

إنتاج إنزيم السيلولاز من عزلات محلية من البكتريا جنس *Streptomyces* وتحسين فعاليته باستخدام التطهير بالأشعة فوق البنفسجية

سهى حبيب

مدرس ، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة حلب، حلب، سوريا

* للمراسلة Suha.habib@alepuniv.edu.sy

ORCID : <https://orcid.org/0009-0001-1430-8749>

الملخص

تم في هذه الدراسة انتخاب 19 عزلة مختلفة من البكتريا التابعة لجنس *Streptomyces* المشخصة مسبقاً، بهدف تقييم مقدرتها على إنتاج السيلولاز المسؤول عن التحلل الحيوي للسليولوز وتقدير فعاليته الأنزيمية وفقاً لطريقة ميلر، بينت الدراسة كفاءة متفاوتة لأغلب العزلات المستخدمة بناءً على قيم مؤشر التحلل السيلولوزي، باستخدام وسط يحتوي على CMC وصبغة أحمر الكونغو، وعند تقدير الناتج بالطريقة اللونية باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 575 نانومتر. أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين العزلات المستخدمة في الدراسة، وكان أفضل إنتاج للإنزيم من قبل النوع *Streptomyces fluorescens* حيث بلغت فعاليته الإنزيمية 0.292 وحدة/مل.

بتطبيق عملية التطهير على البكتريا *Streptomyces fluorescens* باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (254 نانومتر) على ارتفاع 10 سم من الأطباق، تم الحصول على 65 عزلة/ مستعمرة طافرة مقاومة للأشعة فوق البنفسجية. كما بينت النتائج تفاوت العزلات/ المستعمرات الطافرة في إنتاج الإنزيم، مع تفوق العزلة/ المستعمرة الطافرة رقم 6 في الزمن 1.5 دقيقة على باقي الطفرات، حيث بلغت الفعالية الإنزيمية للسيلولاز المنتج منها 0.384 وحدة/مل، بزيادة في إنتاج الإنزيم بنسبة 31.5% مقارنة مع البكتريا الأصلية.

الكلمات المفتاحية: استخلاص، سيلولاز، *Streptomyces*، تقدير فعالية، تطهير بوساطة الأشعة فوق البنفسجية.

ورد للنشر بتاريخ 2026 / 8 / 9

قبل للنشر بتاريخ 2026 / 10 / 11

Study of Cellulase production by local isolates of *Streptomyces* and UV mutants influence on its activity

Suha habib

Assistant Professor, Department of food science, Faculty of agriculture, Aleppo University, Aleppo, Syria

(*) Corresponding Author: suha.habib@alepuniv.edu.sy

ORCID : <https://orcid.org/0009-0001-1430-8749>

Abstract

In this study, 19 isolates of previously identified as *Streptomyces*, were selected to evaluate their ability to produce cellulase, the enzyme responsible for cellulose biodegradation. A large proportion of the isolates showed varying efficiency based on the cellulolytic index values using a medium containing CMC and Congo red dye. The enzyme activity was then assessed according to Miller's method, and the yield was determined colorimetrically using a spectrophotometer at a wavelength of 575 nm. The results showed significant differences between the isolates, with the highest enzyme production observed in *Streptomyces fluorescens*, achieving an enzyme activity of 0.292 U/mL .

By applying a mutagenesis process to *Streptomyces fluorescens* using ultraviolet light (254 nm) at a height of 10 cm from the plates, 65 UV-resistant mutants were obtained. The mutants varied in enzyme production, but mutant number 6 at an exposure time of 1.5 minutes outperformed the others, producing cellulase with an enzyme activity of 0.384 U/mL, representing a 31.5% increase in enzyme production compared to the original bacteria.

Key words: Extraction, Cellulase, *Streptomyces*, Enzymatic activity- Mutagenesis.

Received: 9 / 8 /2026

Accepted: 11/ 10 /2026



© 2026 Author(s). This article is licensed under CC BY-NC-SA 4.0 Open Access License.

1. المقدمة:

تعد الإنزيمات عوامل محفزة ذات طبيعة بروتينية، كما أنها مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية لإستمرار الحياة، تمتلك الإنزيمات دوراً هاماً في كافة مجالات الحياة فهي تستخدم في صناعة العصائر والمعجنات والأدوية والمنظفات (Novozymes, 2004). يعد السيلولاز واحد من أهم الإنزيمات الصناعية والغذائية، وهو عبارة عن مجموعة من الانزيمات تسمى أحياناً Cellulases تتضمن ثلاث انزيمات تساهم مجتمعة في تكسير الأصرة الغلايكوسيدية β 1-4 والانزيمات الثلاث هي β -غلوكوزيداز، endo-1,4- β -D- glucanase (إندوجلوكاناز)، exo-1,4- β -D-glucanase (إكسوجلوكاناز) (عبد الهادي وآخرون، 2012)

وقد احتل الإنزيم تقريبا حوالي 75% من الانزيمات الصناعية التي استخدمت لأغراض التحلل المائي وتحلل المواد الطبيعية المعقدة كما يعد المكون الرئيسي للكتلة الحيوية النباتية (Singhania, 2011)، وهو ينتمي إلى إنزيمات الحلمة التي تحلل السيلولوز، كما أنه من الانزيمات المهمة ليس فقط لتطبيقاته الفعالة في الصناعات المختلفة، ولكن لدوره الهام في التحويل الحيوي للمخلفات الزراعية الى سكر وإيثانول (Ezea, 2025) والسيلولوز هو عديد سكر غلوكوز متوفر بشكل جيد في النباتات، رخيص الثمن ومورد متجدد للطاقة (Khaleel et al., 2018)

