بررسی توان سلولازی در میکروارگانیسم های گرمادوست جداسازی شده از خاک و کمپوست

آرش همتی[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، رضا خاک‌ور[۳]
۱، ۲ و۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز

چکیده:

این تحقیق با هدف جداسازی میکروارگانیسم های گرمادوست با توان بالای سلولازی از خاکهای مختلف و مراحل مختلف تولید کمپوست انجام پذیرفت. برای این‌منظور ابتدا جدایه‌ها از نمونه‌های مختلف در دمای ۵۸ درجه‌سلسیوس در محیط کشت NA جداسازی گردیدند. در این تحقیق در مجموع ۳۲۷ جدایه گرمادوست جداسازی و خالص سازی شدند. فعالیت سلولازی ایزوله ها با روش‌های کیفی و کمی تعیین گردید. بیشترین فعالیت سلولازی در جدایه های حاصل از بستر زباله های آلی بدون هوادهی، کمپوست و ورمی کمپوست و کمترین فعالیت مربوط به نمونه خاک بود. در سنجش کیفی، بیشترین فعالیت سلولازی به ترتیب در جدایه های شماره ۱۹۴، ۱۰۴ و ۱۲ مشاهده شد. همچنین جدایه های ۱۰۴، ۱۹۴، ۱۲، ۱۳ و ۶ به ترتیب بیشترین توان کمی سلولازی را داشتند. در مجموع جدایه های ۱۰۴، ۱۹۴ و ۱۲ کارامدترین جدایه ها از نظر فعالیت سلولازی بودند.

کلمات کلیدی: فعالیت سلولازی، کمپوست، گرمادوست

مقدمه:

کمپوست شدن، تجزیه بیولوژیکی و تثبیت مواد آلی تحت شرایط ویژه‌ای از لحاظ رطوبت و تهویه می باشد که با تولید حرارت (شرایط ترموفیلیک) محصول نهایی تثبیت گردیده و عاری از عوامل بیماری‌زا و بذور گیاهان می‌شود. دیواره‌سلولی بقایای گیاهی از سه قسمت اصلی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین تشکیل شده است (Kluczek-Turpeinen et al., 2003).

تولید کمپوست بر حسب الگوی دمایی در چهار مرحله: مرحله تاخیر، مرحله رشد، مرحله ترموفیلیک و مرحله رسیدگی انجام می‌گیرد (Kutzner, 2000). تجزیه شدید مواد آلی در دمای ترموفیلی با انجام اکسایش بیولوژیک مواد آلی انجام می‌شود. افزایش دما فعالیت بسیاری از پاتوژن ها و بذور علف‌های هرز را از بین می‌برد. نتایج تحقیقاتی که در زمینه افزایش طول مرحله ترموفیلی کمپوست شدن انجام شده است، حاکی از آن است که افزایش طول مرحله ترموفیلی منجر به افزایش خصوصیات کیفی و کمی در کمپوست نهایی می‌گردد. در بین مراحل مختلف کمپوست شدن، مرحله ترموفیلیک منعکس کننده حداکثر فعالیت های جمعیت میکروبی می باشد که منجربه تخریب ماده آلی به طور فزاینده می شود (Kutzner 2000). لیگنوسلولز ها فراوان بخش مواد گیاهی بر روی زمین می باشند که ۵۰٪ تمام زیست توده آنها را شامل می شود (Goldstein, 1981).

غربالگری میکروارگانیسمهای های تجزیه کننده سلولز عموما بر اساس فعالیت تجزیه سلولز و سرعت رشد زیاد در سلولز آگار صورت میگیرد. عملکرد هر یک از ایزوله با تخصیص نمره برای هر نمونه تجزیه و تحلیل می شود (Hart et al. 2002). *Melanocarpus albomyces* قارچ گرمادوست جدا شده از کمپوست می باشد که در یک محیط حاوی مایع باگاس نیشکر، زایلاناز و سلولاز را تولید کرد (Prabhu et al. 1999).

