محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

تغییرات آنزیمی سلولاز و لیگنیناز در طول کمپوست شدن در بسترهای مختلف لیگنین و گونه‌های باکتری ترموفیل

آرش همتی[۱*]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، رضا خاکور[۳]

[۱] فارغ التحصیل دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی مقاوم به تجزیه موثر باشند. این تحقیق به منظور بررسی روند آنزیم‌های سلولاز و لیگنیناز در بسترهای با درصد متفاوت لیگنین و همچنین باکتری‌های ترموفیل توانا (*P. validus* 1VC، *P. koreensis* 12C و *B. nealsonii* 104C) در طول کمپوست‌شدن انجام گردید. نتایج نشان داد تیمارهای لیگنین زیاد دارای لیگنیناز بیشتر و سلولاز کمتری نسبت به تیمارهای لیگنین کم بودند. فعالیت سلولاز و لیگنیناز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت سلولازی بود. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 12C، 1VC و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت لیگنینازی بودند. نتایج نشان از امکان بررسی کاربرد این گونه‌ها به صورت تجاری دارد.

کلمات کلیدی: کمپوست، ترموفیل، سلولاز، لیگنیناز

مقدمه

تحقیقات انجام شده نشان داده است که شماری از میکروب‌ها می‌توانند در زمینه افزایش سرعت تجزیه مواد آلی و ترکیبات مقاوم به تجزیه موثر باشند و همچنین خصوصیات کیفی و کمی کمپوست را نیز بهبود بخشند (وارگاس-گراسیا، ۲۰۱۰).

در ابتدای فرآیند تولید کمپوست میزان کربن آلی توده بالاست ولی درصد قابل توجهی از آن در ماه اول تولید کمپوست کاهش می‌یابد که دلیل آن دماهای ترموفیلیک در این دوره می‌باشد. باکتری‌های ترموفیلیک ترکیبات آلی و از جمله کربن آلی را به سهولت تجزیه و دی اکسیدکربن، آب و حرارت تولید می‌کنند. در مراحل بعدی یعنی در مرحله بلوغ درصد کاهش کربن آلی کمتر از مراحل اولیه است که دلیل آن وجود ترکیبات کربنی مقاوم‌تر مثل سلولز و لیگنین می‌باشد (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۵ و برنال و همکاران، ۱۹۹۸). ترکیبات لیگنینی، مناسب‌ترین شاخص برای مشخص کردن رسیدگی کمپوست، در انتهای فرآیند کمپوست شدن می‌باشند (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۵؛ تومالا و همکاران، ۲۰۰۰).

لیگنوسلولزها متشکل از سه پلیمر عمده ساختاری، سلولز، همی‌سلولز و لیگنین هستند. کربوهیدرات از واحدهای بتا ۱و۴ پیرانوسیل[1] از قندهای مونومر تشکیل شده است؛ گلوکز در سلولز، گزیلوز در زایلان‌ها، مانوز در مانازها و مانوز و گلوکز در گلوکومانازها از جمله این مونومرها می‌باشند. آبکافت این کربوهیدرات‌ها از طریق تجزیه پیوندهای بتا ۱و۴ گلیکوزیدی در ساختار پلی‌ساکارید توسط سلولازها، زایلانازها، مانازها و لاکازها انجام می‌شود (سینگ و همکاران، ۲۰۰۳؛ پولیزلی و همکاران، ۲۰۰۵).

لیگنین فراوانترین پلیمر آروماتیک و دومین پلیمر آلی حاوی سلولز در روی زمین است. لیگنین بعد از سلولز به میزان ۶۰ میلیون تن در سال تولید می‌شود که در حدود ۳۰ درصد کربن آلی روی زمین را تشکیل می‌دهد که به نظر می‌رسد تعداد محدودی از میکروارگانیسم-ها می‌توانند آن را کاملاً تجزیه کنند. از نظر ساختمانی، بیوسنتز و تجزیه بیولوژیک لیگنین پیچیده می‌باشد (صفری سنجانی، ۱۳۸۲). دیواره سلولی چوب حاوی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین می‌باشد که همگی به شکل فیبرهای کریستالی مقاوم به تجزیه بوده و فرآیند تجزیه آن‌ها بسیار پیچیده و نیازمند سیستم آنزیمی متعدد و رادیکال‌های هیدرکسیل می‌باشد (کامیمورا و همکاران، ۲۰۱۷). در طبیعت، تجزیه لیگنین در دو مرحله انجام می شود: ۱- تجزیه اولیه لیگنین و تولید ترکیبات آروماتیک با وزن مولکولی پایین و ۲-

* ایمیل نویسنده مسئول: Hemati.arash@yahoo.com

[1] Pyranosyl

تجزیه مواد آروماتیک تولید شده. تجزیه لیگنین در طبیعت توسط اکسیدوردوکتازهای خارج سلولی مانند لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز، پراکسیدازها، لاکاز و پراکسیدازهای تجزیه‌کننده رنگ، از طریق تشکیل واسطه‌های رادیکال فنولیک انجام می‌شود (پلگیونی و همکاران، ۲۰۱۵).

