates J. Ind. Microbiol Biotechnol. 43: 617–626.
16. Apun, K., Jong, B.C. and Salleh, M.A. (2000). Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. Journal of General and Applied Microbiology. 46: 263-267.
17. Holt, J.G., Gieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins.
18. Thomas, L., Hari, R., Ved Pal, S. (2018). Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. Brazilian Journal of Microbiology. 49: 429–442.
19. Benson, H.J. (2001). Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology, Complete, McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 8th edition, 496. pp.
20. Logan, N.A. and Berkeley, R.C. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the API system. J Gen Microbiol. 130 (7): 1871-82.
21. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109: 6241–6246.

plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. Nat. Commun. 10 (1), 347.
7. Edye, L. A. and Doherty, W. O. S. (2008). Fractionation of a lignocellulosic material, 25, PCT International Application. Australian Plant Pathology Society.
8. Gonzalez-Gonzalez, M.R., Miranda- Lopez R. (2022). Cellulases, hemicellulases and ligninolytic enzymes: mechanism of action, optimal processing conditions and obtaining value-added compounds in plant matrices. MOJ Food Process Technols. 2022;10(1):30-37.
9. Ejaz. U., Sohail, M., Ghanemi. A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. Biomimetics (Basel). 6(3):44.
10. Kumar, S., Sharma, H.K. and Sarkar, B.C. (2011). Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid-state fermentation (SSF). Food Sci. Biotechnol. 20: 1289–1298.
11. Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., Seak, A., and Chua, M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. Biomass and Bioenergy. 67: 319–338.
12. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. (1999). “Solid state fermentation for the production of industrial enzymes”. Current science, 149-162.
13. Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, J.M. and Ashfaq, H. (2016). Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. Advances in Enzyme Research. 4: 44-55.

22. Silva, G.A.D., Bernardi, T.L., Schaker, P.D.C., Menegotto, M.M., Valente, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Braz Arch Biol Technol. 55:319–327.
23. Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. (2017). Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. PLoS ONE. 12(1): e0169877.
24. Patagundi, B.I., Shivasharan, C.T. and Kaliwal, B.B. (2014). "Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil," International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3 (5): 59-69.
25. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
26. Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S. and AnandRao, M. (2014). Applications Of Cellulases – Review. IJPCBS. 4 (2): 424-437.
27. Lone, M.A., Wani, M.R., Bhat, N.A., Sheikh. S.A. and Reshi A. (2012). Evaluation of cellulase enzyme secreted by some common and stirring rhizosphere fungi of *juglans regia* l. by DNS method. J. Enxyme Res. 3 (1): 18-22.
28. Septiani, D., Suryadi, H., Mun'im, A. and Ardoyo, W.M. (2019). Production of cellulase from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* mixed culture in carboxymethylcellulose medium as sole carbon. Biodiversitas. 20 (12): 3539-3544.
29. Maidul, I., Sarkar, P.K., Mohiuddin, A. and Suzauddula, M. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. Malaysian Journal of Halal Research Journal. 2 (2): 19-24.
30. Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Current Microbiology. 57(5): 503 507.
31. Robson, L. M., Chambliss, G. H. (1984). Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. Applied and Environmental Microbiology 47: 1039.
32. Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. International Journal of Environmental Science and Technology 3: 25–34.
33. Vu, V.H., Pham, T.A., Kim, K., 2011. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid-state fermentation. Mycobiol. 39: 20–25.
34. Yoshigi, N., Taniguchi, H., Sasaki, T. (1988). Purification and properties of a new endocellulase from *Robillarda* sp. Y. 20. Agric. Biol. Chem. 52 (6): 1389-1396.
35. Kurosawa, K., Hosoguchi, M., Hariantono. J., Sasaki, H. and Takao, S. (1989). Degradation of tough materials from *Corticium rolfsii*. Agric. Biol. Chem. 53 (4): 921-937.
36. Pirt, S.J., 1982. Principles of Cell cultivation. Blackwell Science Ltd; Illustrated edition. 284. pp.
37. Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr, S.A., Sharaf, M.S., and Hoda, H.M. (2009). Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3): 2429–2436.

