ارزیابی توان تجزیه لیگنوسلولز برخی از باکتری‌های جدا شده از انواع خاک و مواد در حال پوسیدگی

محسن برجی[۱]

چکیده

اخیراً، کاربرد میکروارگانیسم‌ها برای تبدیل بیوماس گیاهی به بسیاری از فراورده‌های با ارزش تجاری مورد بررسی قرار گرفته است. تعدادی از نمونه‌های خاک، مواد گیاهی در حال پوسیدگی و کودهای دامی پوسیده شده از بخش‌های مختلف استان مرکزی به منظور جداسازی و تعیین هویت باکتری‌های هوازی که قادر به استفاده از نمونه‌های لیگنین به عنوان تنها منبع کربن بودند، جمع آوری شدند. باکتری‌ها با استفاده از سه نمونه لیگنین، کلش گندم و خاک اره عصاره‌گیری شده با آب داغ جداسازی شدند. دو باکتری جداسازی شده که از جنس‌های استرپتومایسز (*Streptomyces* sp.) و سودوموناس (*Pseudomonades* sp.) شناسایی شدند، قادر به تجزیه لیگنین و پلی‌ساکاریدهای کلش گندم و خاک اره بودند. میزان رشد استرپتومایسز و سودوموناس در محیط دارای کلش گندم بیشتر از محیط حاوی خاک اره بود. نتایج دیگر نشان داد که فراوری باکتریایی مواد لیگنوسلولزی و استفاده از مکمل ازت در محیط کشت، آثار قابل توجهی بر ترکیب شیمیایی کلش و خاک اره داشته است. هر دو جنس باکتری موجب افزایش پروتئین خام، لیگنین پلی‌مری قابل رسوب در اسید، لیگنین محلول و کاهش کربوهیدرات‌ها و لیگنین نامحلول کلش گندم و خاک اره در مقایسه با شاهد بدون باکتری شدند ($P< ۰/۰۱$). استرپتومایسز به خصوص در محیط کشت دارای کلش توان تجزیه‌ای بیشتری نسبت به سودوموناس نشان داد. استفاده از عصاره مخمر (به عنوان منبع ازت) توان تجزیه‌ای باکتری‌ها را بهبود بخشید. نتیجه این پژوهش نشان داد که این باکتری‌ها می‌توانند برای بهینه سازی بیولوژیکی بازمانده‌های کشاورزی به منظور تغذیه دام، مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: لیگنوسلولز، تجزیه بیولوژیک، استرپتومایسز، سودوموناس، کلش گندم، خاک اره

مقدمه

بر اساس داده‌های FAO در سال ۱۹۹٤، سطح علفزارها (Grassland) در جهان، ۳/۴ میلیارد هکتار است که حداقل هر سال ۳۰-۱۰ میلیارد تن گیاه علفی (بر اساس وزن خشک) در این علفزارها تولید می‌شود (۱۸). اگر چه به دلیل کم بودن قابلیت هضم، فقط ۳۰-۲۰ درصد از بیوماس تولیدی علفزارها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در نواحی تمرکز جمعیت در جهان، حداکثر سطح زمین‌ها

۱. مربی علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

Archive of SID
www.SID.ir

به تولید غذای انسان اختصاص یافته و بنابراین زمین کمتری برای تولید علوفه مورد نیاز دام‌ها در دسترس است. با افزایش جمعیت، مقدار غله قابل مصرف در خوراک دام‌ها به تدریج کاهش خواهد یافت. به علاوه با افزایش قیمت خوراک‌های با کیفیت بیشتر، کاربرد غذاهای ارزان‌تر در جیره دام‌ها ضروری‌تر می‌شود (۵). بنابراین در آینده، به دلایل اقتصادی و کاهش زمین قابل استفاده برای تولید خوراک دام به تدریج استفاده از کاه، کلش و سایر محصولات فرعی در جیره دام‌ها افزایش خواهد یافت.

کاه‌ها برای مدت طولانی به عنوان منبع تأمین انرژی در تغذیهٔ نشخوارکنندگان دارای اهمیت بوده، اگرچه در هنگام برداشت غلات، گیاه به بلوغ کامل رسیده و کاه دارای ارزش غذایی ذاتی پایینی است. البته این در حالی است که این ماده حداقل دارای ۷۰ درصد کربوهیدرات است، بنابراین می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه مهم تأمین کننده انرژی برای حیوانات مد نظر قرار گیرد (۱۱). در نتیجه هر روش فراوری که بتواند راندمان تولید انرژی این مواد را حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد بهبود بخشد، افزایش بسیاری در منابع خوراک دام دنیا به وجود خواهد آورد (۱۱). از این رو سعی شده است تا با کاربرد روش‌هایی میزان راندمان استفاده از کربوهیدرات‌های موجود در کاه افزایش یابد که مهم‌ترین آنها، اعمال روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک است (۱٤). روش آخر می‌تواند مزایای خاصی نسبت به دو روش دیگر داشته باشد (۱). فرض بر این است که روش فراوری بیولوژیک نسبت به سایر روش‌های فراوری، ارزش غذایی را به میزان بیشتری افزایش داده، آلودگی کمتری برای دام، انسان و محیط زیست فراهم می‌کند، کاربری آن آسان‌تر بوده، استهلاک کمتری در تأسیسات و تجهیزات ایجاد می‌کند و بالاخره ارزان‌تر است (۱) .

در سالیان اخیر، تجزیهٔ بیولوژیک لیگنین به عنوان بهترین روش تجزیه ساختمان‌های پیچیده موجود در مواد فوق العاده الیافی، مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱). از آنجایی که بیشترین مشکلات مرتبط با فراوری مواد لیگنوسلولزی به دلیل وجود لیگنین می‌باشد، عمدهٔ تحقیقات به شکستن اتصال بین این ماده و هولوسلولزها و یا تجزیه خود ملکول لیگنین متمرکز شده است (۱۱). دو نوع مهم از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده لیگنین که تا کنون بیشتر مورد بررسی قرار گرفته، قارچ‌های سفید پوسیدگی (*Phanerochaete chrysosporium*) و نوعی از اکتینومیست‌ها (*Streptomyces viridosporus*) بوده است.

اکتینومیست‌ها (Actinomycetes) باکتری‌های رشته‌ای هستند که در محیط‌های غنی از لیگنوسلولز، از جمله خاک، کمپوست، علوفه خشک، کلش یا خرده‌های چوب زندگی می‌کنند و از نظر تجزیه لیگنوسلولز، دارای توانایی زیادی هستند (۲۲).

اکتینومیست‌ها به وفور پلی مرهای لیگنین و به خصوص لیگنین گیاهان گرامینه‌ای را به لیگنین پلی مری قابل ترسیب در اسید (APPL) (Acid precipitable polymeric lignin) تبدیل می‌نمایند (۲، ۷، ۱۳، ۲٦ و ۳٦). APPL یک لیگنین تغییر یافته از نظر ساختمانی است. این حد واسط جدید یک لیگنین پلی‌مری محلول در آب و قابل ترسیب در اسید است که یک حد واسط تجزیه‌ای خیلی مهم می‌باشد. این ترکیب که در هنگام تجزیه لیگنین در مقادیر زیادی تولید می‌شود، مخلوط ناهمگنی از ترکیبات با وزن مولکولی مساوی یا بیشتر از ۲۰۰۰۰ است (۱۳). همچنان که گونه‌های مختلف نوکاردیا نیز تا ۱۰ درصد لیگنین مصنوعی نشان دار را معدنی نمودند (۱۷). استرپتومایسزها نیز از جمله گروه‌های مهم اکتینومیست‌هاست.

