نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۲ - ۳۳(۳): ۳۵-۴۴

جداسازی و شناسایی باکتری‌های هم‌زیست در دستگاه گوارش موریانـه‌ی *Anacanthotermes vagans* (Isoptera: Hodotermitidae)

مرضیه جلالی[۱و*]، بهزاد حبیب‌پور[۱] و داریوش غریبی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jalalim86@gmail.com

Isolation and identification of gut symbiotic bacteria of the termite *Anacanthotermes vagans* (Isoptera: Hodotermitidae)

M. Jalali[1&*], B. Habibpour[1] and D. Gharibi[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, 2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author, E-mail: jalalim86@gmail.com

چکیده

موریانه‌ها یکی از مهم‌ترین حشرات خاک‌زی هستند که می‌توانند مواد لیگنوسلولزی را به کمک جامعه‌ی میکروبی هم‌زیست در لوله‌ی گوارش خود تجزیه کنند. بنابراین، موریانه‌ها با کاهش و تجزیه‌ی مواد چوبی نقش عمده‌ای در اکوسیستم خاکی ایفا می‌کنند. در این تحقیق، به‌منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین از موریانه‌ی *Anacanthotermes vagans* (Hagen)، از محیط‌های کشت جامد و مایع محتوی کاه گندم و لیگنین اسید هیدروکلریدریک، و برای باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز از محیط‌های مایع محتوی کاغذ صافی، آگار- سلولز و آگار سلولز- رنگ کنگو قرمز استفاده شد. در آزمایش‌های مختلف، ۱۶ گونه‌ی باکتریایی استخراج و مطالعات متعدد بیوشیمیایی برای تمامی این گونه‌ها انجام گرفت. از میان گونه‌های متعدد باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین، جنس‌های *Enterobacter* و *Klebsiella* دارای بیش‌ترین میزان رشد در محیط‌های انتخابی بودند. باکتری‌های *Staphylococcus lentus* و *Bacillus subtilis* از محیط‌های کشت محتوی سلولز جداسازی شدند.

واژگان کلیدی: *Anacanthotermes vagans*، لیگنین، سلولز، باکتری‌ها، موریانه، ایران

Abstract

Termites play a major role in reducing and decomposing woody materials within terrestrial ecosystems by degrading lingo-cellulosic materials with the help of the microbial community of their guts. We isolated the lignin-degrading bacteria from *Anacanthotermes vagans* (Hagen) using liquid and solid media containing wheat straw and lignin hydrochloric acid. Cellulose-degrading bacteria were also isolated using liquid medium containing filter paper, agar-cellulose and Congo red agar-cellulose. By conducting various experiments, 16 bacterial species were isolated and subjected to different biochemical tests for comparing their growth rates. The genera *Enterobacter* and *Klebsiella* showed the highest growth rate among the rest species of isolated lignin-degrading bacteria. The species *Staphylococcus lentus* and *Bacillus subtilis* were isolated from the media containing cellulose.

Key words: *Anacanthotermes vagans*, lignin, cellulose, bacteria, termite, Iran

مقدمه

اجـزای عمـده‌ی مـواد چـوبی را سـلولز (۵۰-۲۸ درصد)، همی‌سلولز (۳۰-۲۰ درصد) و لیگنـین (۳۰-۸ درصد) تشکیل مـی‌دهنـد. ایـن ترکیبـات همـراه بـاهم به‌عنوان پلی‌مرهای ساختمانی در دیواره‌هـای سـلولی و تیغه‌هـای میـانی بـیش‌تـر گیاهـان عـالی وجـود دارنـد (Breznak & Brune, 1994).

موریانه‌ها از حشرات اجتماعی واقعی بوده کـه در جوامع زیستی آن‌ها تقسیم کار صورت گرفتـه اسـت و افراد به سه طبقه شامل افراد جنسـی بـال‌دار، کـارگر و سـرباز تقسـیم مـی‌شـوند، و هـر طبقـه براسـاس توانـایی‌هایشـان وظـایف متعـددی را بـه‌عهـده دارنـد (Habibpour, 1994). موریانـه‌هـا بـا کمـک جامعـه‌ی میکروبی هم‌زیسـت در دسـتگاه گـوارش خـود، نقـش مهمی در جابه‌جایی و تجزیه‌ی پلـی‌مرهـای پیچیـده‌ی زیستی مانند ترکیبات سلولز، همی‌سلولز و لیگنـین ایفـا می‌کنند. این ارتباط هم‌زیستی به موریانه‌ها امکان تغذیه از مواد سلولزی را مـی‌دهـد (Waller & Lafage, 1987;

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۹، پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۶.