38. Islam, F. and Roy, N. (2019). Isolation and Characterization of Cellulase producing Bacteria from Sugar Industry Waste. American Journal of BioScience. 7 (1): 16-24.
39. Bakare, M.K., Adewale, I.O., Ajayi, A., Shonukan, O.O. (2005).“Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*,” African Journal of Biotechnology, 4(9), 2005.
40. Ray, A.K., Bairagi, A., Ghosh, K.S. and Sen, S.K. (2007). Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and Bacillus circulans TP3 isolated from fish gut. Acta Ichthyologica et Piscatoria 37 (1): 47-53.
41. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H. Goswamu, V.K. and Chauhan, B. (2003). Microbial α-amylases: A biotechnological perspective, Proc. Biochem. 38: 1599-1616.
42. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L. and Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. ISRN Biotechnology. 2013: 1-7.
43. Kim, E. S., Lee, H. J., Bang, W. G., Choi, I. G. and Kim, K. H. (2009). Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Bioeng. 102: 1342-1353.
44. Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M. and Hassouna, N.A.H. (2008). “Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5,” Applied Biochemistry and Biotechnology. 150 (3): 305-325.
45. Ahmed, A., Nasim, F., Batool K. and Bibi A. (2017). Microbial β-Glucosidase: Sources, Production and Applications. J. Appl. Environ. Microbiol. 5 (1) :31- 46.
46. Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., and Goyal, A. (2011). Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus Subtilis* by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates. Enzyme Res. 1–8.
47. Lugani, Y., Singla, R., and Sooch, B. S. (2015). Optimization of Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus* sp. Y3. Journal of Bioprocessing & Biotechniques.10 (5) :11.
48. Paudel, Y. and Qin, W. (2015). Characterization of Novel Cellulase-producing Bacteria Isolated from Rotting Wood Samples. Appl Biochem Biotechnol. 177 (5): 1186-98.
49. Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q. (2014). One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* IR05 in solid state fermentation. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 7: 317–326.
50. Vázquez-Montoya E. L, Castro-Ochoa L. D, Maldonado-Mendoza I. E, Luna-Suárez S, Castro-Martínez C (2019) Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. Revista Argentinade Microbiología, 52(1): 4-12.
51. Bergey, D.H. and Holt John, G. (1994). Bergey’s manual of determinative bacteriology, Baltimore: Williams and Wilkins. Ninth edition. Williams & Wilkins, Baltimore.787. pp.
52. Mignard, S. and Flandrois, J. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. Journal of Microbiological Methods 67 (3): 574-581.
53. Zhang, Y.H.P., Hong, J. and Ye, X. (2009). Cellulase assays. Methods Mol Biol 581: 213–231.
54. Khoirunnisa, N.S., Anwar, S. and Santosa, D.A. (2020). Isolation and selection of cellulolytic

bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell. 21 (4): 1686-1696.

55. Abdel-Aziz1, S.H., Ibrahim, A.M., Guirgis, A. A., Dawwam, G.E. and Elsababty, Z.E. (2021). Isolation and screening of cellulase producing bacteria isolated from soil. Benha Journal of Applied Sciences (BJAS) (6) (3-2): 207-213.
56. Akintola AI, Oyedeji O, Adewale IO, Bakare MK (2019) Production and physicochemical properties of thermostable ,crude cellulase from *Enterobacter cloacae* ip8 isolated from plant leaf litters of *Lagerstroemia indica* linn. Microbiology 4: 989-994.
57. Bhagat, S.A. and Kokitkar, S.S. (2021). Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 9 (6): 154-161.
58. Braithwaite, K.L., Black, G.W., Hazlewood, G.P, Ali, B.R. and Gilbert, H.J. (1995). A non-modular endobeta- 1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. Biochemical Journal. 305 (3): 1005-10.
59. Yamane, K., Suzuki, H. and Nisizawa, K. (1970). Purification and Properties of Extracellular and Cell-Bound Cellulase Components of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulosa. Journal of Biochemistry, 67, 19-35.