اما علاوه بر اکتینومیست‌ها تجزیه لیگنین به وسیلهٔ باکتری‌های غیر رشته‌ای نیز توسط هایدر و تروجانوسکی (۱۷)، پریستیلو و همکاران (۲۸، ۲۹ و ۳۰) و موری و همکاران (۲٤) گزارش شده است. معدنی شدن لیگنین به وسیله سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) ۱/٤ -۱/۲ درصد (۳۰) و به وسیله سراشیا مارسیسنس (*Seratia marcescens*) تا ۲ درصد بود، اگر چه سراشیا مارسیسنس تا ۴۴ درصد لیگنین را محلول نمود (۲۹). باکتری‌های جداشده از کمپوست یا خاک

Archive of SID

www.SID.ir

بـه نـام آزوتوبـاکتر (*Azotobacter*)، باسـیلوس مگـاتریوم (*Bacillus megaterium*)، و سراشیا مارسیسنس، قادر بـه رنـگ بری یا محلـول کـردن لیگنـین بودنـد (۲٤، ۲۸ و ۲۹)، سراشـیا مارسیسنس آنزیم لاکازی تولیـد نمـود کـه فعالیـت ایـن آنـزیم هم‌بستگی مثبتی با معدنی و محلول کردن لیگنین داشت (۲۹).

اودیر و همکـاران (۲۵) ۱۲ بـاکتری گـرم منفـی هـوازی از خانواده‌های سودوموناسـه ونیـسریاسه را در خـصوص توانـایی شان برای محلول نمودن لیگنین دی اکسان صـنوبر بـدون مـاده مغذی کمکی از ۱۲۲ نمونـه خـاک، جداسـازی نمودنـد. میـزان تجزیه لیگنین دی اکسان و لیگنین چوب آسیاب شده بین ۲۰ تا ۴۰ درصد مقدار اولیه طی ۷ روز دوره انکوباسیون بود.

شریواسـتاوا و همکـاران (۳۵) نیـز تـوان حـذف لیگنـین از شیرابه سیاه صنایع کاغذ سازی را به وسیله باکتری سودوموناس پوتیدا مورد بررسی قرار دادند و حداکثر رانـدمان را پـس از ۱۰ روز، ۸۰ درصد تعیین نمودند.

بر اساس نظر محققین (۱۵) سودوموناس‌ها که بـاکتری‌هـای میله‌ای گرم منفی هوازی‌اند، بالاترین تـوان تجزیـه‌ای را دارنـد. از جملـه ایـن گونـه‌هـا مـی‌تـوان بـه سـودوموناس پوتیـدا (*Pseudomonas putida*) و سـودوموناس فلوریـسنس (*P. fluorescens*) اشاره نمود.

هدف از پژوهش حاضر، جداسـازی بـاکتری‌هـای قـادر بـه تجزیه لیگنین و پلی ساکاریدهای مواد خشبی و بررسی توانـایی تجزیه‌ای باکتری‌های جدا شده بود. هم‌چنـین در ایـن بررسـی، تأثیر کاربرد یک منبع ازته برای بهبود فعالیت باکتری‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه لیگنین و پلی ساکاریدها

کلش گندم و خاک اره (به دلیل داشتن لیگنین زیاد) تهیه شـد و با استفاده از یک آسیاب چکشی به ابعـاد یـک میلـی‌متـر خـرد گردیدنـد. سـپس کلـش و خـاک اره چهاربـار بـا آب جـوش عصاره‌گیری شدند (عمل عصاره‌گیری تا زمانی ادامه مـی‌یافـت که عصاره حاصل بدون رنگ می‌شد) و برای ۲۴ سـاعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. لیگنین از کلـش و خـاک اره به سه روش مختلف استخراج شد (۲۰).

۱. لیگنین دی اکسان (Dioxane lignin)

۲۵ گرم کلش یا خاک اره در ابعاد یک میلی‌متر خـرد گردیـده و برای ۵۰ ساعت با ۵۰ میلی لیتر اتانول (۹۵ ٪) – بنزن (۹۹/۷ ٪) در حـال جـوش (۱:۱) عـصاره گیـری شـد. سـپس در یـک دسـی کـاتور خـلاء دار خـشک شـدند. کلـش و خـاک اره عصاره گیـری شـده بـرای مـدت ۱۲ سـاعت بـا ۳۰ میلـی‌لیتـر محلـــول در حـــال جـــوش، متـــشکل از دی اکـــسان (1,4-Dioxane, or 1,4-diethylene oxide, Merck Co. LTD.) (۹۹/۵٪) – آب (۹:۱) عصاره گیری شـد. عـصارهٔ تحـت خـلاء تغلیظ شده و لیگنین در آب مقطر دی یونیزه شـده رسـوب داده شد. لیگنین رسوب داده شده سه مرتبه بـا آب شـسته و خـشک گردید، سپس با ۵۰ میلی لیتر اتر نفت شسته شد (۲۰).

۲. لیگنین کلیسون (Klason-lignin)

۲۵ گـرم کلـش و خـاک اره عـصاره گیـری شـده بـا آب داغ (همچنـان کـه در بـالا توصـیف شـد) بـا ۵۰ میلـی‌لیتـر اسـید سولفوریک ۷۲٪ در ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای مـدت ۲ سـاعت فراوری شد. مخلوط به وسیله آب تا ۳٪ غلظت اسید رقیق شـد و فراوری تا ۴ سـاعت دیگـر ادامـه یافـت. بقایـا کـاملاً بـا آب شستشو داده شد (۲۰).

۳. لیگنین اسید هیدروکلریدریک (HCl- Lignin)

۲۵ گرم کلش یا خاک اره آسیاب شده (به اندازه یک میلـی‌متـر) در ۵۰ میلـی‌لیتـر محلـول اسـید هیدروکلریـدریک (٤۰٪) (وزن مخصوص ۱/۱۵ در ۵ درجـه سـانتی‌گـراد) بـا دمـای ۵ درجـه سانتی‌گراد ریخته شد و برای ۲ ساعت تا حد لزوم بـرای حفـظ دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مخلوط یخ اضـافه گردیـد و اجـازه داده شد که تا ۱۸ ساعت باقی بماند. رسوب پس از صاف کردن با آب جوش شسته و خشک شد (۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

لیگنین‌ها، هم‌چنین کلش و خاک اره (عصاره گیری شده با آب جوش) در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر در هر دو محیط کشت جامد و مایع مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه لیگنوسلولز کلش گندم و خاک اره

کلش گندم و خاک اره با استفاده از یک آسیاب تیغه‌ای در چند مرحله تا اندازه نهایی ۵ میلی‌متر آسیاب شدند. سپس ابتدا با آب داغ (تا مرحلهٔ تغییر نکردن رنگ آب)، در مرحله دوم با مخلوط بنزن (۹۹/۷٪) – اتانول (۹۵٪) (۱:۱ حجمی / حجمی)، در مرحله سوم با اتانول (۹۵٪) و در مرحله آخر دوباره با آب داغ عصاره گیری و بعد از آن در هوا خشک شدند. از این لیگنوسلولزها برای جداسازی باکتری‌ها و نیز بررسی توان تجزیه‌ای باکتری‌ها استفاده شد (۳۳).

جدا سازی باکتری‌ها

در این پژوهش برای جدا سازی باکتری‌ها از مواد مختلفی مانند مواد گیاهی در حال پوسیدگی، خاک جنگلی، خاک معمولی، رسوبات رودخانه‌ای و مواد کودی در حال پوسیدگی استفاده شد (۳۷). با توجه به اهمیت و توانایی استرپتومایسزها در تجزیه لیگنین بر استفاده از محیط‌های اختصاصی به منظور جداسازی این نوع باکتری‌ها تأکید شده است.

تقریباً ۱۵–۱۰ میلی گرم از نمونه‌های جمع آوری شده برای جداسازی باکتری‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژیک استریل به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر تکان داده شد. یک میلی‌لیتر از مخلوط به دست آمده برای تلقیح فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محلول نمک‌های معدنی پایه (محلول M9 (6.2g Na_2HPO_4 + 3.5g KH_2PO_4 + 0.5g NaCl + 1.0g NH_4Cl (در هر لیتر آب شیر)) و ۰/۵ درصد یکی از انواع لیگنین، کلش گندم و خاک اره عصاره گیری شده مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های ۰/۱ میلی‌لیتری نیز برای تلقیح ظروف پتری آگار دار حاوی محلول نمک‌های معدنی پایه و ۰/۵ درصد یکی از انواع لیگنین یا لیگنوسلولز استفاده شد. ارلن‌ها و پتری‌های تهیه شده برای ٤٨ ساعت در دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند. بعد از این مدت، امکان رشد باکتری‌ها بر روی پتری‌ها (محیط جامد) با مشاهده مستقیم و در ارلن‌ها (محیط مایع) با روش رنگ آمیزی گرم و پتری‌های کانت آگار (Count agar) از طریق مشاهده و شمارش کلنی‌ها مشخص شد. هم‌چنین با انجام سه زیر کشت متوالی، باکتری‌ها تا حد امکان خالص سازی شدند.