ويتكون السيلولاز من مجموعة معقدة من الانزيمات التي تفرزها مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة، بما في ذلك البكتيريا والفطريات. تلعب هذه الانزيمات دورا في التحلل المائي للمواد السيلولوزية (Ugras et al., 2024). أهم التطبيقات الصناعية الرئيسية للسيلولاز استخدامه في صناعة النسيج وفي منظفات الغسيل المنزلية لتحسين نعومة النسيج والسطوع إضافة لاستخدامه في الأعلاف الحيوانية لتحسين نوعية التغذية وزيادة قابلية الهضم، كذلك في معالجة عصائر الفاكهة، والخبز (Ponnambalam et al., 2011)، إضافة إلى ذلك، تشارك إنزيمات السيلولاز في التحلل المائي للسيلولوز وتحويل المواد العضوية المتوفرة إلى منتجات ذات أهمية كبيرة تجارياً، كما يسعى الباحثين لإنتاج الإيثانول الحيوي والعديد من المنتجات الحيوية في تغذية الحيوانات وغيرها من المواد الكيميائية عالية القيمة (Barros et al., 2010) ونظراً لأهمية التجارية والصناعية والغذائية لإنزيم السيلولاز، كونه الأساس لتحويل المواد النباتية الصلبة إلى موارد حيوية، "، إضافة لدوره الكبير في إدارة النفايات حيث يساهم بكفاءة في التخلص من النفايات الورقية والزراعية بشكل مستدام كبديل للعمليات الكيميائية الضارة بالبيئة، ولعدم وجود دراسات محلية كافية تتعلق بإنتاج هذا الإنزيم من بكتريا *Streptomyces*، فقد تمثلت أهداف البحث بما يلي:

- 1- إنتاج السيلولاز من بكتريا *Streptomyces* وتقدير فعاليته الأنزيمية.
- 2- تحسين الفعالية الإنزيمية عن طريق التطهير بوساطة الأشعة فوق البنفسجية.

2. الدراسة المرجعية:

تُعد إنزيمات السيلولاز من أهم الإنزيمات الصناعية والغذائية، نظراً لدورها الرئيسي في التحلل المائي للسيلولوز، وهو المكون الرئيسي للكتلة الحيوية النباتية، مما يجعلها أداة أساسية في تحويل المخلفات الزراعية إلى سكريات قابلة للتخمر وإيثانول حيوي (Ezea, 2025; Khaleel et al., 2018). وعلى الرغم من تواجد السيلولاز في مصادر نباتية وحيوانية، إلا أن الإنتاج التجاري الفعال يعتمد بشكل شبه كلي على المصادر الميكروبية، وذلك لسهولة التحكم بظروف الإنتاج وإمكانية تطوير السلالات المنتجة باستخدام تقانات التخمر الحديثة (Tahtamouni et al., 2006).

من هنا، تبرز بكتيريا جنس *Streptomyces* (التابعة لمجموعة الأكتينومايسيتات) كأحد أهم المصادر الميكروبية لإنتاج هذا الإنزيم، بسبب انتشارها الواسع في التربة والنظم الإيكولوجية البحرية ودورها الفعال في تدوير المواد العضوية (Vinogradova and Kushnir, 2003; El-Sersy et al., 2010). وقد أكدت العديد من الدراسات قدرة هذا الجنس على إنتاج السيلولاز بفعاليات متفاوتة تعتمد على النوع والظروف البيئية. ففي دراسة، تم عزل السلالة *Streptomyces longispororuber* من التربة، وبلغت إنتاجيتها للإنزيم في وسط سائل يحتوي على CMC قيمة 8.5 وحدة/مل بعد 96 ساعة من الحضنة (Yassien et al., 2014). وفي سياق مشابه، تمكنت دراسة أخرى من الحصول على 165 عزلة من بكتيريا *Streptomyces* منتجة للسيلولاز، تراوحت إنتاجيتها ما بين 0.147 و 0.651 وحدة/مل، وكانت أعلى إنتاجية للنوع *S. coelicoflavus* (Mery et al., 2021). كما عُزيت هذه الفروق في الإنتاجية إلى الاختلافات الجينية بين السلالات، إضافة إلى تأثيرها بعوامل بيئية محددة مثل درجة الحموضة ودرجة الحرارة، وهو ما تم توثيقه في أحد الدراسات التي أظهرت أن الظروف المثلى لإنتاج السيلولاز من *Streptomyces* تكون عند pH=6 ودرجة حرارة 35 °م (Evelyn et al., 2016).

وبهدف زيادة إنتاجية السلالات البرية، اتجهت الأبحاث الحديثة إلى تطبيق تقنيات التطهير (الطفرات المستحثة) بهدف تحسين الإنتاج الإنزيمي، وكانت الأشعة فوق البنفسجية إحدى الأدوات الفعالة في هذا المجال. فقد أظهرت دراسة حديثة على فطر *Trichoderma* أن تعريضه للأشعة فوق البنفسجية (بطول موجة 254 نانومتر) ولمدة 4 دقائق وعلى مسافة 4 سم أدى إلى إعطاء سلالات مطفرة وقادرة على إنتاج السيلولاز بمقدار يتراوح بين 1.4 و 1.9 ضعفاً مقارنة بالسلالة الأم (Seungjun et al., 2025). كما أثبتت دراسة أخرى على بكتيريا *Streptomyces* أن التطهير بالأشعة فوق البنفسجية، وكذلك بأشعة غاما (جرعة 4 كيلو غراي)، يمكن أن يحقق زيادة في الإنتاج الإنزيمي تصل إلى 1.31 ضعفاً عن السلالة الأصلية (Mery et al., 2021).