قارچ های گرمادوست در مناطق گرمسیری معمولا در محیط های لیگنوسلولزی مانند جنگل و زمین های کشاورزی و یا کمپوست ظاهر می شوند (Maheshwari et al. 2000). بسیاری از قارچ گرمادوست و یا حتی مزوفیل توانایی شناخته شده برای تولید آنزیم های مقاوم به حرارت را دارند (Singh et al. 2003). همی سلولاز های مقاوم به حرارت، مانند ماناز و همچنین سلولازهای ترموفیل فقط به میزان محدودی مورد مطالعه قرار گرفته شده است (Puchart et al. 2004). هوادهی و مایه تلقیح

میکروبی عوامل مهم موثر بر کمپوست شدن هستند. مخلوط کردن انواع مختلفی از آنزیم های سلولاز مانند، پروتئاز، آمیلاز و لیپاز نیز یک استراتژی موثر برای بهبود کمپوست شدن می باشد (Echeverria et al., 2012).

با توجه به مسائل مطرح شده این تحقیق با هدف جداسازی میکروارگانیسم های گرمادوست با توان بالای سلولازی به منظور کاربرد در تحقیقات بعدی برای افزایش زمان دوره ترموفیلی و همچنین تجزیه سریع مواد آلی به منظور تسریع فرآیند کمپوست شدن انجام پذیرفت.

مواد و روش:

نمونه برداری: برای نمونه برداری از مکانهایی که بیشترین احتمال وجود میکروارگانیسم های ترموفیل می رفت، استفاده شد. این مکانها و بسترها به ترتیب زیر بودند: بازیافت تهران: (تل تازه از زباله های آلی، تل ۱۰ روز ماده از زباله های آلی بدون هوادهی، تل ۱۰ روز مانده از زباله های آلی هوادهی شده، تل ۲۰ روز زباله آلی، تل ۴۰ روز زباله آلی، تل ۶۰ روز زباله آلی، سایت دپو ۲۰ روز، سایت دپو ۴۰ روز، کمپوست درجه یک و کمپوست درجه دو). آذربایجان شرقی: (کود دامی تازه، کود دامی پوسیده، خاک استفاده شده از کود دامی پوسیده بعد از ۶ ماه، بستر ورمی کمپوست ۲۰ روز، بستر ورمی کمپوست ۴۰ روز، بستر ورمی کمپوست ۶۰ روز، ورمی کمپوست نهایی، ورمی کپوست استفاده شده در خاک بعد از ۶ ماه)، جنگل های ارس (از ۳ منطقه مختلف)، تبریز (از ۵ منطقه مختلف که دارای ماده آلی بالایی بودند). چهارمحال بختیاری. خراسان مرکزی. از جنگل های گرگان و همچنین ورمی کمپوست گرگان. کارخانه کمپوست رشت. یزد.

جداسازی میکروارگانیسم های ترموفیل: نمونه اولیه ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس اقدام به تهیه سری های رقت تا 10^{-7} گردید. با توجه به تست اولیه و سرعت رشد میکروب ها، رقتهای مناسب انتخاب گردید. سپس کشت رقتها در محیط NA در دمای ۵۸ درجه سلسیوس انجام گرفت. میکروارگانیسم‌هایی که توان رشد در این شرایط را داشتند برای تست‌های آنزیمی مورد نظر انتخاب شدند (Ting et al., 2013). میکروب هایی که در دمای ۵۸ درجه سلسیوس رشد کرده بودند در پلیت های دیگری خالص سازی و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

تست کیفی آنزیم سلولاز

برای این منظور جدایه‌ها در محیط کشت سلولز آگار حاوی ۰/۵ NaCl، ۰/۵ $MgSO_4.7H_2O$، ۱ KH_2PO_4، $MnSO_4.H_2O$ ۰/۰۱، ۰/۳ NH_4NO_3، ۰/۰۱ $FeSO_4.7H_2O$، ۱۰ CMC، آگار ۱۲ گرم بر لیتر در pH ۷ کشت شدند. بعد از ۴۸ ساعت محلول یک درصد کنگورد به مدت ۱۵ دقیقه به صورت لایه نازک رویی به محیط کشت اضافه شد و سپس با محلول یک مولار NaCl شستشو یافت. هاله شفاف اطراف کلنی به عنوان ملاک حل کنندگی سلولز در نظر گرفته شد.. در نهایت قطر هاله به قطر کلنی به عنوان معیار تجزیه سلولز اندازه‌گیری گردید (Gautam et al., 2012).

