سنجش فعالیت لیگنینازی در میکروارگانیسم های گرمادوست جداسازی شده از خاک و کمپوست

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

چکیده:
این تحقیق با هدف جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست با فعالیت لیگنینازی انجام گرفت. برای این‌منظور ابتدا جدایه‌ها از نمونه‌های مختلف خاک و کمپوست در دمای ۵۸ درجه‌سلسیوس در محیط کشت NA جداسازی گردیدند. سنجش های کیفی و کمی فعالیت لیگنینازی در محیط کشت چاپک با حضور کنگورد استفاده شد. کنگورد در اثر فعالیت لیگنینازی (فنل اکسیدازی) تجزیه شده و رنگ قرمز آن از بین میرود. از میان ۳۲۷ جدایه خالص سازی شده، ۱۱۸ جدایه فاقد توان لیگنینازی بود. جدایه های شماره ۱ و ۴۷ به ترتیب با داشتن ۹۶ و ۹۱ درصد تجزیه کنگورد به عنوان کارآمدترین جدایه ها در تست کمی لیگنیناز بودند. در تست کیفی نیز جدایه های ۱ و۱۲، ۴۷ و ۱۳ بیشترین نسبت قطر هاله به کلنی را داشتتند. جدایه های با فعالیت لیگنینازی قوی عمدتا از نمونه های ورمی کمپوست، کمپوست جداسازی شده بودند.
کلمات کلیدی: لیگنیناز، گرمادوست، کمپوست، ورمی کمپوست.

مقدمه:
فرایند تولید کمپوست عموما زمان بر می باشد. این زمان می تواند با تلقیح میکروارگانیسم های ترموفیل که توانایی تجزیه لیگنین را دارند سریع تر انجام میگیرد. تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از این میکروب ها می توانند با تسریع تجزیه مواد آلی و ترکیبات مقاوم، فرآیند کمپوست شدن را کوتاه نموده و خصوصیات کیفی و کمی کمپوست را نیز بهبود بخشند (Vargas-Gracia et al., 2010). لیگنوسلولز ها بیش از ۵۰٪ مواد گیاهی را در طبیعت تشکیل می دهند (Goldstein, 1981). لیگنوسلولزها جزء اصلی توده کمپوست از تشکیل میدهند. لیگنین یک ابر مولکول پایدار می باشد که قدرت و سفتی به دیواره سلول های گیاهی و محافظت سلولز و همی سلولز در برابر حمله میکروبی توسط آنزیم های هیدرولیتیک را فراهم می کند. با توجه به وجود لیگنین، تجزیه لیگنوسلولزها یک فرایند پیچیده ای می باشد که نیاز به اقدام به همکاری چندین آنزیم خارج سلولی، مانند لاکازها و پراکسیداز و سلولازها را دارد (Hatakka, 2001). برخی از سویه های قارچی توان حداکثری در تجزیه ی لیگنین و ترکیبات آلی مقاوم به تجزیه را دارا می باشند. اکتینومیست ها توانایی ۲۰ درصدی لیگنین را دارند ولی در دمای ترموفیلیک اکثریت قارچ ها از بین می روند و اکتینومیست هاجمعیت غالب را تشکیل می دهند. لذا با توجه به اینکه در دمای ترموفیلی اکثریت قارچ ها از بین می روند، تجزیه مواد آلی مقاوم به تعویق افتاده و زمان کمپوست شدن طولانی تر می گردد.

تعدادی از میکروارگانیسم های کمپوست که قادر به تخریب ساختار پلیمری لیگنین در کشت خالص هستند در برخی از تحقیقات گزارش شده اند (Chefetz et al. 1998; Tuomela et al. 2000). در میان آنها قارچهای رشته ای که متعلق به *Ascomycetes* یا *Duteromycetes* هستند، *آسپرژیلوس*، *پنیسیلیوم*، *فوزاریوم*، *Chaetomium*، *Trichoderma* و *Paecilomyces* نیز از جمله میکروارگانیسم های تجزیه کننده لیگنین می باشند (Tuomela et al.2000).