بناءً على ما سبق، يتضح أن جنس *Streptomyces* يمثل مورداً واعداً لإنتاج السيلولاز، وأن التطهير بالأشعة فوق البنفسجية يُعد أسلوباً استراتيجياً واعداً لتعزيز هذه الإنتاجية. ومع ذلك، ونظراً لندرة الدراسات المحلية التي تطرقت لهذا الموضوع في البيئة السورية، جاء هذا البحث بهدف تقييم قدرة عزلات محلية من *Streptomyces* على إنتاج السيلولاز، ومحاولة تحسين فعاليتها الإنزيمية عبر التطهير بالأشعة فوق البنفسجية.

3. مواد البحث وطرائقه:

1.3. العزلات البكتيرية:

استخدمت في هذه الدراسة 19 عزلة محلية (I1 - I2 - I3 - - I19) من بكتريا *Streptomyces* spp.، المشخصة مسبقاً (تم توصيف العزلات الجرثومية مسبقاً وفق دليل Bergry اعتماداً على الصفات المزرعية والمجهرية، والاختبارات الحيوية الكيميائية) (Habeeb, 2009) كما هو موضح في جدول (1). تم تنشيط العزلات باستخدام الوسط التركيبي التالي (20 غ نشاء ذواب، 1 غ KNO_3 ، 0.5 غ NaCl، 0.5 غ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.5 غ K_2HPO_4 ، 15 مغ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و 20 غ آغار في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7 ثم عقم) (Bahrim et al., 2010).

الجدول (1) العزلات البكتيرية المستخدمة في اختبار انتاج انزيم السيلولاز

العزلة	النوع البكتيري	العزلة	النوع البكتيري
I1	<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	I11	<i>Streptomyces fluorescens</i>
I2	<i>Streptomyces hirsutus</i>	I12	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>
I3	<i>Streptomyces microflavus</i>	I13	<i>Streptomyces cyanoglomerus</i>
I4	<i>Streptomyces acrimycini</i>	I14	<i>Streptomyces piedadensis</i>
I5	<i>Streptomyces janthinus</i>	I15	<i>Streptomyces albochromogenes</i>
I6	<i>Streptomyces spheroids</i>	I16	<i>Streptomyces rubrolavendulae</i>
I7	<i>Streptomyces flaveolus</i>	I17	<i>Streptomyces coerulatus</i>
I8	<i>Streptomyces caracoï</i>	I18	<i>Streptomyces coeliatus</i>
I9	<i>Streptomyces cyanoalbus</i>	I19	<i>Streptomyces indigocolor</i>
I10	<i>Streptomyces sp.</i>		

2. 3. انتخاب النوع البكتيري المنتج للسيلولاز:

تم إنشاء حفر بأقطار 0.5 سم بواسطة الثاقب الفليني في الاطباق البترية الحاوية على الوسط التركيبي السابق مضافا اليه 1% CMC، وتم تلقيحها بالمعلق الجرثومي لعزلات بكتريا *Streptomyces* السابقة. تم تحضين الاطباق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37°م، غمرت الاطباق في محلول مائي يحتوي على صبغة أحمر الكونغو 0.1% لمدة 30 دقيقة ثم غسلت الاطباق بمحلول كلوريد الصوديوم 1M لمدة 10 دقائق لإزالة بقايا الصبغة. تم ملاحظة مناطق التحلل المائي التي تبدي هالات شفافة حول المستعمرات وتم حساب مؤشر تحلل السيلولوز لتحديد النشاط الأنزيمي وفق المعادلة التالية:

معادلة حساب مؤشر التحلل السيلولوزي (CI):

$$CI = \left(\frac{\text{قطر منطقة التحلل السيلولوزي كاملة} - \text{قطر المستعمرة البكتيرية}}{\text{قطر المستعمرة البكتيرية}} \right)$$

صنف نشاط البكتيرية استناداً إلى قيمة CI، حيث اعتبر النشاط منخفض عند $CI > 1$ ، متوسط عند $CI = 1$ او مرتفع في حال $CI < 1$ (Gautam et al., 2012) (Shaikh et al., 2013)

3.3. استخلاص إنزيم السيلولاز من بكتريا Streptomyces :

تم إنتاج الإنزيم من البكتيريا المختبرة كما وصفها El-Sersy وآخرون (2010). حيث تم إعداد معلق بوعي من البكتريا المدروسة بعمر 4 إلى 5 أيام في محلول ملحي عادي (0.85% محلول كلوريد الصوديوم) واستخدم كلقاح بتعداد نهائي 10^3 خلية/مل في 50 مل كربوكوكسي ميثيل سليولوز (CMC) في الوسط السائل (1.0 غ KH_2PO_4 ، 0.5 غ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.5 غ NaCl ، 0.01 غ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.01 غ $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.3 غ NH_4NO_3 ، 10 غ CMC، لكل لتر ، pH=7) . تم توزيع الأوساط مع المعلقات البكتيرية في دوارق سعتها 250 مل وتم وضعها في حاضنة هزازة (Shaking incubater) بسرعة 250 دورة في الدقيقة و حرارة 30°م لمدة 96 ساعة (4 أيام)، طرد الناتج مركزياً بمثقلة على سرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة، أخذت الرشاحة الحاوية على المستخلص الأنزيمي ثم حددت فعالية إنزيم السيلولاز لبكتريا Streptomyces. قيس الامتصاصية عند طول موجة 575 نانومتر في جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) مقابل محلول الشاهد (Blank) الحاوي على جميع المواد ما عدا محلول الإنزيم.