جدا سازی باکتری‌ها با تأکید بر استرپتومایسزها

برای جداسازی استرپتومایسزها از نمونه‌های جمع آوری شده از دو محیط کشت جامد و مایع استفاده شد (۱۲ و ۳۱). ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده میکروبی (که قبلاً ذکر شد) بر روی پتری‌هایی که با استفاده از آگار، محلول نمک‌های معدنی پایه، یکی از انواع لیگنین، کلش گندم یا خاک اره (به میزان ۰/۰۵ درصد) و عصاره مخمر (به میزان ۰/۵ درصد وزنی به حجمی) به عنوان مکمل ازته (فقط در محیط‌هایی که دارای لیگنین بودند) پر شده بود، کشت شدند. انکوباسیون در دمای اطاق و هم‌چنین دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، دمای بهینه برای تجزیه لیگنوسلولز تعیین شده است (۳۱).

در محیط کشت مایع، ۱ گرم از نمونه‌های جمع آوری شده برای جداسازی باکتری به ۹۹ میلی‌لیتر از همان محیط کشت غنی شده استریل بدون آگار اضافه شد. از ماده اکتیدیون (Trade name of cycloheximide) (۱۰۰ میکرو گرم در هر میلی‌لیتر) به عنوان ضد قارچ استفاده شد که در محلول نمک‌های معدنی پایه استریل شده (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۵ اتمسفر به مدت ۲ ساعت) و به شکل محلول به محیط کشت اضافه شد. فلاسک‌ها برای یک هفته در ۳۵ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند. یک روز در میان نمونه‌هایی از هر محیط توسط لوپ نمونه برداری بر روی ظروف پتری حاوی تریپتون – عصاره مخمر آگار دار منتقل شد. پس از ظهور کلنی‌ها، کشت مجدد از آنها انجام شد. نمونه‌هایی که پس از سه

Archive of SID

www.SID.ir

بار انتقال هنوز توان رشد داشتند به عنوان نمونه‌های مثبت در نظر گرفته شدند (۳۱). در پایان نمونه‌هایی که بر روی هر ۵ نوع سوبسترا (سه نوع لیگنین، کلش گندم و خاک اره) رشد داشتند انتخاب شدند.

به منظور تشخیص جدایه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها و رنگ‌ها، نمونه‌ها به مؤسسه رازی انتقال یافت.

منحنی رشد باکتری‌های جداسازی شده در محیط دارای کلش گندم و خاک اره عصاره گیری شده تعیین شد. برای این منظور ۱۲ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری انتخاب شد و در داخل هر کدام ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول M9 و ۲ گرم کلش گندم یا خاک اره عصاره گیری شده ریخته شد. ارلن‌ها استریل شدند (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۵ اتمسفر به مدت ۲ ساعت) و به هر ارلن ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت باکتری (تهیه شده از مواد جمع آوری شده همانند مراحل قبل) اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ روز اینکوبه شدند. هر ٤ روز بطری‌های مربوط به هر دوره از انکوباتور خارج و تعداد باکتری‌ها شمارش می‌شد. نحوه تعیین منحنی رشد با استفاده از روش شمارش روی پلیت بود (۹). شمارش تعداد باکتری‌ها هر چهار روز و حداقل با سه تکرار انجام می‌شد. pH هر بطری نیز هم زمان با شمارش تعداد باکتری‌ها با استفاده از یک الکترود نازک pH متر دیجیتالی (Jenway 3020, UK) تعیین شد.

تعیین تجزیه لیگنوسلولزهای کلش گندم و خاک اره

چهار گرم از لیگنوسلولزهای کلش گندم و یا خاک اره در بطری‌های ۲ لیتری ریخته شد. به بطری‌ها ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول M9 اضافه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ اتمسفر برای ۳ ساعت استریل شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر باکتری جداسازی شده، برای تلقیح به هر یک از بطری‌ها استفاده شد. تعداد و هم‌چنین کنترل زنده بودن باکتری‌ها در روز اول انکوباسیون با کشت نمونه‌هایی از هر بطری بر روی پتری‌های حاوی آگار مغذی انجام شد. بطری‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ روز اینکوبه شدند. بعد از طی این مدت بطری‌ها از انکوباتور خارج شدند. پس از خشک کردن محتویات بطری‌ها در داخل خشک کن، کاهش وزن ماده خشک آنها (در مقایسه با وزن اولیه = ٤ گرم) محاسبه شد (۲، ٦، ۱۳ و ۲۰). به منظور بررسی تأثیر باکتری‌های جدا شده بر ترکیب شیمیایی مواد لیگنوسلولزی مورد مطالعه، روند انجام آزمایش به شکل فوق بود، با این تفاوت که مدت انکوباسیون ٦ هفته بود. در پایان انکوباسیون مواد لیگنوسلولزی باقی‌مانده با استفاده از کاغذ صافی جدا و درصد پروتئین (۳)، درصد کربوهیدرات (٦)، لیگنین پلی مری محلول در آب (APPL) (۸)، لیگنین محلول در اسید سولفوریک ۷۲ ٪ و لیگنین نامحلول در اسید سولفوریک ۷۲ ٪ (۳۸) تعیین شد. برای تعیین APPL پس از طی دوره انکوباسیون، بطری‌ها خارج و به هر بطری ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. آب اضافه شده با قرار دادن بطری‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲ ساعت تبخیر شد. مخلوط بطری‌ها با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف شد. محلول زیر صافی با استفاده از اسید کلریدریک ۱۲ مولار تا pH ۱ تا ۲ اسیدی و APPL رسوب داده شد. APPL رسوب داده شده با استفاده از سانتریفوژ (۱۶۰۰۰ دور برای ۳۰ دقیقه) جمع آوری شد. سپس دوبار با آب اسیدی شسته و پس از آن که در دمای آزمایشگاه خشک شد وزن گردید. مقدار تولید APPL با نمونه شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) مقایسه شد. برای تعیین لیگنین محلول پس از هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی در اسد سولفوریک ۷۲٪ و سپس اسید سولفوریک چهار درصد و صاف کردن نمونه، جذب نوری محتویات زیر صافی در طول موج ۲۰۵ نانومتر قرائت شد. برای تعیین لیگنین نامحلول در اسید به بقایای لیگنوسلولزی هوا خشک، اسید سولفوریک ۷۲٪ اضافه شد. پس از هیدرولیز کامل مواد، غلظت اسید به سه درصد کاهش یافت. سپس محتویات ارلن‌ها با استفاده از کراسیبل‌های صافی‌دار، صاف و کراسیبل‌ها در دمای ۳ ± ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد (تا رسیدن به وزن ثابت) برای دو ساعت خشک

Archive of SID

www.SID.ir

شدند. مواد موجود در کراسیبل‌ها شامل لیگنین نامحلول در اسید و خاکستر نامحلول در اسید بود. کراسیبل‌ها در کوره الکتریکی با دمای ۲۵± ۵۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و خاکسترگیری شدند. پس از سرد شدن، وزن کشی و در نهایت لیگنین نامحلول در اسید با استفاده از فرمول‌های موجود تعیین شد. در یک آزمایش دیگر آثار استفاده از عصاره مخمر به میزان ۰/۵ درصد به عنوان مکمل نیتروژن دار همراه با فراوری باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. سایر شرایط آزمایش با آنچه که در بالا ذکر شد مشابه بود.