در این زمینه تحقیقات زیادی در کشورهای دیگر انجام شده و تعداد محدودی از این میکروارگانیسم‌ها را معرفی نموده اند که اکثرا به صورت ثبت اختراع بوده و برای خرید آن‌ها باید مبالغ هنگفتی پرداخت شود. از طرفی نیز با توجه به متفاوت بودن شرایط آب و هوایی ایران با کشورهای دیگر و همچنین افزایش روز افزون زائدات شهری، لزوم تحقیقاتی جامع و کامل برای یافتن میکروارگانیسم‌های بومی که توانایی تجزیه مواد سخت تجزیه شونده (لیگنین) را دارند و استفاده آن‌ها در تسریع روند

تجزیه زائدات شهری بیش از پیش احساس می‌گردد. تاکنون در خصوص گونه های باکتریایی ترموفیل تجزیه کننده لیگنین گزارش زیادی وجود ندارد. بر این اساس، این تحقیق با هدف جداسازی باکتریهای ترموفیل از نمونه های مختلف خاک و کمپوست و سنجش کیفی و کمی فعالیت لیگنینازی آنها انجام گرفت.

مواد و روش ها:

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 لیگنیناز: برای سنجش کیفی فعالیت لیگنینازی در جدایه ها از محیط کشت چاپک به همراه کنگورد استفاده شد. تجزیه کنگورد و کاهش رنگ قرمز یا بی رنگ شدن اطراف کلنی (ایجاد هاله بی رنگ) به عنوان فعالیت لیگنینازی در نظر گرفته شد. در این مرحله نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه های مختلف اندازه گیری گردید (Saparrat et al., 2008). در این تست، جدایه های فاقد فعالیت لیگنینازی، حذف شدند.

تست کمی لیگنیناز: با استفاده از محیط کشت چاپک بدون آگار، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت اقدام به رشد جدایه در محیط مایع در انکوباتور شیکر دار شد و سپس مقدار رشد میکروبی با استفاده از روش اسپکتروفتومتر به روش کدر سنجی تعیین گردید. در ادامه سوسپانسیون میکروبی سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی یک میلی لیتر (بعنوان منبع خام آنزیم) به محیط کشت مایع چاپک حاوی میلیگرم در لیتر ۲۰ کنگورد اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت و در مقدار جذب در طول موج ۵۱۰ nm توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید. به منظور کمی سازی داده ها، از غلظتهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلیگرم در لیتر کنگورد برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد. فعالیت لیگنینازی برحسب میلیگرم کنگورد تجزیه شده در هر لیتر محیط کشت در هر ساعت بیان شد.

نتایج و بحث:

جدول ۱- نتایج کیفی و کمی آنزیم لیگنیناز جدایه های گرمادوست حاصله از نمونه های مختلف

شماره جدایه	محل نمونه برداری	فعالیت لیگنینازی	
		قطر هاله به کلنی mm	mg Congo red L-1h-1
۱	ورمی کمپوست	۲۵/۲^{a}	۱۹/۲^{a}
۴	ورمی کمپوست	۱۵/۱^{d}	۱۰/۲^{d}
۶	ورمی کمپوست	۱۷/۱^{c}	۱۴/۵^{c}
۱۲	کمپوست	۲۳/۱^{a}	۱۷/۶^{b}
۱۳	کمپوست	۱۸/۹^{bc}	۱۴/۵^{c}
۲۴	ورمی کمپوست	۱۰/۰^{e}	۷/۶^{e}
۳۰	خاک چهارمحال بختیاری	۳/۳^{h}	۲/۷^{g}
۴۷	خاک یزد	۲۰/۰^{b}	۱۸/۱^{ab}
۶۸	کود دامی پوسیده	۱/۳^{i}	۱/۱^{i}
۱۰۴	تل ۱۰ روز ماده از زباله های آلی بدون هوادهی	۱۶/۷^{c}	۱۱/۸^{d}
۱۲۳	تل ۱۰ روز ماده از زباله های آلی بدون هوادهی	۶/۴^{f}	۲/۵^{g}
۱۴۴	ورمی کمپوست	۱/۲^{i}	۲/۶^{g}
۱۵۱	ورمی کپوست استفاده شده در خاک	۲۲/۷^{ab}	۱۶/۱^{b}
۱۹۱	خاک تبریز	۴/۷^{g}	۱/۶^{gi}
۲۲۰	خاک تبریز	۸/۶^{ef}	۴/۷^{f}
۲۳۴	کود دامی تازه	۲/۱^{hi}	۱/۶^{gi}
۲۶۸	تل ۴۰ روز زباله آلی	۵/۴^{g}	۳/۴^{fg}
۲۸۷	تل ۱۰ روز مانده از زباله های آلی هوادهی شده	۶/۴^{f}	۴/۶^{f}
۳۰۱	کمپوست	۴/۳^{h}	۲/۹^{g}
۳۲۷	خاک جنگل ارس	۵/۰^{g}	۱/۰^{i}