تعرف وحدة فعالية الإنزيم (Unit) بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومولاً واحداً من الغلوكوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة، لكن لتقدير فعالية إنزيم السيلولاز الناتج يجب أولاً التوصل إلى معادلة المنحنى القياسي للغلوكوز، ومنها يستخرج تركيز الغلوكوز المتحرر بفعل الإنزيم بالاستعانة بذلك المنحنى القياسي لمحلول الغلوكوز.

4.3. تقدير فعالية إنزيم السيلولاز :

قدر نشاط وفعالية إنزيم السيلولاز وفقاً لطريقة Miller (1959). (1.8 مل 0.5% CMC في 50 mM فوسفات الصوديوم الموقى (pH 7.0) أضيف له 0.2 مل من المستخلص الأنزيمي الخام وحضن عند حرارة 50°م في حمام مائي لمدة 30 دقيقة) ثم أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من كاشف حمض 3,5-dinitro-salicylic (DNS) يتغير اللون عن طريق الغليان لمدة 5 دقائق. أمكن قياس شدة اللون بالمطياف الضوئي spectrophotometer بطول موجي مقداره 575 نانومتر مقارنة بالشاهد blank يحوي على جميع الكواشف باستثناء الإنزيم الخام. فسرت النتائج من حيث نشاط الإنزيم الذي تم فيه تعريف وحدة الإنزيم Unit بأنها كمية الإنزيم الذي يحرر 1 ميكرومول من السكر المختزل (الغلوكوز) خلال دقيقة واحدة من ظروف التفاعل.

5.3. التطهير بالأشعة فوق البنفسجية:

استخدم مصباح ذو إشعاع بطول موجة 254 نانومتر كمصدر للأشعة فوق البنفسجية بطاقة 30W. حضر معلق بوعي من أطباق بعمر عشرة أيام للنوع البكتيري Streptomyces fluorescens ضمن محلول ملحي (0.85% NaCl)، زرعت تخافيف من المعلق البكتيري حتى التمديد 10^{-6} ، نشر هذا المعلق في أطباق حاوية على وسط Gausa agar ، عرضت الأطباق بعد نشر المعلق البكتيري عليها مباشرة إلى الأشعة فوق البنفسجية UV بطول موجة 254 نانومتر لفترات زمنية متتالية (0-30-60-90-120-150)

(270 sec - 240-210-180 ومن ارتفاع 10 سم، من ثم حفظت الأطباق في الظلام لمدة ساعة لتثبيت الطفرات المستحدثة وضمان عدم قيام الخلايا بتصحيح الطفرات قبل الانقسام (الإصلاح الضوئي)، بعدها حضنت الأطباق عند حرارة 30 م° لمدة ثلاثة أيام (Abdel-Aziz et al., 2011)، لاحقاً تم اختيار المستعمرات الناجية بعد التشعيع وفحص نشاط السيلولاز لديها، ثم اعتُبرت السلالات ذات النشاط المتغير سلالات طافرة محتملة.

6.3. التحليل الإحصائي:

تم التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS حيث اجري تحليل التباين الأحادي one way anova واختبار tukey HSD حيث حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات لكل عذلة وكذلك لكل زمن تظفير، مع تعيين الفروق المعنوية عند مستوى دلالة 1% باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS الاصدار 18.

4. النتائج والمناقشة:

1.4. نتائج انتخاب البكتيريا من حيث قدرتها على تحليل السيلولوز:

الجدول (2): مؤشر التحلل السيلولوزي لبكتيريا *Streptomyces* المدروسة.

النوع البكتيري المدروس	مؤشر التحلل السيلولوزي
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	0.002±0.812 ^d
<i>Streptomyces hirsutus</i>	0.0015±0.091 ^l
<i>Streptomyces microflavus</i>	0.001±2.119 ^a
<i>Streptomyces acrimycini</i>	0.002±0.213 ⁱ
<i>Streptomyces janthinus</i>	0.001±0.917 ^c
<i>Streptomyces spheroids</i>	0.002±0.227 ⁱ
<i>Streptomyces flaveolus</i>	0.002±0.265 ^h
<i>Streptomyces caracoi</i>	0±0.114 ^k
<i>Streptomyces cyanoalbus</i>	0.002±0.088 ^l
<i>Streptomyces sp.</i>	0±0 ^m
<i>Streptomyces fluorescens</i>	0.144±1.912 ^b
<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	0±0 ^m
<i>Streptomyces cyanoglomerus</i>	0.125±0.647 ^e
<i>Streptomyces piedadensis</i>	0.0036±0.113 ^k
<i>Streptomyces albochromogenes</i>	0±0 ^m
<i>Streptomyces rubrolavendulae</i>	0.0036±0.568 ^f
<i>Streptomyces coerulatus</i>	0.00360±0.654 ^e
<i>Streptomyces coeliatus</i>	0.00472±0.287 ^g
<i>Streptomyces indigocolor</i>	0.0076±0.145 ^j

تشير الحروف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية بين المكررات بينما تم ترتيب الحروف ابجدياً بحسب افضلية العزلة من حيث انتاج اكبر من السيلولاز وقطر هالة اكبر .