در آزمایش تعیین تعداد باکتری‌ها (منحنی رشد) و تعیین pH محیط کشت از یک طرح کاملاً تصادفی متعادل با آزمایش فاکتوریل استفاده شد که عامل‌ها (فاکتورها) شامل استفاده یا عدم استفاده از باکتری (سه سطح) و ماده لیگنوسلولزی (دو سطح) بودند. در تعیین تجزیه لیگنوسلولزها نیز عوامل آزمایشی همانند آزمایش فوق بود. در هر دو آزمایش برای هر گروه (تیمار) سه تکرار در نظر گرفته شد. برای محاسبه و ارزیابی داده‌ها از نرم افزار Excell و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب تجزیه آماری یا طرح‌های آزمایشی از مدل خطی نرم افزار SAS (٤) استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ به کار رفت.

نتایج و بحث

از بین انواع متعدد باکتری‌های رشد یافته، در نهایت دو جنس باکتریایی پس از چندین بار کشت متوالی، جداسازی و شناسایی شد. یکی از آنها متعلق به جنس استرپتومایسز (*Streptomyces* sp.) است که به خانواده استرپتومیستاسه (Streptomycetacea) تعلق دارد. این باکتری‌ها عموماً رشته‌ای شکل و قادر به تشکیل شبکه‌های میسلیومی است. این باکتری‌ها بر روی انواع محیط‌های آزمایشگاهی و مواد طبیعی امکان رشد داشته که باکتری‌های موجود در اغلب خاک‌ها هستند و نیز از نظر کاربرد صنعتی، حائز اهمیت‌اند (۲۱).

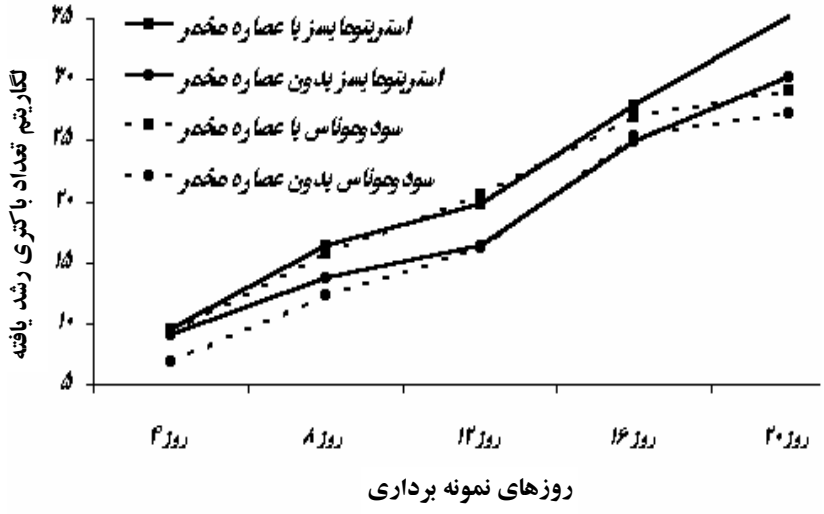
جدایه باکتری دیگری که در این پژوهش شناسایی شد، به جنس سودوموناس‌ها (*Pseudomonas* sp.) تعلق داشت. سودوموناس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی غیر تخمیری‌اند. سودوموناس‌ها بر اساس خصوصیات (فنوتیپی یا ژنوتیپی) به ۵ گروه تقسیم می‌شود که هر گروه نیز دارای چندین گونه است (۲۱).

پیروز و همکاران (۳۲) یک‌صد نمونه خاک از قسمت‌های مختلف منطقه زاهدان جمع‌آوری نمودند و از این تعداد نمونه، یک‌صدوچهل و سه سویه اکتینومیستی جداسازی کردند. از این تعداد، ۲۰ سویه استرپتومایسز سومالینسیس (*Streptomyces somaliensis*) و ۸٦ سویه دیگر متعلق به جنس استرپتومایسز بوده که گونه آنها گزارش نشده است. لیسی (۲۳) نیز گزارش کرد که ۸۰ درصد اکتینومیست‌های کمپوست، گونه‌های استرپتومایسزی بود. بنابراین می‌توان به پراکندگی غالب باکتری‌های مذکور در محیط‌های محتوی مواد لیگنوسلولزی و اهمیت این باکتری‌ها در چرخه کربن محیط زیست در محیط‌هایی مانند خاک و مواد گیاهی در حال پوسیدگی توجه نمود.

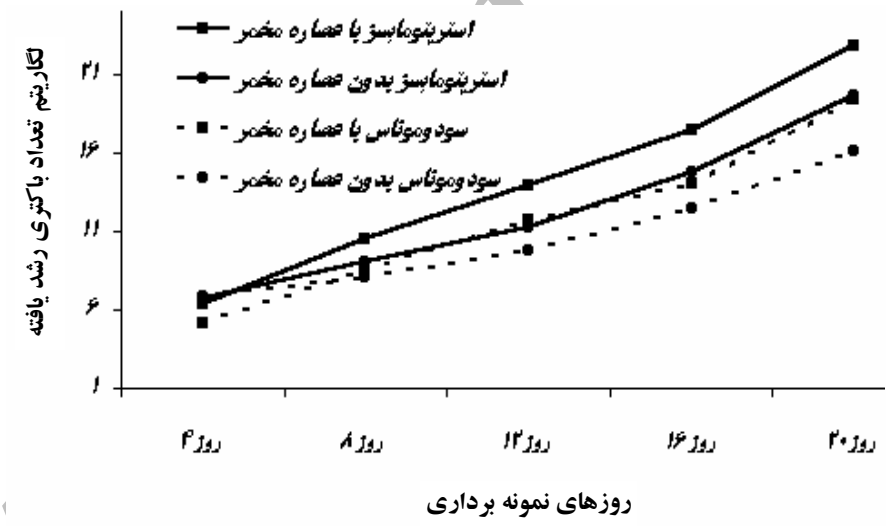
در ارتباط با میزان رشد این باکتری‌ها نتایج این آزمایش نشان داد که از بین عوامل مورد بررسی، نوع ماده لیگنوسلولزی، و عامل کاربرد و جنس باکتری، دارای تأثیر بسیار معنی‌دار بر میزان رشد باکتری بودند (جدول ۱)، در صورتی که استفاده از عصاره مخمر، چنین اثری نداشت (جدول ۱). از بین مواد لیگنوسلولزی، بیشترین رشد باکتری در محیط دارای کلش گندم نسبت به خاک اره مشاهده شد ($P< ۰/۰۱$) (شکل ۱ و ۲). افزودن عصاره مخمر به عنوان منبع ازت آلی نسبت به شاهد بدون عصاره مخمر اگرچه از نظر عددی موجب افزایش رشد هر دو جنس باکتری شده، ولی اثر معنی‌داری نداشته است. از بین گونه‌های باکتریایی مورد بررسی نیز بیشترین میزان رشد باکتریایی در محیط کشت تلقیح شده با استرپتومایسز در مقایسه با سودوموناس و شاهد تعیین شد ($P< ۰/۰۱$). نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها نیز نشان داد که در مجموع،

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. منحنی رشد باکتری‌های استرپتومایسز و سودرموناس بر روی کلش گندم با و بدون عصاره مخمر



شکل ۲. منحنی رشد باکتری‌های استرپتومایسز و سودرموناس بر روی خاک اره با و بدون عصاره مخمر

میزان رشد باکتری در محیط کشت تلقیح شده با استرپتومایسز، دارای کلش گندم و عصاره مخمر نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشتر بوده است (جدول ۱ و ۲).