تست کمی آنزیم سلولاز:

برای این منظور ابتدا جدایه ها در محیط کشت مایع حاوی ۰/۰۳ $MgSO_4$، ۰/۲ K_2HPO_4، گلوکز ۱، ۰/۲۵ $(NH_4)_2SO_4$، پپتون ۱ درصد در pH ۷ کشت شد. جدایه ها در محیط کشت مورد نظر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس) گردید. محلول رویی حاوی آنزیم خام در بقیه مراحل تست استفاده شد. در مرحله بعدی محیط کشت حاوی سلولز به صورت زیر تهیه گردید: CMC ۱، ۰/۰۳ $MgSO_4$، ۰/۲ K_2HPO_4، گلوکز ۱، ۰/۲۵ $(NH_4)_2SO_4$، پپتون ۱ برحسب درصد. یک میلی لیتر از آنزیم خام به محیط کشت اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد شیک گردید. در پایان فعالیت آنزیم سلولاز با روش سولفوفنل اندازه گیری شد. به منظور تهیه منحنی استاندارد از گلوکز با غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ میلی گرم در لیتر استفاده گردید (DuBois et al., 1956; Patagundi et al., 2014).

نتایج و بحث:

در این تحقیق در مجموع ۳۲۷ جدایه گرمادوست از نمونه های مختلف جداسازی و خالص سازی شد و به منظور تست های کمی و کیفی سلولاز در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج نشان داد از بین ۳۲۷ جدایه گرمادوست که در مرحله اول خالص سازی گردیده بودند، ۱۳۷ جدایه فاقد توان سلولازی بودند. در بین بقیه جدایه ها، ۲۴ جدایه دارای بالاترین توان سلولازی بودند که در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس سنجش کیفی بیشترین فعالیت سلولازی به ترتیب در جدایه های شماره ۱۹۴، ۱۰۴ و ۱۲ مشاهده شد. همچنین جدایه های ۱۰۴، ۱۹۴، ۱۲، ۱۳ و ۶ به ترتیب بیشترین توان کمی سلولازی را داشتند. برخی نمونه های کمپوست، ورمی کمپوست و برخی خاکهای با ماده آلی زیاد در مجموع دارای بهترین جدایه های گرمادوست از لحاظ تجزیه سلولز بودند. بالا بودن فعالیت سلولازی در برخی خاکها را میتوان به فراوانی سوبسترا در آنها نسبت داد. کاهش میکروارگانیسم های پاتوژن و همچنین از بین رفتن میکروارگانیسم های مزوفیل در طول فرایند کمپوست شدن، می تواند علت رشد و تکثیر زیاد جدایه های ترموفیل باشد. در مراحل کمپوست شدن و ورمی کمپوست شدن میانگین فعالیت سلولازی بالا بود که می تواند به دلیل زیاد بودن مواد سلولزی در ابتدای فرآیند باشد.

جدول ۱- سنجش کیفی و کمی فعالیت آنزیم سلولاز در جدایه های گرمادوست منتخب

شماره جدایه	محل نمونه برداری	فعالیت سلولازی	
		قطر هاله به کلنی mm	mg glucose L^{-1} h^{-1}
۱۵۱	ورمی کپوست استفاده شده در خاک	۲/۹^{e}	۱۵۰/۶^{e}
۱۲۳	تل ۱۰ روز ماده از زباله های آلی بدون هوادهی	۱/۲^{f}	۱۱۰/۱^{h}
۱۹۱	خاک تبریز	۲/۵^{e}	۱۴۲/۷^{f}
۱۴۴	ورمی کمپوست	۱/۳^{f}	۱۱۱/۲^{h}
۲۰۰	خاک تبریز	۱/۱^{f}	۱۰۷/۸^{hi}
۳۲۷	جنگل های ارس	۱/۵^{f}	۱۲۲/۰^{g}
۲۶۷	جنگل های ارس	۱/۱^{f}	۱۰۵/۸^{hi}
۱۲	کمپوست	۷/۰^{b}	۲۱۶/۲^{b}
۹۷	سایت دپو ۴۰ روز	۱/۴^{f}	۱۰۲/۳^{i}
۱۰۴	تل ۱۰ روز ماده از زباله های آلی بدون هوادهی	۱۰/۳^{a}	۲۳۲/۵^{a}
۴	ورمی کمپوست	۶/۷^{b}	۱۹۸/۶^{bc}
۱	ورمی کمپوست	۴/۳^{cd}	۱۹۶/۳^{c}
۱۳	کمپوست	۴/۷^{c}	۲۱۰/۹^{b}
۲۱	کمپوست	۱/۱^{f}	۱۰۷/۹^{hi}