يتضح من الجدول رقم (2) أن غالبية الأنواع البكتيرية المدروسة قادرة على تحليل السيلولوز، حيث اتضح أن ستة عشر نوع قادر على إنتاج الإنزيم بينما الأنواع الثلاثة المتبقية لم يكن لها أي قدرة على إنتاج الإنزيم، ويعود ذلك بسبب التكيف البيئي لبكتيريا *Streptomyces* التي تنتمي إلى شعبة *Actinomycetota*، وهي كائنات رمية تعيش بشكل أساسي في التربة. تشكل المخلفات النباتية المصدر الرئيسي للكربون في بيئتها. وللبقاء والنمو في هذه البيئة الغنية بالسيلولوز، كان من الضروري تطوراً أن تكتسب هذه البكتيريا القدرة على إفراز إنزيمات السيلولاز لتفكيك هذا البوليمر المعقد وتحويله إلى سكريات بسيطة قابلة للامتصاص، إضافة إلى التنوع الجيني والبنية البروتينية المتطورة حيث تمتلك *Streptomyces* جينات تشفر العديد من إنزيمات تحلل الجليكوزيد (GH) المسؤولة عن تحليل السيلولوز، مثل GH44، GH12، GH9، GH6، GH5، و GH48. هذا التنوع يمنحها مرونة وقدرة عالية على التكيف مع أنواع مختلفة من ركائز السيلولوز (Munisamy et al., 2025).

2.4. نتائج اختبار احمر الكونغو لفحص البكتيريا المنتجة لمستخلص السيلولاز:

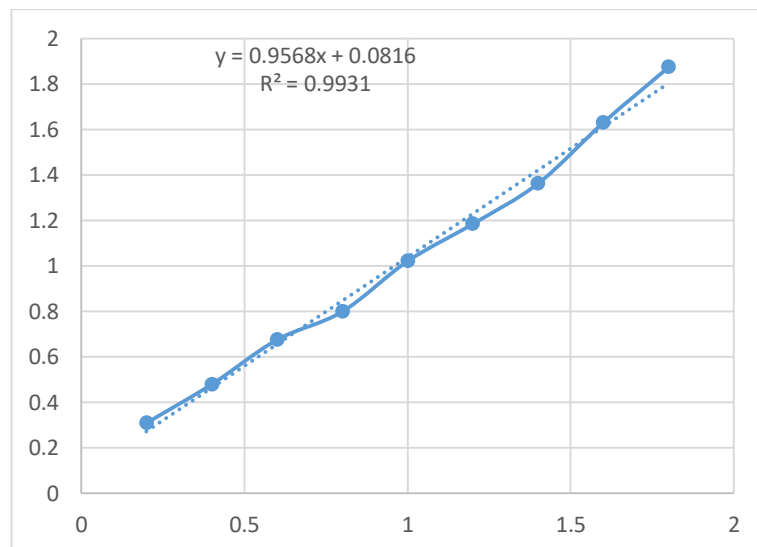
من الجدول رقم (2) نلاحظ وجود فروق معنوية واضحة بين العزلات البكتيرية، حيث بلغت P value <0.001 لكل من قطر المستعمرة، وقطر الهالة، وقيمة مؤشر التحلل. يشير ذلك إلى أن الاختلافات حقيقية وليست ناتجة عن الصدفة. حيث أظهرت 16 عزلة من العزلات المدروسة قدرتها على إنتاج السيلولاز، وذلك بناءً على نتائج اختبار احمر الكونغو، وسجل النوع *Streptomyces microflavus* أعلى قيمة لمؤشر التحلل (2.119)، مما يدل على نشاط سيلولوزي مرتفع. تلاه النوع *Streptomyces fluorescens* بنشاط متوسط (1.912) يليه النوع *Streptomyces janthinus* بنشاط بلغ (0.917).



الشكل (1): منطقة التحلل على أوساط الفحص بعد الصبغ بصبغة أحمر الكونغو، والناتجة عن تحلل السيلولوز بواسطة العزلات البكتيرية في أوساط تحتوي على 1% من مادة CMC

3.4. قياس فعالية الإنزيم: رسم المنحنى القياسي لقيم الامتصاصية مقابل تركيز الجلوكوز بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز حيث يلاحظ من الجدول وجود فروق معنوية بين تراكيز الجلوكوز على مستوى ثقة 1% بعد استخدام تحليل التباين ANOVA وباستخدام أقل فرق معنوي، حيث بلغت أدنى قيمة للامتصاصية

0.31 للتركيز 0.1 ميلي مول، بينما بلغت أعلى قيمة 0.876 للتركيز 2 ميلي مول من سكر الغلوكوز . كما موضح بالشكل رقم (2)



الشكل (2): المنحنى القياسي لتركيز الغلوكوز

Y: قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 575 نانومتر ، X: تركيز الغلوكوز $\mu\text{g/ml}$

قيست كمية الغلوكوز الناتجة عن تحول السليلوز بوجود إنزيم السيلولاز بالطريقة اللونية باستخدام المطياف الضوئي وعلى طول موجة 575 نانومتر بالمعادلة التالية:

$Y = 0.9568X + 0.0816$ بمعنوية $P > 0.001$ ، كما كان معامل الانحدار معنوياً ($P > 0.001$) ومعامل التحديد $R^2 = 0.9931$ أي أن تركيز الغلوكوز مسؤول عن 99% من الامتصاصية الناتجة، من ثم قدرت الفعالية الإنزيمية للعزلات وتم الكشف عن تركيز الغلوكوز الناتج عنها وفق طريقة ميلر (1959) وبلاستعانة بالمنحنى القياسي لتركيز الغلوكوز.