(Wenzel *et al*., 2002). جامعه‌ی میکروبی موجود در روده، انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها را در سه گروه باکتری‌ها، آرکاباکتریا و یوکاریوت‌ها شامل می‌شود (Ohkuma & Brune, 2011). باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش موریانه‌ها بیش‌تر در روده با تراکمی در حدود 10^{11}–10^{5} میلی‌لیتر از مایع روده قرار دارند. این باکتری‌ها با تراکم کم‌تری در بخش جلویی و میانی دستگاه گوارش دیده می‌شوند، اما تاکنون از غدد بزاقی گزارش نشده اند (Ohkuma, 2003). در موریانه‌های پست، هضم مواد لیگنوسلولزی نمونه‌ی خوبی از یک رابطه‌ی هم‌زیستی دوطرفه می‌باشد. در این رابطه میکروارگانیزم‌ها ترکیبات مذکور را دریافت کرده و به قندهای ساده و استات تجزیه می‌کنند. سپس توسط موریانه به‌عنوان منبع کربن و انرژی جذب می شوند (Bignell, 2000). در طول چندسال گذشته، توجه به نقش باکتری‌ها در تجزیه‌ی لیگنین و سلولز افزایش یافته است. گرچه قارچ‌های ساپروفیت اولین تجزیه‌کنندگان این ترکیبات می‌باشند، بااین‌حال توانایی چندین گونه باکتری در تجزیه‌ی این پلی‌مرهای زیستی به اثبات رسیده است (Ohkuma, 2003).

موریانه‌های موجود در استان خوزستان به گروه موریانه‌های زیرزمینی تعلق دارند و بیش‌تر آن‌ها دارای تجمعاتی در زیر سطح خاک هستند. لانه‌ی آن‌ها توده‌های فشرده‌ای از حجره‌های کوچک است که از مواد مقوایی، یعنی سلولز و لیگنین دفع‌شده با کمی خاک، ساخته شده‌اند (Habibpour, 2006). موریانه‌ی *Anacanthotermes vagans* (Hagen) به‌عنوان یکی از آفات مهم اماکن مسکونی و تاریخی شناخته شده است (Habibpour, 1994; Kaakeh, 2005). هدف از این تحقیق جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی برخی از باکتری‌های هم‌زیست تجزیه‌کننده‌ی ترکیبات لیگنوسلولزی موریانه‌ی *A. vagans* در منطقه‌ی اهواز است. نتایج این مطالعه در راستای کنترل بیولوژیک این حشرات از طریق تأثیر ترکیبات پادآفت زیست روی باکتری‌های هضم‌کننده‌ی مواد لیگنوسلولزی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری موریانه‌ی *A. vagans*

موریانه‌ها در اهواز از تکه‌های چوب و دستمال کاغذی که در نزدیکی محل فعالیت موریانه‌ها درون خاک قرار داده شده بود، جمع‌آوری شدند. سپس با استفاده از قلم‌موی مرطوب به ظروف شیشه‌ای که محتوی کاه گندم، تکه‌های کاغذ صافی و مقداری خاک به‌همراه آب مقطر بود، منتقل شدند. موریانه‌ها برای انجام آزمایش‌های مورد نظردر دمای ۱ ± ۲۸ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور تاریک نگه‌داری شدند.

به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، از انواع لیگنین شامل لیگنین دی‌اکسان، لیگنین کلیسون، لیگنین اسید هیدروکلریدریک و سلولز به‌عنوان منبع کربن برای رشد باکتری‌ها استفاده شده است. در این تحقیق لیگنین اسید هیدروکلریدریک و سلولز به‌عنوان مواد غذایی رشد باکتری به‌کار برده شدند.

تهیه‌ی لیگنین و لیگنین اسید هیدروکلریدریک

به‌منظور استخراج لیگنین از کاه گندم (به‌علت داشتن لیگنین زیاد) استفاده شد. ابتدا کاه تهیه‌شده با استفاده از آسیاب در اندازه ۰/۵ سانتی‌متر خرد شد. قبل از استفاده از آن به‌عنوان سوبسترای رشد، کاه چندین‌بار با هدف جدا کردن مواد محلول در آب (کربوهیدرات‌های محلول) با آب جوش عصاره‌گیری شد، به‌طوری‌که در آخرین مرحله آب بی‌رنگ گردید. سپس کاه عصاره‌گیری‌شده به مدت ۲٤ساعت در دمای

۷۰ درجه‌ی سلسیوس درون آون خشک شد (Kerr *et al*., 1983).