در خصوص pH ، نتایج مشابه با نتایج رشد باکتری‌ها بود. از بین فاکتورهای مورد بررسی، نوع ماده لیگنوسلولزی و گونه باکتریایی دارای تأثیر بسیار معنی‌داری ($P< ۰/۰۱$) بودند، در حالی که افزودن عصاره مخمر در مقایسه با شاهد (بدون عصاره مخمر) تأثیر معنی‌داری بر pH محیط کشت نداشت (جدول ۱). pH در محیط‌های کشت حاوی استرپتومایسز بیش از همه بوده و به ترتیب محیط‌های کشت سودوموناس و شاهد پس از آن

www.SID.ir

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی تأثیر فراوری باکتریایی در مقایسه با شاهد (بدون باکتری) بر رشد باکتری، pH محیط کشت، کاهش وزن و تغییر ترکیبات شیمیایی مواد لیگنوسلولزی (کلش گندم و خاک اره)

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد باکتری (لگاریتم)	pH محیط کشت	پروتئین (٪)	کربوهیدرات (٪)	وزن باقی مانده (گرم)	APPL[1]	لیگنین محلول (٪)	لیگنین نامحلول (٪)
ماده لیگنوسلولزی (A)	۱	۱۱۲٤/۱۵**	۱/۵۳**	۳۵/۰۹**	۲۷٦/۰٦**	۰/۱۲۵***	۰/۰۰۸۲**	۱/٤۵**	۱۱۲۹/۱۸**
مکمل نیتروژن دار (B)	۱	٦/۹٦ ns	۰/۰٤۲ ns	۲/۹۰**	۲۲٤/٤۵**	۰/۱۲۵***	۰/۰۰۵۲**	۵/۰۸۵**	۳/٤۷ ns
وجود و نوع باکتری (C)	۲	٤٦۳۳/٦۵**	۱۹/۲۷**	۱۵/۹٦**	۱۲۳٦/۸۲**	۳/٤۸**	۰/۱۲**	۱۹/۹۳**	۵۷/۲۲**
A*B	۱	۰/۹۲ ns	۰/٤۸ ns	۰/۰۰٦ ns	۵/۰۷ ns	۰/۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۵۱ ns	۰/۰۰۵۱ ns	۰/۰۰۰۹ ns
A*C	۲	۳۰۷/۳۰**	۰/۱۷ ns	۰/۱۵ ns	۱/٤٤ ns	۰/۱۱***	۰/۰۰۲۵**	۰/۰٤٤ ns	۰/۱٦۳ ns
B*C	۲	۰/۱۸ ns	۰/۰٦۳ ns	۰/۱۱ ns	۵۵/۵۵*	۰/۱۸*	۰/۰۰۰۹۳***	۰/۳٤**	۰/۲۵۵ ns
A*B*C	۲	۰/۳۲ ns	۰/۰۲۳ ns	۰/۰۰۷ ns	۱۷/٤۵ ns	۰/۰۲٦ ns	۰/۰۰۰۰٤۸ ns	۰/۱۲ ns	۰/۲۸۵ ns
خطا[2]		۳۲/۱۱	۰/۱٦	۰/۰٦۲	۱۷/۲۵	۰/۰۳٤	۰/۰۰۰۲۸	۰/۰۵۵	٤/۹۷
ضریب تغییرات		۵۲/۳	٦/۰۷	۷/۳۳	۷/۷۹	۵/۳۸	۱۳/۵٦	۱٤/۲۵	۱۱/٤۵
R^2		۰/٦۷	۰/۵۹	۰/۹۸	۰/۹۰	۰/۹۰	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۱
خطای استاندارد		۵/٦۷	۰/٤۱	۰/۲۵	۳/۷۷	۰/۱۸	۰/۰۱۷	۰/۲۳	۲/۲۳

ns: نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن

*، ** و ***: به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر عوامل آزمایشی در سطوح احتمال ۱۰، ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

۱. جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شده است.

۲. درجه آزادی خطا برای تعداد باکتری و pH ، ۱٦۸ و برای سایر معیارهای اندازه‌گیری شده ۲٤ بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی تأثیر فراوری باکتریایی در مقایسه با شاهد (بدون باکتری) بر رشد باکتری، pH محیط کشت، کاهش وزن و تغییر ترکیبات شیمیایی مواد لیگنوسلولزی (کلش گندم و خاک اره)

تیمارها	تعداد باکتری (لگاریتم)	pH محیط کشت	پروتئین (٪)	کربوهیدرات (٪)	وزن باقی مانده (گرم)	APPL[1]	لیگنین محلول (٪)	لیگنین نامحلول (٪)
کلش، بدون عصاره مخمر، بدون باکتری	۰/۰۰ b	٦/٩٤ cd	۳/۰٤ fg	٥٤/٦٦ bc	۳/۸۷ ab	۰/۰۱٦ f	-۰/۱٥۳ g	۱٦/۱٦ c
کلش، بدون عصاره مخمر، استرپتومایسز	۱۸/۸٤ a	٦/٩۲ de	٥/۳۰ b	۳۸/۸۸ f	۲/۹۲ e	۰/۲۲۰ b	۲/۲٦ c	۱۲/۰۱ cd
کلش، بدون عصاره مخمر، سودوموناس	۱۸/٥٥ a	۶/۸۷ e	۳/۹۴ d	۴۹/۷۹ cd	۳/۴۷ cd	۰/۱۳۳ e	۱/۱٥ e	۱۴/۳۷ cd
کلش، با عصاره مخمر، بدون باکتری	۰/۰۰ b	۶/۹۴ cd	۳/۵۳ de	۵۷/۶۸ ab	۴/۱۹ a	۰/۰۲۴ f	۰/۴۶ f	۱٥/٥۰ cd
کلش، با عصاره مخمر، استرپتومایسز	۱۸/۹٤ a	۷/۰۸ a	۵/۸۴ a	۳۱/۵۸ g	۲/۶۰ f	۰/۲۶۷ a	۳/۱۷ b	۱۱/۳۶ d
کلش، با عصاره مخمر، سودوموناس	۱۸/٦۹ a	٦/٩٤ cd	۴/۳۸ c	۴۱/۳۵ ef	۳/۲۸ d	۰/۱۷۷ cd	۱/۸۱ d	۱۳/۸٥ cd
خاک اره، بدون عصاره مخمر، بدون باکتری	۰/۲۲ b	۶/۹۸ bcd	۱/۸۵ j	۶۲/۵۲ a	۳/۹۴ ab	۰/۰۰۹ f	۰/۳۷ f	۲۷/۳۰ a
خاک اره، بدون عصاره مخمر، استرپتومایسز	۱۸/٦٦ a	۷/۰۰ bc	۳/۱٥ ef	۴۵/۷۵ de	۳/۱۹ de	۰/۱۶۶ cd	۲/۴۲ c	۲۳/۳۲ ab
خاک اره، بدون عصاره مخمر، سودوموناس	۱۸/۲٤ a	۶/۹۶ cd	۲/۳۱ h	۵۳/۹۳ bc	۳/۶۵ bc	۰/۱۲۶ e	۱/۵۹ d	۲٥/٥٥ ab
خاک اره، با عصاره مخمر، بدون باکتری	۰/۱۶ b	۶/۹۸ bcd	۲/۰۷ i	۵۱/۳۹ ab	۳/۹۶ ab	۰/۰۱۱ f	۰/۵۸ f	۲۷/۳۰ a
خاک اره، با عصاره مخمر، استرپتومایسز	۱۸/٥۹ a	۷/۰۶ a	۳/۶۶ d	۳۶/۷۵ fg	۲/۹۴ e	۰/۱۹۴ bc	۳/۶۹ a	۲۲/۱۴ b
خاک اره، با عصاره مخمر، سودوموناس	۱۸/۴٥ a	۷/۰۳ ab	۲/۹۱ g	۴۸/۹۱ cd	۳/۳۷ cd	۰/۱۴۹ de	۲/۴۴ c	۲۴/۸۴ ab
خطای استاندارد	۶/۵۷	۰/۰۷۸	۰/۰۶۲	۱۴/۲۵	۰/۰۳۴	۰/۰۰۰۲۹	۰/۰۵۵	۴/۹۷

۱. جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شده است.