باتوجه به موارد مطرح شده، تغییرات لیگنین و سلولز در فرآیند کمپوست شدن به منظور تعیین رسیدگی کمپوست، مهم می‌باشد. لذا این تحقیق به منظور بررسی روند آنزیم‌های سلولاز و لیگنیناز در بسترهای با درصد متفاوت لیگنین و همچنین باکتری‌های ترموفیل توانا در تولید آنزیم‌های لیگنوسلولاز در طول کمپوست‌شدن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

برای تولید کمپوست از ضایعات بخش کشاورزی استفاده شد. برای این منظور دو بستر به شرح زیر انتخاب گردید:

بستر اول مربوط به ضایعات بخش کشاورزی با درصد لیگنین کم (در حدود ۲۰-۱۵ درصد) بود. برای این منظور از چند ماده آلی با درصدهای مختلف استفاده شد (جدول ۱).

بستر دوم مربوط به ضایعات چوب با درصد لیگنین زیاد (درحدود ۳۰- ۲۵ درصد) بود. برای این منظور از کارگاه‌های تولید چوب، ضایعات جمع‌آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب مواد استفاده شده در ایجاد تل‌های کمپوست

	برگ سیب	بقایای تر گوجه فرنگی	بقایای تر سیب زمینی	خاک اره
لیگنین کم	۳۲	۳۳	۳۲	۳
لیگنین زیاد	۵	۵	۵	۸۵

کلیه مواد مورد استفاده برای کمپوست‌شدن، در ابعاد زیر دو سانتی‌متر پودر شد. مقدار کربن و نیتروژن از تجزیه CHNSO با دستگاه آنالایزر تعیین و از حدود ۴۰ کیلوگرم اوره برای تنظیم C/N در حدود ۲۵ در تیمارهای لیگنین زیاد استفاده گردید. با استفاده از موادی که قبلا ذکر شد اقدام به تل زنی شد. تل‌ها با ۳ متر طول ۱/۵ متر عرض و ۱ متر ارتفاع با وزن تقریبی ۲۲۵۰ کیلوگرم ایجاد شدند.

این تحقیق با طرح آشیانه‌ای فاکتوریل در جایگاه کمپوست شهرستان مراغه به مدت ۶ ماه اجرا شد. برای این منظور فاکتور اول شامل دو بستر آلی (بستر با درصد لیگنین زیاد و بستر با درصد لیگنین کم) و فاکتور دوم شامل جدایه‌های باکتری (سه جدایه تنها 1VC *P. validus*، 12C *P. koreensis* و 104C *B. nealsonii*، مخلوط سه جدایه و شاهد بدون تلقیح) بود. تیمارها با یک تکرار مجموعاً با ۱۰ تیمار انجام پذیرفت. جدایه‌های مورد استفاده قبلا در تحقیقات شناسایی و خالص‌سازی شده بودند (همتی، ۱۳۹۷).

سلولاز

یک گرم از نمونه‌های کمپوست با ۱۵ میلی‌لیتر CM-سلولز (هفت گرم در لیتر) به عنوان سوبسترا و ۱۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ $^{\circ}C$ با pH ۵/۵ نگه‌داری شدند. پتاسیم هگزاسیانوفرات احیا شده با سولفات فریک آمونیوم در یک محلول اسیدی واکنش داده و کمپلکس فریک هگزاسیانوفرات تشکیل می‌دهد. در نهایت کمپلکس فریک هگزاسیانوفرات به روش رنگ‌سنجی در طول موج ۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه گردید (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم). یک واحد از فعالیت سلولاز به عنوان یک میکرومول قند تولید شده در هر دقیقه بیان شد (علی اصغرزاد، ۱۳۸۵).