برای تهیه‌ی لیگنین اسید هیدروکلریدریک، کاه آسیاب‌شده با استفاده از اسید هیدروکلریدریک (وزن مخصوص ۱/۱۹) در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت دو ساعت به‌وسیله‌ی هم‌زن مغناطیسی فرآوری شد. سپس، اجازه داده شد تا درجه‌ی حرارت به دمای اتاق برسد. بعد از آن به مخلوط، یخ اضافه گردید و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند. پس از این مدت، آب اضافه شده و لیگنین به‌وسیله‌ی صافی جمع‌آوری گردید. رسوب حاصله پس از شسته شدن در آب جوشانده شد که این‌کار با افزایش تدریجی کربنات سدیم تازمانی‌که مخلوط خنثی شود (pH = ۷) صورت گرفت. درنهایت، لیگنین به‌وسیله‌ی صافی تصفیه شد (Kerr *et al*., 1983).

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین

در این مرحله، ۲۰ موریانه‌ی کارگر به داخل پلیت شیشه‌ای منتقل شده و از طریق سرمادهی در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه بی‌هوش شدند. سپس، ابتدا سطح بدن موریانه‌ها به‌وسیله‌ی الکل اتیلیک ۹٦ درصد شستشو داده شد تا به‌طور کامل استریل شود و بعد سطح بدن آن‌ها در محیط استریل (Terrific broth) (TB) حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم لیگنین در هر میلی‌لیتر دوباره به‌طور کامل شستشو داده شد. محیط TB شامل دو گرم سدیم آمونیوم هیدروژن فسفات ٤ آبه، یک گرم دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۳ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه، ۰/۱ گرم کلرید سدیم و ۰/۰۰۲ گرم کربنات کلسیم در هر لیتر آب مقطر بود. پس از این مرحله، لوله‌ی گوارش به‌وسیله‌ی یک جفت پنس نوک‌تیز از بدن خارج گردید و داخل یک لوله‌ی آزمایش استریل محتوی ۵ میلی‌لیتر از محیط TB دارای ۳۰۰ میلی‌گرم لیگنین در هر میلی‌لیتر به‌طور کامل له و هموژنیزه شد. به‌این‌ترتیب، یک محلول حاوی محتویات روده‌ی موریانه‌ها به‌دست آمد. امولسیون تهیه‌شده برای آزمایش‌های مربوط به جداسازی، در دمای ۱ ± ۳۰ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری شد (Kato *et al*., 1998).

به‌منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین، دو نوع محیط کشت شامل محیط کشت مایع حاوی لیگنین و کاه، و محیط کشت جامد، به‌کار گرفته شد. برای تهیه‌ی محیط کشت مایع حاوی لیگنین و کاه، ابتدا محیط کشت پایه‌ی استریل یا محیط M9 تهیه گردید. بدین‌ترتیب که داخل یک ارلن ۵۰۰ سی‌سی، مقدار ۳/۱ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۲۵ گرم کلرید سدیم در نیم‌لیتر آب مقطر ریخته شد و روی دستگاه حرارت دارای هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت (Kato *et al*., 1998). سپس، محلول یکنواخت‌شده (محیط M9) به دو بشر ۲۵۰ سی‌سی تقسیم و به هرکدام، ۰/۱۲۵ گرم لیگنین یا کاه عصاره‌گیری‌شده با آب جوش اضافه شد. بشرها روی دستگاه حرارت دارای هم‌زن مغناطیسی قرار داده شدند. هرکدام از مخلوط‌های به‌دست آمده به هشت لوله‌ی آزمایش استریل منتقل گردید. درِ لوله‌های آزمایش با پنبه بسته شد و جهت استریل شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو قرار گرفتند (Kato *et al*., 1998). بعد از خنک شدن، لوله‌های حاوی محیط کشت به‌مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۱ ± ۳۷ قرار داده شدند تا عدم آلودگی محیط‌ها و شرایط استریلیزاسیون بررسی شود. سپس، این لوله‌ها جهت استفاده در آزمایش‌های بعدی درون یخچال نگه‌داری شدند (Quinn *et al*., 1994).

محیط کشت جامد به دو صورت آگار- لیگنین و آگار-کاه گندم تهیه شد. بدین‌منظور، ابتدا درون دو ارلن

استریل مقدار ٤/٥ گرم آگار و ۰/۲۵ گرم لیگنین و کاه عصاره‌گیری‌شده با آب جوش در ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر ریخته شد و روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت تا مخلوط به‌طور کامل یکنواخت شود. سپس، ارلن به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت استریل شدن در اتوکلاو گذاشته شد. پس از خنک شدن، در شرایط استریل، محیط‌های کشت استریل‌شده به درون پلیت‌های کشت استریل منتقل شدند و بعد از بسته شدن، جهت بررسی عدم آلودگی، به‌مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس، جهت استفاده در آزمایش‌های بعدی داخل یخچال نگه‌داری شدند (Quinn *et al*., 1994).