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

نتایج اندازه گیری کمی و کیفی لیگنیناز نشان داد که از میان ۳۲۷ جدایه، ۱۱۸ جدایه فاقد توان لیگنینازی هستند. ۲۰ جدایه به عنوان جدایه های برتر در جدول ۱ آورده شده است. در تست کمی لیگنیناز جدایه های شماره ۱ و ۴۷ با داشتن ۹۶ و ۹۱ درصد تجزیه کنگورد به عنوان قوی ترین جدایه ها از لحاظ لیگنینازی انتخاب گردیدند. در تست کیفی نیز جدایه های ۱ و۱۲ بیشترین قطر هاله به کلنی را داشتند و جدایه های ۴۷ و ۱۳ نیز در ردیفهای بعدی قرار گرفتند. نتایج نشان داد جدایه های حاصل از ورمی کمپوست، کمپوست و همچنین برخی نمونه های خاک منطقه یزد قوی ترین جدایه ها از لحاظ فعالیت لیگنینازی هستند. تجزیه مولکول های سخت مثل لیگنین و سایر مواد مشابه مثل ترکیبات آروماتیک تک مولکولی، نیازمند آنزیم های اکسیداتیو می باشد. به همین علت این آنزیم ها در صنایع مختلفی کاربرد گسترده ای دارند (Johannes et al., 2000; Saparrat et al., 2005). در میان آنزیم های تجزیه کننده لیگنین، لاکازها با خاصیت فنل اکسیدازی به عنوان

تجزیه کنندگی ترکیبات آروماتیک بررسی شده است (Johannes et al., 2000). کنگورد با توجه به ساختار آروماتیکی مشابه لیگنین در این تحقیق به عنوان جایگزین لیگنین انتخاب گردید (Saparrat et al., 2008).

منابع:

Chefetz B., Chen Y., Hadar Y. 1998. Purification and characterization of the laccase from Chaetomium thermophilium and its role in humification. Appl Environ Microbiol 64:3175–3179.

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

Hatakka A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinb_chel A (eds) Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications, vol 1. Lignin, humic substances and coal. Wiley VCH, Weinheim, pp 129–180

Johannes C., Majcherczyk A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl Environ Microbiol; 66:524–8.

Saparrat M.C.N., Guille´n F. 2005. Ligninolytic ability and potential biotechnology applications of the South American fungus Pleurotus laciniatocrenatus. Folia Microbiol; 50:155–60.

Saparrat M.C.N., Mocchiutti P., Liggieri C. S., Aulicino M. B., Caffini N.O., Balatti P. A., Martınez M.J. 2008. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus Grammothele subargentea LPSC no. 436 strain. Process Biochemistry 43, 368–375.

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

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72, 69e183.

Vargas-Gracia M.C., Surez-Estrella F.F., Lopez M.J., Moreno J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Manage. (Oxford) 30, 771–778.

Isolation of ligninolytic 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 ligninase activity. Samples were kept at 58 ° C and thermophilic microorganisms were isolated in NA medium. Both qualitative and quantitative assays were used to determine ligninase activity. The Czapek medium having Congo red was used for this purpose. The highest ligninase activity was in isolates from vermicompost, compost and some soils taken from Yazd region. Among the 327 isolates, 118 isolates lacking ligninolytic activity. Isolates 1 and 47 with 96 and 91 percent degradation of Congo red were selected as the most efficient isolates in quantitative assay. Thus, in the qualitative assay, the isolates 1, 12, 47 and 13 had the highest halo/colony diameter ratio. Overall, the efficient ligninolytic isolates were obtained from compost and vermicompost samples.

Keywords: liginase activity, thermophile, compost, vermicompost.