يبين الجدول رقم (2) الفعالية الإنزيمية للبكتريا المختبرة (16 عزلة) مقدرة بـ (وحدة/مل)، حيث بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية في الفعالية الإنزيمية للبكتيريا المدروسة حيث بلغت أعلى قيمة للفعالية 0.292 وحدة/مل للعزلة I11 المصنفة ضمن النوع *Streptomyces fluorescens* ، بينما كانت أدنى قيمة 0.091 وحدة/مل للعزلة I19 المصنفة ضمن النوع *Streptomyces indigocolor* ، وبلغ المتوسط العام الكلي للفعالية الإنزيمية للعزلات 0.178 وحدة/مل.

تفوق النوع *Streptomyces fluorescens* معنوياً على باقي العزلات بإنتاجيته، لذلك تم اختياره لتطبيق عملية التطفير، حيث بلغت فعاليتها الإنزيمية 0.292 وحدة/مل، بينما تراوحت فعالية بقية العزلات ما بين 0.091 - 0.239 وحدة/مل كما هو موضح في الجدول رقم (3).

الجدول (3): الفعالية الإنزيمية لأنواع *Streptomyces* مقدرة بالوحدة/مل

النوع البكتيري	الفعالية الانزيمية وحدة/مل
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	0.152
<i>Streptomyces hirsutus</i>	0.091

0.116	<i>Streptomyces microflavus</i>
0.129	<i>Streptomyces acrimycini</i>
0.102	<i>Streptomyces janthinus</i>
0.115	<i>Streptomyces spheroids</i>
0.161	<i>Streptomyces flaveolus</i>
0.149	<i>Streptomyces caracoi</i>
0.126	<i>Streptomyces cyanoalbus</i>
0.292	<i>Streptomyces fluorescens</i>
0.154	<i>Streptomyces cyanoglomerus</i>
0.158	<i>Streptomyces piedadensis</i>
0.163	<i>Streptomyces rubrolavendulae</i>
0.107	<i>Streptomyces coerulatus</i>
0.151	<i>Streptomyces coeliatus</i>
0.239	<i>Streptomyces indigocolor</i>

توافقت نتائج دراستنا مع ماتوصل إليه (Mery et al., 2021) من حيث قيم الفعالية الانزيمية، ويرجع اختلاف أنواع بكتيريا (*Streptomyces*) في إنتاج إنزيم السيلولاز إلى الاختلافات الجينية والسلالة حيث تمتلك كل سلالة تسلسلاً وراثياً خاصاً يتحكم في "كفاءة التعبير الجيني" للإنزيم كما تلعب ظروف الوسط (درجة الحرارة ودرجة الحموضة) دوراً كبيراً في هذا الأمر.

4.4. نتائج تطهير العزلة:

أدى التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية للنوع *Streptomyces fluorescens* ، من ارتفاع 10 سم بفترات زمنية متزايدة، ومن ارتفاع 10 سم إلى انخفاض معدل البقاء بشكل تدريجي مع زيادة فترة التعرض للإشعاع بـ UV كما هو موضح في الجدول رقم (4)، حيث كان البقاء 26.5% عند الزمن 30 ثانية، بينما انخفض هذا المعدل بشكل ملحوظ عند فترات التشعيع 60 و 90 و 120 و 150 و 180 و 210 و 240 و 270 ثانية على التوالي لتصبح هذه النسبة 23.5 و 19.1 و 11.8 و 7.35 و 4.4 و 2.94 و 1.47 و 0% على التوالي وبالتالي الزمن 270 هو زمن القتل ثانية عند الظروف المطبقة حيث لم تتمكن أي طفرة من النمو. وهذا يتوافق مع (Abdel-Aziz et al., 2011) حيث ينخفض عدد المستعمرات تدريجياً مع الزيادة التدريجية لفترة التعرض للإشعاع، بسبب تأثير الأشعة فوق البنفسجية على DNA البكتيريا فهي تسبب طفرات قاتلة أو تعطي طفرات تؤدي إلى تثبيط إنتاج البروتينات الضرورية لحياة الخلية (Kieser et al., 2000)

الجدول (4): معدل البقاء لبكتيريا *Streptomyces fluorescens* بعد تعرضها للأشعة فوق البنفسجية

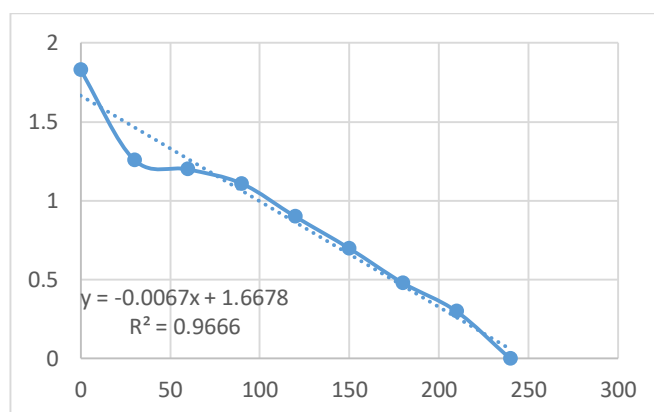
Survival معدل البقاء	الارتفاع	زمن التعرض	للأشعة/ ثانية
%	سم		
100	10	0	
26.5	10	30	