کشت باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین

برای کشت در محیط‌های مایع حاوی لیگنین و کاه، به لوله‌های آزمایش در شرایط استریل یک میلی‌لیتر از امولسیون تهیه‌شده از روده‌ی موریانه اضافه شد. سپس، محیط‌های کشت در دمای ۱ ± ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت یک هفته در انکوباتور نگه‌داری شدند (Kato *et al*., 1998). رشد باکتری در لوله روزانه بررسی می‌شد. پس از یک هفته و با مشاهده کدورت (رشد باکتری)، جهت جداسازی، خالص‌سازی و تعیین هویت باکتری‌های رشدکرده در محیط مایع، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط‌ها برداشته شد و روی محیط‌های جامد آگار- لیگنین و آگار-کاه گندم کشت گردید.

برای کشت در محیط‌های جامد حاوی لیگنین و کاه، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول روده‌ی حشره روی هریک از پلیت‌های محتوی آگار- لیگنین یا آگار-کاه گندم قرار داده شد. سپس، محیط‌های کشت در دمای ۱ ± ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت یک هفته در انکوباتور نگه‌داری شدند. در این مدت، رشد باکتری‌ها روی پلیت‌های آگاردار مورد بررسی قرار گرفت. (Kato *et al*., 1998). برای هر نمونه، یک تکرار از محیط کشت آگار-کاه گندم و آگار- لیگنین اختصاص یافت.

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز

برای این منظور، تعداد معینی موریانه به درون پلیت شیشه‌ای منتقل شد و سطح بدن آن‌ها با شتشو در الکل ۷۰ درصد استریل گردید. پس از جدا کردن سر هر موریانه، با پنس نوک‌تیز دستگاه گوارش خارج و تمامی آن‌ها همگن شدند (Upadhyaya *et al*., 2012).

به‌منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز، از محیط‌های کشت مایع، آگار- سلولز و آگار سلولز- رنگ کنگو قرمز استفاده شد. برای تهیه‌ی محیط کشت مایع، درون ظروف شیشه‌ای ۲/۵ گرم نیترات سدیم، ۲ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم سولفات منیزیم، ۲ گرم کلرید سدیم و ۰/۱ گرم کلرید کلسیم ٦ آبه در یک لیتر آب مقطر محتوی کاغذ صافی (واتمن شماره‌ی یک) ریخته شد. سپس، ظروف جهت استریل شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو گذاشته شدند (Gupta e*t al*., 2012).

محیط کشت آگار- سلولز از ۰/۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم، ۲ گرم سلولز، ۱۵ گرم آگار و ۲ گرم ژلاتین در یک لیتر آب مقطر تشکیل شد. برای اطمینان از توانایی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز، آن‌ها در محیط آگار سلولز- رنگ کنگو قرمز کشت داده شدند. این محیط شامل ۰/۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم، ۲ گرم سلولز، ۱۵ گرم آگار، ۲ گرم رنگ کنگو قرمز و ۲ گرم ژلاتین در یک لیتر آب مقطر در pH = ٦/٨-٧/٢ بود (Gupta *et al*., 2012).

کشت باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز

ابتدا محتویات همگن‌شده‌ی لوله‌ی گوارش موریانه‌ها به محیط کشت مایع اضافه شد. سپس، به‌مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری شدند. بعد از این مدت، توسط لوپ استریل، کشت از محیط مایع به روی محیط‌های آگار- سلولز و آگار سلولز- رنگ کنگو قرمز انتقال یافت. فعالیت باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز باعث تغییر رنگ کنگو قرمز شد (Gupta *et al.*, 2012).

شناسایی باکتری‌های استخراج‌شده

شناسایی باکتری‌های استخراج‌شده براساس استانداردهای Breed *et al.* (1957) و Quinn *et al.* (1994) انجام گرفت. ویژگی‌های ظاهری پرگنه‌های رشدیافته بر سطح محیط blood agar، رنگ، شکل، اندازه، برجستگی و مخاطی بودن، و نوع اتصال به سطح آگار را شامل می‌شد. با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها، آرایش آن‌ها و نیز گرم مثبت یا گرم منفی بودن آن‌ها تعیین شد. آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند آزمون کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، سیمون سیترات، کشت در محیط سه قندی آهن‌دار (TSI)، ... (به جدول‌های ٤-١ رجوع شود) روی باکتری‌های استخراج‌شده انجام گرفت. به‌این صورت که به‌وسیله‌ی لوپ یا آنس استریل بخشی از پرگنه‌های باکتری مورد نظر در محیط‌های مذکور تلقیح شدند و بعد از ٤٨-٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس، فعالیت باکتری‌ها به‌صورت تغییر رنگ یا عدم تغییر رنگ محیط بررسی شد.