۲۶	کمپوست	۱/۱^{f}	۱۰۶/۲^{hi}
۶۸	کود دامی پوسیده	۴/۰^{d}	۱۶۴/۴^{d}
۴۷	خاک یزد	۴/۰^{d}	۱۶۲/۲^{d}
۳۷	خاک یزد	۲/۸^{e}	۱۵۲/۹^{e}
۶	ورمی کمپوست	۵/۶^{c}	۲۰۹/۵^{b}
۲۴	ورمی کمپوست	۱/۱^{f}	۱۰۵/۹^{i}
۴۰	بستر ورمی کمپوست ۶۰ روز	۱/۳^{f}	۱۱۸/۲^{g}
۳۰	خاک چهارمحال بختیاری	۱/۶^{f}	۱۲۹/۹^{g}
۱۹۴	خاک تبریز	۱۰/۵^{a}	۲۲۱/۲^{ab}
۲۲۰	خاک تبریز	۱/۱^{f}	۱۰۲/۹^{i}

***داده های هر ستون با داشتن حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی دار نمی باشند.**

منابع:

DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 28(3):350-356.

Echeverria, M.C., Cardelli, A., Bedini, S., Colombini, A., Incrocci, I., Castagna, A., Agnolucci, M., Cristani, C., Ranieri, A., Saviozzi, A., Nuti, M., 2012. Microbialenhanced composting of wet olive husks. Bioresour. Technol. 104, 509–517.

Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.k., Jamaluddin, M.K., 2012. *Int J Microbiol*, 325907: 1-12.

Goldstein, I.S., 1981. Organic Chemicals from Biomass. Boca Raton, Florida: CRC Press. ISBN0849355 311.

Hart, T.D., De Leij, F.A.A.M., Kinsey, G., Kelley, J., Lynch, J.M., 2001. Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw. World Journal of Microbiology & Biotechnology 18: 471–480

Kluczek-Turpeinen, B., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2003. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete Paecilomyces inflatus. Appl Microbiol Biotechnol . 61:374–379

Kutzner, H.J., 2000. Microbiology of composting. In: Klein, J., Winter, J. (Eds.), Biotechnology, Environmental Processes III e Solid Waste and Waste Gas Treatment, Preparation of Drinking Water, second edn, vol. 11c. Wiley-VCH, Weinheim.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiol Mol Biol Rev 64:461–488

Patagundi B. I., Shivasharan C.T., Kaliwal B. B. 2014. Isolation and Characterization of Cellulase producing bacteria from Soil. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3(5): 59-69.

Prabhu, A.K., Maheshwari, R., 1999. Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls. *J. Biosci.*, 24, No. 4, December 1999. pp 461-470.

Puchart, V., Vrsˇanska´, M., Svoboda, P., Pohl, J., O¨ gel, Z.B., Biely, P., 2004. Purification and characterization of two forms of endo-beta-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, Aspergillus fumigatus IMI 385708 (formerly Thermomyces lanuginosus IMI 158749). Biochim Biophys Acta 1674: 239–250

Singh, S., Madlala, A.M., Prior, B.A., 2003. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. FEMS Microbiol Rev 27:3–16

Ting A. S. Y., Tay H., Peh K. L., Tan W. S., Tee C. S. 2013. Novel isolation of thermophilic Ureibacillus terrenus from compost of empty fruit bunches (EFB) of oil palm and its enzymatic activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2. 162–164.

Isolation of cellulolytic thermophil microorganisms from soil and compost

A. Hemati [1], N. Aliasgharzad [2], R. Khakvar [3]

[1] Ph.D. student of Tabriz University Soil Biology Biotechnology
[2] Professor of Department of Soil Sciences, University of Tabriz
[3] Assistant Professor of Department of Plant Pathology, University of Tabriz

Abstract:
This study was performed to isolate thermophilic microorganisms possessing cellulase activity from different soils and Different stages of production. Samples were kept at 58 ° C and thermophilic microorganisms were isolated in NA medium. In this study, a total of 327 thermophilic isolates were separation and purification. Both qualitative and quantitative assays were used to determine cellulase activity. The highest cellulase activity was in isolates from vermicompost, compost cellulase activity was in isolates from Bed of organic waste without aeration, vermicompost, compost and the lowest activity was related to soil or compost. Isolates 12 and 104 and 194 were selected as the most efficient isolates in qualitative assay. Thus, in the qualitative assay, the isolates 6, 12, 13, 104 and 194 had the highest cellulase activity. At the end, Isolates 12 and 104 and 194 were selected as the most efficient isolates in cellulase activity.

Keywords: cellulase activity, compost, thermophile