23.5	16	10	60
17.6	12	10	90
11.8	8	10	120
7.35	5	10	150
4.4	3	10	180
2.94	2	10	210
1.47	1	10	240
0	0	10	270

يتمثل تأثير الأشعة فوق البنفسجية (طول موجة 200 - 300 نانومتر) على تعطيل آليات إصلاح الحمض النووي العادية، مما يؤدي إلى حدوث طفرات جينية أثناء انقسام الخلايا (Hironobu and Tetsuya, 2011)

وهذا ما تم تأكيده في دراسة (Mery et al., 2021) فتعرض أبواغ *Streptomyces* لجرعات محددة من الأشعة فوق البنفسجية يؤدي إلى ظهور سلالات طافرة (Mutants) ذات كفاءة أعلى في إفراز إنزيمات السيولاز مقارنة بالسلالة الأصلية.

يبين الشكل (3) زمن قتل خلايا *Streptomyces fluorescens* اعتماداً على لوغاريتم عدد المستعمرات المتبقية بعد التطهير للأزمة المدروسة، والمعادلة الناتجة عن الخط المستقيم هي $y = -0.0067x + 1.6678$



الشكل (3) لوغاريتم عدد المستعمرات نسبة إلى زمن التعرض لأشعة UV

تمت المقارنة بين الطفرات (65 طفرة) في متوسط الفعالية الإنزيمية وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD وذلك على مستوى الدلالة الإحصائية %0.01 باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS.18، كما هو مبين في الجدول رقم (4)، وقورنت الإنتاجية الإنزيمية للعزلات الطافرة مع السلالة الأصلية

Streptomyces fluorescens مع حساب النسبة المئوية لزيادة الإنتاجية في الطفرات المتفوقة عن السلالة الأصلية.

الجدول (5): الفعالية الإنزيمية للطفرات الناتجة عن بكتريا *Streptomyces fluorescens* في الأزمنة المختلفة

Time / ثانية								Mutation
240	210	180	150	120	90	60	30	
1 طفرة	2 طفرة	3 طفرة	5 طفرة	8 طفرة	12 طفرة	16 طفرة	18 طفرة	الفعالية الإنزيمية وحدة / مل
0.098	0.122	0.292	0.146	0.185	0.158	0.211	0.155	
	0.104	0.008	0.122	0.044	0.228	0.062	0.186	
		0.028	0.302	0.006	0.346	0.113	0.115	
			0.217	0.128	0.078	0.008	0.201	
			0.206	0.282	0.213	0.169	0.066	
				0.189	0.384	0.227	0.118	
				0.164	0.255	0.174	0.134	
				0.126	0.189	0.323	0.089	
					0.175	0.119	0.222	
					0.312	0.187	0.088	
					0.147	0.217	0.147	
					0.088	0.242	0.122	
						0.087	0.322	
						0.144	0.224	
						0.255	0.118	
						0.147	0.212	
							0.242	
							0.214	
							3.87	F
							0.000	Sig.
							0.0014	LSD

يبين الجدول رقم (5) وجود فروق معنوية بين الطفرات عند استخدام الأزمنة المختلفة، وتم الوصول إلى سبع طفرات أعطت فعالية إنزيمية أعلى من العزلة الأصلية التي جرى عليها التطهير، لكن تفوقت الطفرة 6 في الزمن 1.5 دقيقة على باقي الطفرات بمتوسط بلغ 0.384 وحدة/مل، تلتها الطفرة 3 في الزمن 1.5 دقيقة، ومن ثم الطفرة 8 في الزمن 1 دقيقة، واللذان كانت متوسط الفعالية الإنزيمية لهما 0.343-0.346 وحدة /مل على التوالي، وبزيادة بنسبة 31.5 و 18.5 و 17.5% على التعاقب عن البكتيريا الأصلية أي أن هذه الطفرة حققت زيادة في إنتاج الإنزيم وهذا يتوافق مع ما ذكره (Suekane and Iizuka, 1982) حيث أعطت سلالة مطفرة لبكتريا *Streptomyces livochromogenes* بالتشعيع بوساطة الأشعة فوق البنفسجية إنتاجية إنزيمية أعلى من السلالة الأصلية، تم التأكد من ثباتية الطفرة بزراعتها عدة مرات على الوسط التركيبي وقياس فعالية إنزيم السيولاز فيها.

5. الاستنتاجات والتوصيات:

1. إن بكتريا جنس *Streptomyces ssp.* منتجة لإنزيم السيلولاز حيث كانت أغلب الأنواع المدروسة (16 من أصل 19) منتجة للإنزيم بشكل متفاوت، وتمكنت من تحليل السيلولوز على الوسط بوجود أحمر الكونغو.
2. كان النوع *Streptomyces fluorescens* أفضلها حيث بلغت فعاليتها الإنزيمية 0.292 وحدة/مل.
3. تبين كفاءة استخدام الأشعة فوق البنفسجية في التطهير حيث تم التوصل إلى العديد من الطفرات الناتجة عن النوع *Streptomyces fluorescens* المتميز بفعالية إنزيمية عالية وكانت أفضلها الطفرة رقم 6 في الزمن 1.5 دقيقة من التشعيع وكانت فعاليتها الإنزيمية 0.384 وحدة/مل أي بزيادة بنسبة 31.5 % مقارنة مع البكتيريا الأصلية .
4. اختبار قدرة عزلات أخرى تابعة لنفس الجنس أو لأجناس مختلفة معزولة من بيئتنا المحلية على إنتاج السيلولاز، ودراسة تأثير العوامل المختلفة التي تؤثر في إنتاجه كالتهوية ونسب المواد المغذية المختلفة كمصادر الكربون والنيتروجين بغية الوصول لأعلى فعالية إنزيمية.
5. استخدام التأثير التآزري بالتطهير بواسطة الأشعة فوق البنفسجية مع طفرات كيميائية أو فيزيائية أخرى للوصول إلى طفرات إيجابية مستقرة وراثياً تعزز من إنتاج الإنزيم بنسب كبيرة.