نتایج

باکتری‌های قادر به استفاده از دو ماده‌ی غذایی لیگنین و سلولز، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم تا سطح جنس و برخی نیز تا سطح گونه شناسایی شدند. در آزمایش‌های انجام‌گرفته، باکتری‌های *E. aerogenes*، *Enterobacter cloacae*، *K. oxytoca*، *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter* sp.، *Actinobacillus equuli*، *Pseudomonas* sp.، *Klebsiella* sp.، *Corynebacterium* sp.، *Actinobacillus* sp.، *A. ureae* و *Rhodococcus* spp. قادر به تجزیه‌ی لیگنین بودند (جدول‌های ۳-۱). همین‌طور، باکتری‌های *Staphylococcus lentus* و *Bacillus subtilis* توانایی استفاده از محیط‌های کشت محتوی سلولز را داشتند (جدول ٤).

بحث

بررسی‌ها نشان داده است که سه گروه از موجودات قادر به تجزیه‌ی بیولوژیکی مواد لیگنوسلولزی می‌باشند که شامل قارچ‌های پوسیده‌خوار، بعضی از میکروارگانیزم‌های آب و خاک و نیز موریانه‌ها هستند. موریانه‌ها تجزیه‌کنندگان برتر چوب مرده و دیگر منابع سلولزی هستند که توسط باکتری‌های هم‌زیست در روده‌ی خود، با تخمیر پلی‌مرهای لیگنوسلولزی موجود در چوب، آن‌ها را به قندهای ساده تبدیل می‌کنند (Kato *et al.*, 1998). باکتری‌ها با کمک آنزیم‌های خود، هیدروژن را به‌صورت محصول فرعی تولید می‌کنند. شناسایی آنزیم و ژن تولیدکننده‌ی هیدروژن می‌تواند این فرآیند بالقوه را تقویت کند و در مقادیر تجاری، هیدروژن از زیست‌توده‌ی چوبی ایجاد شود. نیازهای روزافزون جهان، سبب جایگزینی منبع انرژی و استفاده از سوخت‌های زیستی شده است، به‌طوری‌که در حال حاضر بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته شروع به تولید اتانول زیستی به کمک باکتری‌های هم‌زیست تجزیه‌کننده‌ی لیگنوسلولز در موجوداتی مانند موریانه‌ها کرده‌اند (Brune *et al.*, 1995).

جدول ۱- خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین (*Enterobacter* و *Klebsiella*) در *Anacanthotermes vagans* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی.

Table 1. Characterization of the lignin-degrading bacteria (*Enterobacter* and *Klebsiella*) in *Anacanthotermes vagans* using biochemical tests.

Test	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*Enterobacter* sp.	*K. pneumonia*	*K. oxytoca*	*Klebsiella* sp.
Gram reaction	–	–	–	–	–	–
Shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Oxidase	–	–	–	–	–	–
Catalase	+	+	+	+	+	+
H_2S production in TSI[1]	–	–	–	–	–	–
Gas production in TSI	+	–	+	+	+	+
Motility	+	+	+	–	–	–
Indole	–	–	–	–	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+
Urease	–	–	–	+	+	–
LD[2]	–	+	+	–	–	–
PD[3]	–	–	–	–	–	–
MR[4]	–	–	–	–	–	+
VP[5]	+	+	+	+	+	–
OF[6]	+/+	+/+	–/+	+/+	+/+	+/+
Grows on MacConkey´s	+	+	+	+	+	+

1. Triple sugar iron, 2. Lysine decarboxylase, 3. Phenylalanine deaminase, 4. Methyl red, 5. Voges Proskauer, 6. Oxidative/Fermentative.

بااین‌حال، موریانه‌ها هنگام حمله به ساختمان‌ها و محصولات گیاهی به‌عنوان یک آفت نمایان می‌شوند (Ohkuma & Brune, 2011).