- در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف غیر همسان است در سطح ٥٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.
- میزان پروتئین نمونه اولیه کلش گندم ۳/۵ درصد و خاک اره ۲ درصد بود. نسبت کربن به ازت در کلش ٦٨ و در خاک اره ١٥٦ بود.
- میزان کربوهیدرات نمونه اولیه کلش گندم ٥٦ درصد و خاک اره ٦٠ درصد بود.
- میزان لیگنین نمونه اولیه کلش گندم ١٦ درصد و خاک اره ٢٨ درصد بود.

Archive of SID

www.SID.ir

قرار گرفتند. هم‌چنین به همان ترتیب که در مورد رشد باکتریایی عنوان شد، اگر چه pH در محیط‌های کشت دارای عصاره مخمر بیشتر بود اختلاف معنی‌داری در مقایسه با محیط‌های کشت بدون عصاره مخمر دیده نشد (جدول ۱). ذکر این نکته حائز اهمیت است که در محیط کشت‌هایی که رشد باکتریایی بیشتر بود، pH بالاتری نیز تعیین شد.

مسلماً رشد باکتری‌ها نشان دهنده توان آنها در تولید و ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده اجزای دیواره سلولی است، زیرا در محیط‌های کشت، تنها منبع کربن، مواد لیگنوسلولزی است. بنابراین تنها در صورتی باکتری‌ها امکان رشد خواهند داشت که بتوانند با استفاده از آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز و پراکسیدازهای خود از کربن موجود استفاده کنند (۳٦). از آنجایی که تقریباً تمام شرایط رشد باکتری‌ها (از جمله فشار اکسیژن، pH ، دما و ترکیب محیط پایه) یکسان بوده است، تنها عوامل اثر گذار را می‌توان نوع باکتری، تعداد اولیه، تجمع محصولات، افزودن ازت و ماده مغذی منبع کربن (کلش گندم و خاک اره) دانست.

تیونسر و همکاران (۳۹) در پژوهش بر روی باکتری ترمومونوسپورا فوسکا (*Thermomonospora fusca*) باتوجه به تعیین هم زمان میزان رشد و تولید آنزیم‌های برون سلولی تجزیه کننده لیگنوسلولز، نتیجه گرفتند که بیشترین تولید آنزیم در هنگام حداکثر رشد، صورت گرفته که نشان می‌دهد تولید این گونه آنزیم‌ها کاملاً وابسته به رشد است.

یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در روند رشد و فعالیت باکتری‌ها می‌تواند مربوط به ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی مواد خشبی، میزان و نوع ارتباطات لیگنین با سایر اجزای دیواره سلولی، وجود کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی و محلول، وجود و میزان ازت و نسبت کربن به ازت باشد (۱۰) که قابلیت استفاده از مواد خشبی به وسیله باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به عنوان مثال میزان لیگنین کاه چاودار (۲۷/۲ درصد) تقریباً برابر با میزان لیگنین چوب درخت توسکا (۲۵/۷ درصد) است، در حالی که قابلیت هضم کاه چاودار خیلی بیشتر است (۳٤). خود میزان لیگنین نیز از جمله عوامل مهم در میزان تجزیه لیگنوسلولز می‌باشد. ریچارد (۳٤) بخش قابل تجزیه روزنامه (با ۲۱/۹ درصد لیگنین) را ۲۲ درصد ذکر نمود درحالی که بخش قابل تجزیه کاغذ اداری (کاغذ سفید با ۴٪ لیگنین) ۸۲ درصد بود. نسبت کربن به ازت نیز یکی از عوامل مهم در تجزیه بیولوژیک لیگنوسلولز است، حال آن که تجزیه بیولوژیک کربن کاغذ روزنامه (با نسبت کربن به ازت ۱۱۵/۲) ۱۸/۴ درصد بود، این میزان برای کاه گندم (با نسبت کربن به ازت ۸۸/۷) تقریباً دو برابر و مساوی با ۳۳/۶ درصد بود (۳٤).

استفاده از ترکیبات ازت‌دار در محیط کشت، معمولاً آثار قابل توجهی بر میزان رشد میکروبی اعمال می‌نماید که این نتیجه هم در مورد باکتری‌ها و هم در مورد قارچ‌ها به دست آمده است. به عنوان مثال جیروکس و همکاران (۱٦) گزارش نمودند که اولاً کلرید آمونیوم به عنوان یک منبع ازت منجر به افزایش رشد دوگونه استرپتومایسزی تحت مطالعه آنها شد و ثانیاً این که عصاره مخمر نسبت به کلرید آمونیوم منبع ازت بهتری بود و رشد استرپتومایسز و یریدوسپوروس (*Streptomyces viridosporus*) را افزایش داد.

در خصوص pH نیز نتایج این پژوهش با گزارش محققین دیگر هم‌آهنگی دارد. پستای و همکاران (۲۷) در بررسی‌های خود روی یازده سویه اکتینومیستی جدا شده از موریانه‌ها در ارتباط با تغییر pH به نتایج قابل توجهی رسیدند. سویه‌های A6 و T7A در طول چهار هفته رشد pH محیط رشد را از ۷/۱ به ۷/۵ تا ۸ افزایش دادند. این محققین اعتقاد دارند که سویه‌ها به دلیل خصوصیات ژنتیکی و هم‌چنین محیط‌هایی که از آن جدا شده‌اند، ممکن است دارای مسیرهای متابولیکی متفاوتی باشند. مثلاً در مورد سویه‌هایی که pH محیط آنها تا حدی اسیدی بود گفته شد که احتمالاً این سویه‌ها متابولیت‌های بازی کمتری در محیط رشد خود آزاد می‌کنند (۲۷).

از نتایج دیگر، بالا بودن pH در محیط کشت دارای کلش گندم بود که با محیط کشت دیگر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. چنین روندی را می‌توان با دو موضوع مرتبط دانست. اول آن که خصوصیت شیمیایی خود ماده لیگنوسلولزی منجر