المراجع.(References)

- 1- عبد الهادي، شمال يونس، محمد علي، نور عامر، كامل، بشرى عصام. (2012). إنتاج إنزيم السيلوليز من بعض العزلات الفطرية المحلية ودراسة تأثير بعض الظروف الزراعية. مجلة التربية والعلم، 3(25)، 93-3.
- 2- Abdel-Aziz, M. S., Talkhan, F. N., Fadel, M., AbouZied, A. A., & Abdel-Razik A. S. (2011). Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5), 1045-1050
- 3- Bahrim, G., Iancu, C., Butu, N., & Negota, T. G. (2010). Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains Romanian Biotechnological Letters, 15(2), 5197-5203.
- 4- Barros.R.R.O, Oliveira. R.A, Gottschalk. L.M.F and Bon .E.P.S (2010). Production of cellulolytic enzymes by fungi *Acrophialophora nainiana* and *Ceratocystis paradoxa* using different carbon sources. Appl. Biochem. Biotechnol. 161:448-454.
- 5- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H and Toukhy N. M. A. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. African Journal of Biotechnology, 9(38), 6355-6364.

- 6- Evelyn, N. F., Uchechukwu, U. N., & Anthony, I. O. (2016). Classical optimization of cellulase and xylanase production by a marine *Streptomyces* .species. Applied Sciences, 6(10), 286.
- 7- Ezea. I. B. (2025) "Microbial Cellulase Production - Microorganisms, Technologies and Factors: A Review," Int. J. Biochem. Res. Rev., vol. 34, no. 3, pp. 172–186.
- 8- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Awasthi, M. K., & Sarsaiya S (2012). Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. International Journal of Microbiology, 2012, 325907. <https://doi.org/10.1155/2012/325907>
- 9- Habeeb, S. I. (2009). A study on bioactivity of local isolates of Streptomyces [Master's thesis, Damascus University].
- 10- Hironobu, I and Tetsuya, O. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. .Journal of Radiation Research, 52(2), 115-125.
- 11- Khaleel, K. H., Abd, N and Ali, M. (2018). Preparation of nano-cellulose from industrial waste by ultrasonic device. Journal of Biochemical Technology, 9(2), 35-39 .
- 12- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A (2000). Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation .
- 13- Mery, S. W., Elkhatib, W. F., Yassien, M. A., & Hassouna, N. A. (2021) Production of cellulase by soil isolated *Streptomyces* sp. Journal of .Pharmaceutical Sciences, 5(2), 225-233.
- 14- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3), 426-428.
- 15- Munisamy, P., Chandran, S., Murugesan, S., Ragothaman, P., Hari, K .K., George, S. K and Joseph, S. (2025). Efficient synthesis, purification and characterization of novel carboxymethyl cellulase from newly isolated *Streptomyces* sp. CSMPJR101, with potential use in denim biopolishing. .Bioresource Technology Reports, 29, 102035.
- 16- Novozymes A/S. (2004). Enzymes at work. Bagsvaerd, Denmark: .Novozymes Biologicals.
- 17- Ponnambalam, A. S., Deepthi, R. S and Ghosh, A. R. (2011). Qualitative display and measurement of enzyme activity of isolated cellulolytic bacteria Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering, 1(1), 33-37.
- 18- Seungjun, K., Iksu, H., Yun-Yeong, L., Junseo, L. and Jeonghee, Y . (2025). Development of a high-performance Trichoderma mutant for enhanced cellulase production through UV-induced random mutagenesis. Journal of Fungi, 11(6), 439.
- 19- Singhanian. R.R. (2011). Production of Cellulolytic Enzymes for the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. Elsevier, DOI:10.1016/B978-0-12-385099-7.00008-5.
- 20- Shaikh, N. M., Patel, A. A., Mehta, S. A and Patel, N. D. (2013). Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and

- optimization of cellulase production. International Journal of Advanced Research, 3(1), 39-49.
- 21- **Suekane, M and Iizuka, H.** (1982). Production of glucose isomerase by genus *Streptomyces*. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 22(8), 577-580.
- 22- **Tahtamouni, M. E. W., Hameed, K. M and Saadoun, I. M.** (2006). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* using indigenous chitinolytic actinomycetes in Jordan. Plant Pathology Journal, 22(2), 107-114.
- 23- **Ugras, S., Bicen, H. E. I and Emire, Z.** (2024). Determination of cellulase enzyme produced by *Bacillus cereus* DU-1 isolated from soil, and its effects on cotton fiber. Brazilian Archives of Biology and Technology, 67, e2024230391. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024230391>.
- 24- **Vinogradova, S and Kushnir, S. N.** (2003). Applied Biochemistry and Microbiology, 39(6), 573-575.
- 25- **Yassien, M. A., Fatani, A. A. M . and Asfour, H. Z.** (2014). Production, purification and characterization of cellulase from *Streptomyces* sp. African Journal of Microbiology Research, 8(4), 348-354.