حدود ۲۰۰۰ گونه از موریانه‌ها شناخته شده که تنها فلور روده‌ی تعداد کمی از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (O'Brien & Slaytor, 1982). موریانه‌ی *A. vagans* در بیش‌تر مناطق و اقلیم‌های کشور وجود داشته و در استان خوزستان به‌عنوان یک آفت مهم ساختمانی، فراوانی زیادی دارد. درخصوص فلور روده‌ی این موریانه گزارشی در دست نیست. در این تحقیق، براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و حساسیت به رنگ‌آمیزی گرم، ۱۳ گونه باکتری تجزیه‌کننده‌ی لیگنین و دو گونه باکتری تجزیه‌کننده‌ی سلولز از لوله‌ی گوارش موریانه‌ی مذکور استخراج شد. این آزمایش‌ها در محیط‌های کشت کاملاً اختصاصی و در تکرارهای زیادی انجام گرفت. بیش‌تر باکتری‌های جداشده گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری بودند. اگرچه بخش انتهایی دستگاه گوارش موریانه بی‌هوازی می‌باشد (O'Brien & Slaytor, 1982)، نسبت بالایی از باکتری‌های جداشده از این قسمت، باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری مانند جنس‌های *Staphylococcus*، *Enterobacter* و *Klebsiella* بودند. اکسیژن از طریق دیواره‌ی سلولی به درون لوله‌ی گوارش موریانه نفوذ کرده و درصورت عدم خروج می‌تواند برای باکتری‌های بی‌هوازی آن کشنده باشد (Brune *et al.*, 1995). باکتری‌های *Serratia marcescens* و *E. aerogenes* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی از لوله‌ی گوارش موریانه‌ی *Coptotermes formosanus* (Shiraki) شناسایی شده‌اند. این باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری ممکن است در خارج کردن اکسیژن نفوذیافته به لوله‌ی گوارش نقش داشته باشند و به‌طور مؤثری محیط لوله‌ی گوارش را بی‌هوازی نگه دارند (Adams & Boopathy, 2005). اگرچه تجزیه‌ی لیگنین و سلولز هر دو به وسیله‌ی میکروارگانیزم‌های خاک اتفاق می‌افتد، تجزیه‌ی لیگنین ۱۰-۴ برابر آهسته‌تر از تجزیه‌ی سلولز است. همچنین، Crawford (1978) برای اولین‌بار سویه‌هایی از استرپتومایسیس را به‌عنوان تجزیه‌کننده‌ی سلولز و لیگنین معرفی کرد.

جدول ۲- خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین (*Pseudomonas* و *Actinobacillus*) در *Anacanthotermes vagans* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی.

Table 2. Characterization of the lignin-degrading bacteria (*Actinobacillus* and *Pseudomonas*) in *Anacanthotermes vagans* using biochemical tests.

Test	*Pseudomonas* sp.	*A. equuli*	*A. ureae*	*Actinobacillus* sp.
Gram reaction	–	–	–	+
Shape	Rods	Rods	Rods	Coccobacill
Oxidase	+	+	+	–
Catalase	+	+	+	+
H_2S production in TSI	–	–	–	
Gas production in TSI	–	–	–	
Motility	–	–	–	–
Indole	–	–	–	–
Citrate	+	–	–	–
Urease	–	+	+	+
LD	+	–	–	–
PD	–	–		
MR	–	–	–	–
VP	–	+	–	–
OF	–/–	0/+	0/+	0/+
Grows on MacConkey´s	+	–	–	+

See table 1 for acronyms.

براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوط به فلور لوله‌ی گوارش موریانه‌ی *Coptotermes curvignathus* (Holmgren)، باکتری‌های *E. cloaceae*، *E. aerogenes* و *Corynebacterium* sp. شناسایی شدند که توانایی تجزیه‌ی ترکیبات مختلف فنولی در لیگنوسلولز را داشتند (Ramin *et al.*, 2008). همچنین، باکتری‌های *E. cloaceae* و *E. aerogenes* از لوله‌ی گوارش موریانه‌ی *C. formosanus* توسط Adams & Boopathy (2005) و موریانه‌های *Nasutitermes nigriceps* (Haldeman) و *Mastotermes darwiniensis* (Froggatt) نیز توسط Kuhnigk *et al.* (1994) جداسازی و شناسایی شدند که این باکتری‌ها توانایی تجزیه‌ی مونومرهای لیگنین را داشتند. باکتری *K. pneumoniae* با استفاده از مطالعات بیوشیمیایی و روش SDS-PAGE شناسایی و تعیین هویت شد و نقش آن در تثبیت نیتروژن به‌وسیله‌ی کشت در محیط نمکی حاوی NaMo و $Fe_2(SO4)_3$ در شرایط بی‌هوازی بررسی گردید (Doolittle *et al.*, 2007).

جنس‌های *Agrobacterium*، *Corynebacterium*، *Pseudomonas*، *Klebsiella* و *Enterobacter* از ترکیبات لیگنینی جداسازی شده‌اند و توانایی تجزیه ترکیبات مختلف فنولی را دارند. این‌ها لیگنین را به واحدهای کوچک‌تر تبدیل می‌کنند (Deschamps *et al.*, 1980). همچنین، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، از لوله‌ی

جدول ۳- خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی لیگنین (*Corynebacterium* و *Rhodococcus*) در موریانه‌ی *Anacanthotermes vagans* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی.