Archive of SID

www.SID.ir

به افزایش pH محیط کشت می‌شود و دوم آن که خصوصیات شیمیایی کلش گندم موجب افزایش میزان رشد باکتری‌ها شده که در نتیجه فعالیت آنها، pH محیط تغییر نموده است. به علاوه افزایش رشد باکتریایی در تغییر pH محیط بی‌تأثیر نیست. یکی از دلایل اصلی در افزایش pH محیط کشت، افزایش آمونیاک محیط در نتیجه فعالیت تجزیه پروتئین مواد لیگنوسلولزی به وسیله باکتری‌ها می‌باشد (١٦). به همین دلیل در محیط دارای کلش به دلیل نسبت کربن به ازت کمتر (در مقایسه با خاک اره) و هم‌چنین زمانی که از ترکیبات نیتروژن دار در محیط کشت استفاده می‌شود (عصاره مخمر)، pH محیط افزایش یافته است. عامل دیگر را می‌توان تأثیر محیط پایه یعنی محیط M9 حاوی املاح تامپونی در نظر گرفت. طبق نظر یانگ و همکاران (٤٠) سیستم بافری محیط کشت، pH مطلوب برای رشد باکتری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باید توجه نمود که در پژوهش حاضر نیز وجود محلول M9 که شامل ترکیبات بافری قابل توجهی (همچون دی سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، کلرید سدیم و کلرید آمونیوم) است می‌تواند از تغییرات زیاد pH محیط جلوگیری کند. افزایش pH در نتیجه استفاده از عصاره مخمر نیز قابل توجیه به نظر می‌رسد، چراکه چنین ترکیباتی منجر به بهبود فعالیت باکتریایی (در نتیجه افزایش pH محیط) می‌شوند. همچنان که در پژوهش شرایواستاوا و همکاران (٣٥) افزودن کلرید آمونیوم، شرایط فعالیت باکتریایی را بهبود بخشید و pH محیط کشت را افزایش داد.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر فراوری باکتریایی و افزودن عصاره مخمر (در مقایسه با شاهدهای بدون باکتری و بدون عصاره مخمر) بر تغییر وزن و ترکیب شیمیایی مواد لیگنوسلولزی در جدول ۱و ۲ نشان داده شده است. در ارتباط با میزان پروتئین، مشخص شد که هرسه فاکتور مورد بررسی، تأثیر بسیار معنی‌داری بر پروتئین مواد لیگنوسلولزی داشتند (جدول ۱) ($P< ۰/۰۱$) به نحوی که در بعضی از موارد، باکتری‌های مورد بررسی (به خصوص در صورت استفاده از عصاره مخمر) موجب افزایش ۷۵ درصدی میزان پروتئین نمونه شده‌اند (محاسبات ارائه نشده‌اند). همچنان که کر و کر (١٩) نیز با رشد یک آرتروباکتر بر روی پوسته بادام زمینی، میزان پروتئین آن را از ۶/۵ به ۱۴ درصد افزایش دادند. در ارتباط با کربوهیدرات‌ها نیز نتایجی مشابه با پروتئین به دست آمد ($P< ۰/۰۱$) (جدول ۱). بیشترین میزان تجزیه کربوهیدرات‌ها در محیط کشت دارای کلش گندم و عصاره مخمر و تلقیح شده با استرپتومایسز دیده شد ($P< ۰/۰۵$). همچنان که در مطالعهٔ کراوفورد و همکاران (١٣) استرپتومایسز ویریدوسپوروس بعد از ۸ هفته موجب کاهش ۴۴/۴ درصدی کربو هیدرات لیگنو سلولز ساقه ذرت شد، در پژوهش حاضر نیز میزان کاهش کربوهیدرات توسط استرپتومایسز به طور متوسط (متوسط کاهش کربوهیدرات در محیط دارای عصاره مخمر و بدون آن و هم‌چنین در محیط کشت دارای کلش گندم وخاک اره) ۵۳ درصد بوده است که با پژوهش مذکور هم‌آهنگی دارد (جدول ۲). توان تجزیه کربوهیدراتی به عنوان تابعی از توان ترشح آنزیم‌های اندوگلوکاناز و زایلاناز در نظر گرفته شده که در عین حال با میزان رشد باکتریایی نیز دارای ارتباط بسیار نزدیکی است و در پژوهش حاضر نیز میزان رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج مربوط به کاهش وزن ماده لیگنوسلولزی موجود در محیط کشت نشان می‌دهد که در طی مدت زمان انکوباسیون بخشی از اجزای مواد لیگنوسلولزی به وسیله باکتری‌ها تجزیه و محلول شده که منجر به کاهش وزن شده است. همانند پروتئین و کربو هیدرات، تأثیر باکتری به کاهش کاملاً معنی‌دار وزن منجر شده ($P< ۰/۰۱$)، در صورتی که نوع ماده لیگنوسلولزی و استفاده از عصاره مخمر، اثر کمتری اعمال نموده است ($P< ۰/۱$) (جدول ۱). هم‌چنین در خصوص اثر کاربرد باکتری، بیشترین کاهش وزن به ترتیب در محیط‌های دارای استرپتومایسز و سودوموناس تعیین شد. در پژوهش پستای و همکاران (٢٧) توان تجزیه لیگنو سلولز ساقه ذرت

Archive of SID

www.SID.ir

(بر اساس کاهش وزن) در ۱۱ سویه اکتینو میستی (بعد از ۴ هفته رشد) نشان داد که در ۵ سویه، بیشترین کاهش وزن ۵۰-۴۰ درصد، در سه سویه کاهش وزن متوسط ۴۰-۳۰ درصد و سه سویه کاهش وزن ۳۰-۲۰ درصد بوده، که در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان کاهش وزن، حدود ۵۰ درصد محاسبه شد (محاسبات ارائه نشده است).

APPL یک ترکیب حد واسط محلول در آب حاصل از تجزیه لیگنین می‌باشد. بررسی‌های آماری نشان داد که در ارتباط با این مورد نیز هر سه فاکتور مورد بررسی (باکتری، عصاره مخمر و ماده لیگنوسلولزی) تأثیر بسیار معنی‌داری داشته‌اند (P< ۰/۰۱) (جدول ۱). در مورد برخی از گونه‌های باکتریایی گزارش شده که این باکتری‌ها تا حدود زیادی پلی‌مرهای لیگنین و به خصوص لیگنین گیاهان گرامینه‌ای را به لیگنین پلی مری قابل رسوب در اسید یا محلول در آب تجزیه می‌کند (۲، ۷، ۱۳، ۲۶ و ۳۶). پستای و همکاران (۲۷) اعتقاد دارند که به طور معمول سویه‌های باکتریایی که منجر به کاهش وزن بیشتر لیگنوسلولز می‌شوند، کاهش لیگنین (کلیسون) بیشتر و تولید APPL بیشتری نیز دارند که در پژوهش حاضر این وضعیت در ارتباط با استرپتومایسز مشاهده شد.

بررسی داده‌های مرتبط با لیگنین نشان داد که در ارتباط با کاهش لیگنین نامحلول (لیگنین کلیسون)، در حالی که فاکتورهای ماده لیگنوسلولزی و گونه باکتریایی موجب کاهش لیگنین نامحلول شده (P< ۰/۰۱) (جدول ۱)، استفاده از عصاره مخمر چنین اثری نداشته است. ولی در ارتباط با افزایش لیگنین محلول، هر سه فاکتور مورد بررسی تأثیر بسیار معنی‌داری داشته‌اند (P< ۰/۰۱) (جدول ۱). این مسأله تا حدود زیادی مربوط به روش اندازه‌گیری است. از آنجایی که برای تعیین لیگنین نامحلول از روش کلیسون استفاده شده، افزودن عصاره مخمر به خوبی اثر خود را نشان نداده، حال آن که در روش اندازه‌گیری لیگنین محلول (استفاده از جذب نوری) این اثر به خوبی تعیین و بررسی شده است.

نتایج کلی نشان می‌دهند (جدول ۲) که استرپتومایسز نسبت به سودوموناس توان بالاتری در تجزیه لیگنین دارد که می‌تواند مرتبط به سیستم آنزیمی استرپتومایسزها باشد. هایدر و تروجانوسکی (۱۷) نیز عنوان نموده‌اند که معدنی کردن لیگنین به وسیله اکتینومیست‌ها کارآمدتر از باکتری‌های غیر رشته‌ای است. تجزیه لیگنین در کلش گندم نیز بیشتر از خاک اره بوده است (P< ۰/۰۵). در مطالعه آنتایی و کراوفورد (٦) میزان کاهش لیگنین توسط استرپتومایسز ویریدوسپوروس در چوب نرم‌ها ، چوب سخت‌ها و گراس‌ها به ترتیب ۳۰/۹، ۳۲/۰ و ۴۴/۲ درصد و برای استرپرتومایسز ستونی به ترتیب ۳۴/۱، ۲۹/۵ و ۳۹ درصد بود که نشان دهندهٔ بیشتر بودن میزان تجزیه لیگنین در گراس‌ها نسبت به چوب‌ها است. چندین دلیل برای این مسأله ذکر شده که از آن جمله می‌توان به بیشتر بودن پروتئین در گراس‌ها، بیشتر بودن و پیچیده‌تر بودن لیگنین در چوب‌ها و بیشتر بودن نسبت کربن به ازت در چوب‌ها اشاره نمود. به همین دلیل افزودن عصاره مخمر نیز منجر به افزایش میزان تجزیه لیگنوسلولز شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که استفاده از باکتری‌ها در فراوری مواد خشبی به منظور کاهش یا حذف لیگنین می‌تواند به عنوان یک راه کار، جایگزین روش‌های فیزیکی و شیمیایی در تولید خوراک دام یا صنایع کاغذ سازی، مورد استفاده قرار گیرد. به طور حتم دست‌یابی به نتایج متقن و قابل کاربرد، نیاز به تحقیقات بیشتر، به خصوص با استفاده از روش‌های دقیق‌تر مانند روش‌های رادیورسپیرومتری (Radio-respirometery) (استفاده از سلولز و لیگنین رادیو اکتیو) و آنزیمی خواهد داشت. تولید انواع آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات دیواره سلولی و انواع پروبیوتیک‌ها با استفاده از سویه‌های میکروبی مؤثر، از جمله نتایج بسیار کاربردی مطالعات این چنینی خواهد بود.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدین وسیله از کمک‌های بی دریغ معاونت و مدیریت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، مدیریت پژوهشی و ریاست محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک و مسئولین سازمان مرکزی که در تصویب و تأمین اعتبار این پروژه مساعدت نمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم. از کمک‌های تکنیکی آقای شجاعی سعدی و خانم ربیعی نیز تشکر می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

۱. نیک خواه، ع. و ح. امانلو. ۱۳۷۱. *اصول تغذیه و خوراک دادن دام* (تألیف چرچ. دی. سی.، و دبلیو. جی. پوند). انتشارات جهاد دانشگاهی زنجان، ۵۳۰ صفحه.