لیگنیناز

برای استخراج آنزیم، یک گرم نمونه کمپوست با ۵۰ میلی لیتر بافر استات سدیم (۵۰ میلی مولار، pH 4.6) به هر ارلن اضافه شد، به طور کامل مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه (۹۰ دور در دقیقه) تکان خورد. این مخلوط فیلتر شده و برای فعالیت لیگنینولیتیک خارج‌سلولی مورد آزمایش قرار گرفت. برای اینکه فعالیت میکروبی در عصاره آنزیمی غیرفعال شود، بلافاصله جوشانده شد (ماچادو و همکاران،۲۰۰۵).رنگ‌زدایی RBBR با واکنش دادن ۵ میلی لیتر از عصاره آنزیمی که در مرحله قبل استخراج شده بود با ۵۰ میکرولیتر از RBBR دو درصد انجام شد (المر و همکاران، ۱۹۸۴). بعد از یک

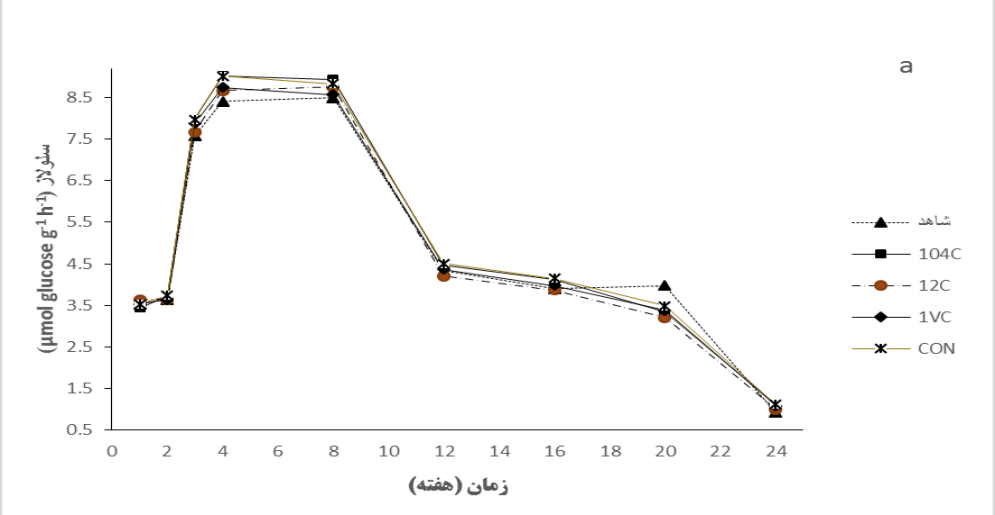
ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط آنزیمی با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد و مقدار جذب در طول موج ۵۸۵ نانومتر قرائت شد. این کار برای نمونه شاهد بدون آنزیم نیز انجام گردید و بمنظور برآورد نهایی فعالیت آنزیمی مقدار شاهد از مقدار قرائت شده هر تیمار کسر گردید.

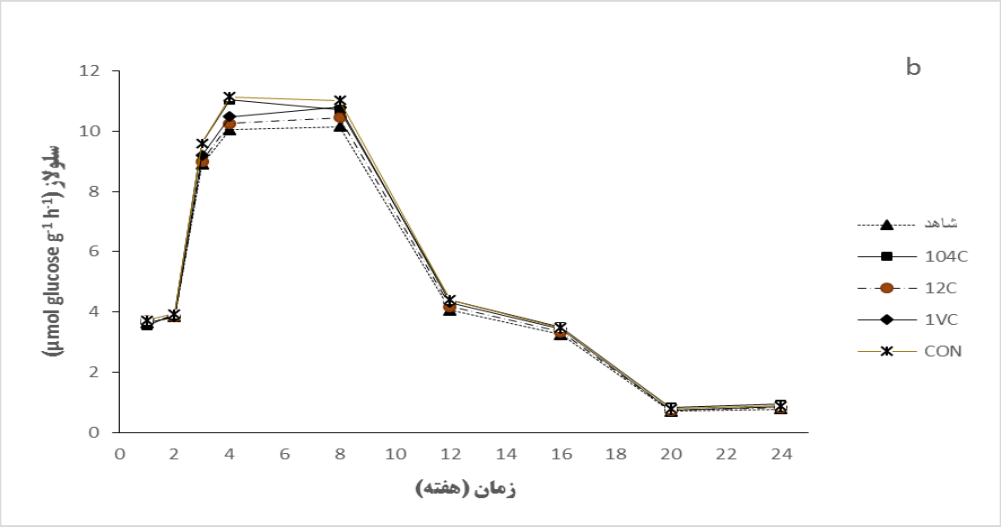
نتایج حاصله به کمک نرم افزار SAS تجزیه و جداول تجزیه واریانس مربوطه تهیه گردید. هم چنین مقایسه میانگین داده‌ها، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار MSTAT-C انجام شد. نمودارها به کمک نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

سلولاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد فعالیت آنزیم سلولاز در تمامی فاکتورها معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت سلولاز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. تیمارهای لیگنین پایین فعالیت بیشتری از این آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین بالا داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت بود. از هفته هشت به بعد تیمارهای لیگنین بالا دارای فعالیت بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین بودند. نتایج نشان داد گونه‌های باکتری استفاده شده موجب افزایش فعالیت این آنزیم در بسترهای کمپوستی شده اند (شکل ۱). با توجه به افزایش دما در فاز ترموفیلی، تغییر ساختار پلیمرها رخ می‌دهد و موجب افزایش مواد سهل‌الوصول (سوبسترا) شده و منجر به افزایش فرآیند آنزیمی و رشد میکروبی در ادامه فرآیند کمپوست‌شدن می‌شود (کوشیک و همکاران، ۲۰۱۳). کاهش فعالیت این آنزیم در هفته‌های انتهایی نشان از کاهش سوبسترا، پایان روند کمپوست‌شدن و رسیدگی محصول تولیدی می‌باشد (سونها-کودا و همکاران، ۲۰۰۷). بالا بودن مواد سلولزی در تیمارهای لیگنین پایین می‌تواند دلیل افزایش فعالیت این آنزیم در این تیمارها باشد. همچنین با توجه به سخت تجزیه پذیر بودن مواد لیگنینی و تجزیه دو مرحله‌ای این مواد، بعد از هفته هشت افزایش این آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین پایین نیز ممکن است در اثر وجود مواد سهل‌الوصول در این تیمارها باشد و اتمام مواد سلولزی در تیمارهای لیگنین پایین نیز دلیل این کاهش می‌تواند باشد.





شکل ۱- تغییرات فعالیت آنزیم سلولاز در طول کمپوست‌شدن (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌ها

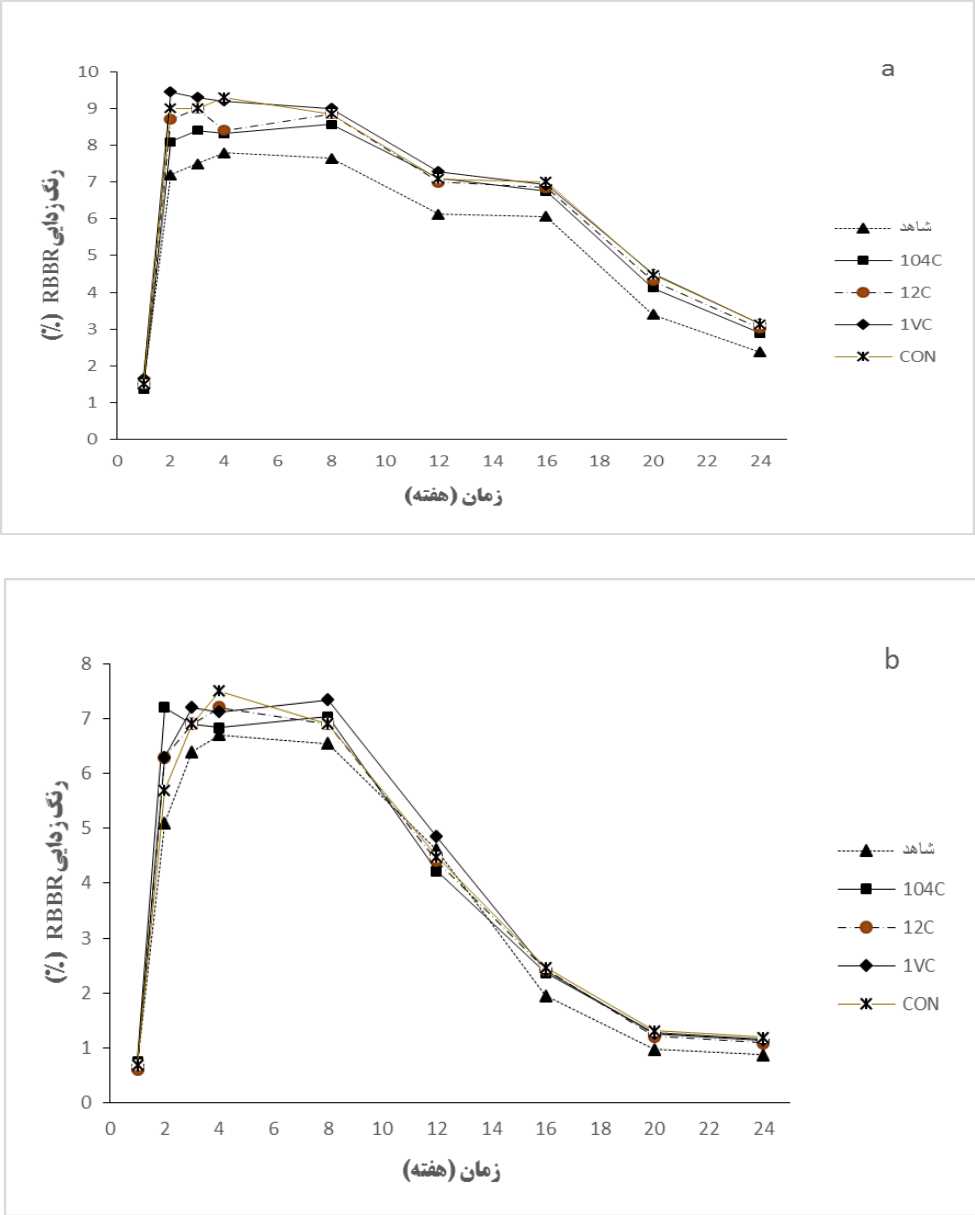
منبع تغییر	df	میانگین مربعات	
		سلولاز	لیگنیناز
باکتری	۴	۰/۹۴**	۶/۱۶**
لیگنین	۱	۳/۳۰**	۳۱۶/۴۲**
زمان	۸	۲۲۰/۵۶**	۱۳/۶۹**
باکتری*زمان	۳۲	۰/۱۳**	۰/۲۹**
باکتری*لیگنین	۴	۰/۱۴**	۱/۵۶**
باکتری*لیگنین*زمان	۴۰	۳/۰۸**	۱/۶۵**
تکرار	۲	۰/۴۸**	۰/۰۷**
خطا	۱۷۶	۰/۰۳	۰/۰۳
CV.	-	۳/۰۹	۳/۳۸

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد *معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ns غیر معنی‌دار

لیگنیناز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد فعالیت آنزیم لیگنیناز در تمامی فاکتورها معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت این آنزیم در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود. بیشترین فعالیت آنزیم لیگنیناز در فاز ترموفیلی در همه تیمارها دیده شد و کمترین آن در فاز رسیدگی مشاهده شد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 1VC ،12C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت بود و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت بودند. تیمارهای لیگنین پایین بعد از هفته ۸، کاهش شدیدی در مقدار این آنزیم داشتند درحالیکه تیمارهای لیگنین بالا دارای شیب کاهشی کمتری بودند (شکل ۲). با توجه به توان بالای تولید آنزیم لیگنیناز در این گونه‌های باکتری (همتی، ۱۳۹۷)، این گونه‌های باکتری لیگنیناز بیشتری در بسترهای

کمپوست نیز تولید کرده‌اند. با توجه به وجود سوبسترای بیشتر در تیمارهای لیگنین بالا احتمالاً همین موجب بالا بودن فعالیت آنزیم لیگنیناز در این تیمارها باشد. همچنین به دلیل سخت تجزیه پذیر بودن مواد لیگنینی احتمالاً با وجود سوبسترا در بسترهای لیگنین بالا این آنزیم در مدت زیادی در بسترهای کمپوست با مقدار زیاد تولید شده است (پلگیونی و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل ۲- تغییرات فعالیت آنزیم لیگنیناز در طول کمپوست‌شدن (a: بسترهای با لیگنین بالا؛ b: بسترهای با لیگنین پایین)

نتیجه‌گیری

تیمارهای لیگنین زیاد دارای لیگنیناز بیشتر و سلولاز کمتری نسبت به تیمارهای لیگنین کم بودند. فعالیت سلولاز در فاز ترموفیلی افزایش یافت و در فاز خنک شدن و رسیدگی تا ماه سوم ادامه داشت و در ادامه کاهش معنی‌داری را نشان داد. تیمارهای لیگنین پایین فعالیت بیشتری از این