Table 3. Characterization of the lignin-degrading bacteria (*Rhodococcus* and *Corynebacterium*) in the termite *Anacanthotermes vagans* using biochemical tests.

Test	*Rhodococcus* sp.	*Rhodococcus* sp.	*Corynebacterium* sp.
Gram reaction	+	+	+
Shape	Rods	Rods	Rods
Oxidase	–	–	–
Catalase	+	+	+
Esculin	–	–	+
Sucrose	–	–	–
Urease	–	–	–
Maltose	+	–	+
Glucose	–	–	–
Nitrate	–	+	–
OF	–/–	–/–	–/–

گوارش موریانه‌های *M. darwiniensis*، *N. nigriceps* و *Reticulitermes santonensis* (Feytaud)، باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، و نیز از موریانه‌ی *R. santonensis*، باکتری *B. subtilis* جداسازی و با انجام آزمایش‌های مختلف، توانایی آن‌ها در تجزیه‌ی سه ترکیب مختلف لیگنوسلولزی بررسی شد.

جدول ٤- خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز (*Staphylococcus* و *Bacillus*) در موریانه‌ی *Anacanthotermes vagans* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی.

Table 4. Characterization of the cellulose-degrading bacteria (*Staphylococcus* and *Bacillus*) in the termite *Anacanthotermes vagans* using biochemical tests.

Test	*S. lentus*	*B. subtilis*
Gram reaction	+	+
Shape	Coccus	Bacill
Oxidase	+	+
Catalase	–	–
Coagulase	–	
Motility		+
Gelatin		+
Dnase	–	
Urease	–	+
Mannitol	+	+
Maltose	–	
Citrate		+
Esculin	+	
Nitrate		+
Glucose		+
Arabinose		+
OF		–/–

باکتری‌های اختیاری تجزیه‌کننده‌ی هم‌زیست در روده‌ی موریانه‌ی *Reticulitermes hesperus* Banks شامل جنس‌های *Bacillus*، *Arthrobacter* و *Serratia*، و نیز گروه کوچکی از باکتری‌های گرم منفی تخمیرکننده‌ی چوب، توسط Thayer (1976) معرفی شدند. براساس مطالعات انجام‌گرفته، فهرستی از گونه‌های مختلف باکتری‌های هم‌زیست در لوله‌ی گوارش موریانه و سایر بی‌مهرگان موجود در خاک شامل جنس *Bacillus*، و نیز گونه‌ی *B. subtilis*، تهیه شده است (Konig, 2006). در مطالعه‌ی حاضر نیز گونه‌ی *B. subtilis* جداسازی و شناسایی شد که می‌تواند نمایانگر این امر باشد که بعضی از جنس‌ها به‌طور مشترک در گونه‌های مختلف موریانه وجود دارند و نیز بعضی از گونه‌های باکتریایی در گونه‌ی خاصی غالب می‌باشد.

بین گونه‌ی باکتری و خانواده‌ی موریانه رابطه‌ی نزدیکی وجود دارد، به‌طوری‌که جنس *Enterobacter* در موریانه‌های خانواده‌ی Rhinotermitidae و جنس *Staphylococcus* در خانواده‌ی Termitidae به فراوانی یافت می‌شوند (Waller & Lafage, 1987). گونه‌هایی از باکتری *Arthrobacter* جداشده از روی انواع لیگنین که به‌عنوان تنها منبع کربن قابلیت رشد روی آن را داشته، بعد از ۱۰ روز دوره‌ی انکوباسیون، ٦/٥ درصد از اجزای پلی‌ساکاریدی و ۲/۹ درصد از اجزای لیگنینی را تجزیه کردند (Kerr *et al.*,1983). همین‌طور، جنس‌های *Citrobacter*، *Enterobacter* و *Cellulomonas* نیز با روش‌های بیوشیمیایی و استفاده از کنگو قرمز استخراج شدند (Upadhyaya *et al.*, 2012). در مورد میزان و سرعت رشد باکتری‌ها، محققین بیان کرده‌اند که زمان زادآوری یک باکتری در محیط رشد به گونه‌ی باکتری بستگی دارد (Mohan & Manuselis, 1995)، در مطالعه‌ی حاضر، دو جنس *Enterobacter* و *Klebsiella* متعلق به خانواده‌ی Enterobacteriacae نسبت به دیگر گونه‌ها رشد سریع تری داشتند.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که فراوانی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز و لیگنین بسیار بیش‌تر از آن چیزی است که تصور می‌شد (O'Brien & Slaytor, 1982; Mohan & Manuselis, 1995). بنابراین، باید مطالعات بیش‌تری در جهت شناسایی کامل باکتری‌های هم‌زیست روده و اکولوژی آن‌ها، تعیین نقش آن‌ها در فیزیولوژی تغذیه‌ی موریانه و نیز نقش آن‌ها در کاربردهای صنعتی انجام گیرد. همچنین، به‌منظور کنترل موریانه‌ها از طریق شناسایی باکتری‌های هم‌زیست، می‌توان با به‌کارگیری

ترکیباتی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های روده‌ی آن‌ها را نابود کرد. این امر سبب گرسنگی و در نهایت مرگ موریانه‌ها خواهد شد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌جهت حمایت‌های مالی تشکر می‌نماید.