2. Adhi, T. P., R. A. Korus and D. L. Crawford. 1989. Production of major extracellular enzymes during lignocelluloses degradation by two Streptomycetes in agitated submerged culture. Appl. Environ. Microbiol. 55:1165-1168.
3. Annon. 1979. Official Methods of Analysis. 12th ed., PP. 927-928, Assoc. Anal. Chem., Washington, DC.
4. Annon. 1985. User's Guide: Statistics (Version 5 ed.). Cary, NC: SAS Institute.
5. Annon. 1994. Total population. Agriculture population, Production. Feed and Agriculture Organization Yearbook. 38: 63-77.
6. Antai, S. P. and D. L. Crawford. 1981. Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 42: 378- 380.
7. Ball, A. S., W. B. Betts and A. J. McCarthy. 1989. Degradation of lignin- related compounds by Actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 55:1642-1644.
8. Bargmeyer, J. R. and D. L. Crawford. 1985. Production and characterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different Streptomyces spp. Appl. Environ. Microbiol. 49: 273-278.
9. Cappuccino, J. G. and N. Sherman. 1999. Microbiology, a Laboratory Manual. 5th ed, Benjamin/ Cuming Sci. Pub., California, USA.
10. Chandler, J. A., W. J. Jewell, J. M. Gossett, P. J. Van Soest and J. B. Robertson. 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. Biotechnol. Bioeng. Symp. 10: 93-107.
11. Chaudhry, A. S. 1998. Chemical and biological procedures to upgrade cereal straws for ruminants. Nutr. Abstr. Rev., (Series B), 68: 319-331.
12. Crawford, D. L. 1978. Lignocelluloses decomposition by selected Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1041-1045.
13. Crawford, D. L., A. L. Pometto and R. L. Crawford. 1983. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermedia. Appl. Environ. Microbiol. 45: 898-904.
14. Fazaeli, H. 2001. Effect of treatment of the nutritive value of wheat straw and its use in the diet of dairy cattle. Ph. D. Thesis, University of Putra, Malaysia.
15. Fritsche, W., M. Hofrichter. 1999. Aerobic degradation by microorganisms. PP. 145-167. *In*: Rehm, H. J., G. Reed, (Eds.), Biotechnology. Vol. 11b, Environmental Processes. Wiley-VCH, Weinheim, New York,.
16. Giroux, H., P. Vidal, J. Bouchard and F. Lamy. 1988. Degradation of Kraft indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 3064- 3070.
17. Haider, K. and J. Trojanowski. 1980. A comparison of the degradation of ^{14}C-labeled DHP and corn stalk lignins by micro- and macro fungi and bacteria. PP. 111-134. *In*: Kirk, T. K., T. Higuchi, H. M. Chang (Eds.), Lignin Biodegradation: Microbiol. Chem. Appl., Vol. I, CRC Press, USA.
18. Iiyama, K. 2000. Structural characteristics of cell walls of forage grasses- their nutritional evaluation for ruminants. Proceeding of the 21 century symposium. Tokyo, May, 2000.
19. Kerr, T. J. and R. D. Kerr. 1987. Microorganism having characteristics of an Arthrobacter capable of degrading peanut hull lignin. United State Patent 4 643 899.
20. Kerr, T. J., R. D. Kerr and R. Benner. 1983. Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1201-1206.
21. Konemann, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger and W. C. Winn. 1992. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed., Philadelphia: J. B. Lippincott.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Lacey, J. 1988. Actinomycetes as biodeteriogens and pollutant of the environment. PP. 359-432. *In*: M. Goodfellow, S. T. Williams, M. Mordarski (Eds.), Actinomycetes in Biotechnology. Academic press, Great Britain.
23. Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. Ann. Agric. Environ. Med. 4: 113-121.
24. Morii, H., K. Nakamiya and S. Kinoshita. 1995. Isolation of a lignin- decolorizing bacterium. J. Ferment Bioengin. 80: 296-299.
25. Odier E., G. Janin and B. Monties. 1981. Poplar lignin decomposition by gram- negative aerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41: 337-341.
26. Pasti, M. B., S. R. Hagen, R. A. Korus and D. L. Crawford. 1991. The effects of various nutrients on extracellular peroxidases and acid- precipitable polymeric lignin production by *Streptomyces chromofuscus* A2 and *Streptomyces Viridosporus* T7A. Appl. Environ. Microbiol. 34 : 661-667.
27. Pasti, M. B., A. L. Pometto, M. P. Nuti and D. L. Crawford. 1990. Lignin- solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2213-18.
28. Perestelo, F., M. A. Falcon, M. L. Perez, E. C. Roig and G. De La Fuente. 1989. Bioalteration of Kraft pine lignin by *Bacillus megaterium* isolated from compost piles. J. Ferment. Bioeng. 68: 151-153.
29. Perestelo, F., M. A. Falcon, A. Carnicero, A. Rodriguez and G. De La Fuente. 1994. Limited degradation of industrial, synthetic and natural lignin by *Serratia marcesens*. Biotechnol. Lett. 10 : 299-302.
30. Perestelo, F., A. Rodriguez, R. Perez, A. Carnieero, G. De La Fuente and M. A. Falcon. 1996. Isolation of a bacterium capable of limited degradation of industrial and labeled , natural and synthetic lignin. World J. Microbiol. 12 : 111-112.
31. Phelan, M. B., D. L. Crawford and A. L. Pometto. 1979. Isolation of lignocellulose- decomposing actinomycetes and degradation of specifically ^{14}C – labeled lignocelluloses by six selected streptomyces strains. Can. J. Microbiol. 25: 1270-1276.
32. Pirouz, T., M. A. Karbasian, M. Goodfellow. 1999. Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan county, south east of Iran. Irn. J. Med. Sci. 24:65-67.
33. Pometto, A. L. and D. L. Crawford. 1986. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. Appl. Environ. Microbiol. 52: 246- 250.
34. Richard, T. 2000. The effects of lignin on biodegradability. Cornell Composting. Sci. Eng. (Available at http://www.cfe.cornell.edu/compost/calc/lignin.html)
35. Shrivastava, S. K., A. K. Shrivastava, J. Neeraj and N. Jain. 1995. Degradation of black liquor, a pulp mill effluent by bacterial strain *Pseudomonas putida*. Indian J. Exp. Biol. 33: 962-966.
36. Spiker, J. K., D. L. Crawford and E. C. Thiel. 1992. Oxidation of phenolic and non-phenolic substrates by the lignin peroxidase of *Streptomyces viridosporus* T7A. Appl. Environ. Microbiol. 37: 518-523.
37. Srinivasan, V. R., J. W. Cary, Y. Chon and K. E. Narva. 1987. Gene for lignin degradation and uses thereof. United State Patent. Patent number 4713336.
38. Templeton, D. and T. Ehrman. 1995. Determination of acid - insoluble lignin in biomass. Chemical Analysis and Testing Task, Laboratory Analytical Procedure- 003, Ethanol Project.
39. Tuncer, M., A. S. Ball, A. Rob and M. T. Wilson. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. Enzyme Microb. Technol. 25:38-47.
40. Yang, V. W., Z. Zhuang, G. Elegir and T. W. Jeffries. 1995. Alkaline- active xylanase produced by an alkalophilic Bacillus sp. isolated from Kraft pulp. J. Ind. Microbiol. 15: 434-441.

Archive of SID

www.SID.ir