آنزیم نسبت به تیمارهای لیگنین بالا داشتند. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین جدایه 104C و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت و تیمار شاهد بدون باکتری دارای کمترین فعالیت بود. از هفته هشت به بعد تیمارهای لیگنین بالا دارای فعالیت بیشتری نسبت به تیمارهای لیگنین پایین بودند. برعکس نتایج سلولاز، فعالیت آنزیم لیگنیناز در تیمارهای لیگنین بالا بیشتر از لیگنین پایین بود. بیشترین فعالیت آنزیم لیگنیناز در فاز ترموفیلی در همه تیمارها دیده شد و کمترین آن در فاز رسیدگی مشاهده شد. در بین تیمارهای لیگنین بالا و پایین گونه‌های باکتری 12C، 1VC و کنسرسیوم دارای بیشترین فعالیت بود و تیمارهای شاهد دارای کمترین فعالیت بودند. تیمارهای لیگنین پایین بعد از هفته ۸، کاهش شدیدی در مقدار این آنزیم داشتند درحالیکه تیمارهای لیگنین بالا دارای شیب کاهشی کمتری بودند. در تیمارهای باکتریایی فعالیت آنزیم‌ها بیشتر از تیمار شاهد بود که نشان از توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های ذکر شده می‌باشد. نتایج نشان از امکان بررسی کاربرد این گونه‌ها به صورت تجاری دارد.

منابع

صفری سنجانی، ع. ا. ۱۳۸۲. بیوشیمی و بیولوژی خاک. دانشگاه بو علی سینا. انتشارات چاپ اول. ۳۸۴ صفحه.

عبدلی، م.ع.، رساپور، م. و کمالی، س.م. ۱۳۹۵. کمپوست (اصول مهندسی و مباحث طراحی)، ۲۹۷۳. ۲۵۲ صفحه.

علی اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روشهای آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. ترجمه. ۵۲۲ صفحه.

همتی، آ. ۱۳۹۷. جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست تجزیه‌کننده لیگنین برای تسریع تولید و بهبود کیفیت کمپوست. رساله دکتری تخصصی. مهندسی علوم خاک - بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک. دانشگاه تبریز.

Cunha-Queda, A.C., Ribeiro, H.M., Ramos, A. and Cabral, F. 2007. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eucalyptus bark. Bioresour. Technol. 98: 3213-3220.

Kamimura, N., Takahashi, K., Mori, K., Araki, T., Fujita, M., Higuchi, Y. and Masai, E. 2017. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade. ENV MICROBIOL REP. 9(6): 679–705.

Kaushik, P., Malik, A. and Sharma, S. 2013. Vermicomposting: an Eco-Friendly Option for Fermentation and Dye Decolourization waste disposal. Clean Soil, Air, Water. 41: 616–621.

Machado, K.M.G., Matheus, D.R. and Bononi, V.L.R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Braz J Microbiol. 36:246-252.

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. and Amorim, D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 577–591

Pollegioni, L., Tonin, F. and Rosini, E. 2015. Lignin-degrading enzymes. FEBS J. 282: 1190–1213.

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

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresour. Technol. 72: 169-183.

Ulmer, D.C. and Leisola, M.S.A. 1984. Fiechter, A. Possible induction of the ligninolytic system of Phanerochaete chrysosporium. J. Biotechnol. 1: 13-24,

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. and Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. Waste Manag. 30: 771-778.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Enzymatic changes of cellulase and ligninase in different substrates of lignin and thermophilic bacteria during composting

Arash. Hemati [1]*, Nasser Aliasgharzad [2], Reza Khakvar [3]

[1] Ph.D. 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

Research has shown that a number of microbes can be effective in decomposing organic matter decomposition. This research was conducted to investigate the process of cellulase and ligninase enzymes in substrates with different percentages of lignin as well as potent thermophilic bacteria (three isolates of 1VC (*P. validus*), 12C (*P. koreensis*) and 104C (*B. nealsonii*) during composting. The results showed that high lignin treatments had higher ligninase and less cellulase than low lignin treatments. The activity of cellulase and ligninase in the thermophilic phase increased and continued in the cooling and refluxing phase until the third month and further decreased significantly. Among the high and low lignin treatments, 104C and consortium had the highest activity and control without bacteria had the least cellulose activity. Among the high and low lignin treatments, the 12C, 1VC and consortium species had the highest activity and control treatments with the least ligninase activity. The results indicate that it is possible to investigate the use of these species commercially.

Keywords: Compost, Thermophil, Cellulase, Ligninase.