منابع

Adams, L. & Boopathy, R. (2005) Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology* 96(14), 1592-1598.

Bignell, D. E. (2000) Introduction to symbiosis. pp. 189-208 in Abe, T., Bignell, D. E. & Higashi, M. (Eds) *Termites*: *evolution*, *sociality*, *symbioses*, *ecology*. 466 pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R. (1957) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1130 pp. The Williams and Wilkins Company.

Breznak, J. A. & Brune, A. (1994) Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termite. *Annual Review of Entomology* 39, 453-487.

Brune, A., Emerson, D. & Breznak, J. A. (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectric determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 61, 2681-2687.

Crawford, D. L. (1978) Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 1041-1045.

Deschamps, A. M., Mahoudean, G. & Lebeault, J. M. (1980) Fast degradation of kraft lignin by bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9, 45-51.

Doolittle, M., Raina, A., Lax, A. & Boopathy, R. (2007) Presence of nitrogen fixing *Klebsiella pneumoniae* in the gut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *Bioresource Technology* 99(8), 3297-3300.

Gupta, P., Sahu, A. & Samant, K. (2012) Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology* 1, 1-5.

Habibpour, B. (1994) Termites (Isoptera) fauna, economic importance and their biology in Khuzestan province, Iran. M. Sc. Thesis. College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran. 143 pp. [in Persian].

Habibpour, B. (2006) Laboratory and field evaluation of bait-toxicants for suppression of subterranean termite populations in Ahwaz (Iran). Ph. D. Thesis. College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran. [in Persian].

Kaakeh, W. (2005) Survival and feeding responses *of Anacanthotermes ochraceus* (Hodotermitidae: Isoptera) to local and imported wood. *Journal of Economic Entomology* 98(6), 2137-2142.

Kato, K., Kozaki, Sh. & Sakuranaga, M. (1998) Degradation of lignin compound by bacteria from termite guts. *Biotechnology Letters* 20(5), 459-462.

Kerr, T. J., Kerr, R. D. & Benner, R. (1983) Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1201-1206.

Konig, H. (2006) *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *Journal of Applied Microbiology* 101, 620-627.

Kuhnigk, T., Borst, M., Ritter, A., Kampfer, P., Graf, A., Hertel, H. & Konig, H. (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Journal of Basic Microbiology* 17, 76-85.

Mohan, C. R. & Manuselis, G. Jr. (1995) *Textbook of diagnostic microbiology*. 1134 pp. W. B. Saundres Company USA.

O'Brien, R. W. & Slaytor, M. (1982) Role of microorganism in the metabolism of termites. *Australian Journal of Biological Science* 35, 239-262.

Ohkuma, M. (2003) Termite symbiotic systems: efficient biorecycling of lignocelluloses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 1-9.

Ohkuma, M. & Brune, A. (2011) Diversity, structure, and evolution of the termite gut microbial community. pp. 413-438 in Bignell, D. E. & Roisin, Y. (Eds) *Biology of termites*: *a modern synthesis*. 576pp. Springer, Dordrecht.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. & Carter, G. R. (1994) *Clinical veterinary microbiology*. 648 pp. Wolf Press, Spain.

Ramin, M., Alimon, A. R., Abdullah, N., Panandam, J. M. & Sijam, K. (2008) Isolation and identification of three species of bacteria from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren) present in the vicinity of University Putra Malaysia. *Research Journal of Microbiology* 3(4), 288-292.

Thayer, D. W. (1976) Facultative wood-digesting bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *Journal of General Microbiology* 95, 287-296.

Upadhyaya, S. K., Manandhar, A., Mainali, H., Pokhrel, A. R., Rijal, A., Pradhan, B. & Koirala, B. (2012) Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from gut of termite. *Rentech Symposium Compendium* 1, 1-5.

Waller, D. A. & Lafage, J. P. (1987) Nutritional ecology of termites. pp. 487-532 in Slansky, Jr. F. & Rodriguez, J. G. (Eds) *Nutritional ecology of insects*, *mites and spiders*. 1016 pp. Wiley & Sons Press.

Wenzel, M., Schonig, I., Berchtold, M., Kampfer, P. & Konig, H. (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis. Journal of Applied Microbiology* 92, 32-40.