



Isolation and Identification of Cellulose-Degrading Bacteria and Fungi (Ferments Cellulose) in Qom province corn silos¹

Kaveh ill saadatmand

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Islamic Azad University, Iran.
ar.rasouli1990@gmail.com

Mohammad Dakhili

Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Qom, Iran
(Corresponding author). dr_dakhili@yahoo.com

Sayed Soheil Aghaei

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
soheilaghaee@yahoo.com

Abstract

Purpose: Lignocellulose is the main constituent of plant biomass in terrestrial and aquatic ecosystems, which makes up about half of the material produced by photosynthesis. It contains three types of polymers, cellulose, hemicellulose, and lignin. A large variety of fungi and bacteria can cleave these macromolecules by hydrolysis or enzymatic oxidation. This research mainly aims to isolate and identify fungal and bacterial agents of fermenting (cellulose decomposer) of corn silage.

Material and methods: Corn silage samples were collected from Qanavat city (Qom province, Iran). The samples were first enriched to isolate microorganisms, bacteria isolated on synthetic solid medium and fungi isolated on PDA-enriched medium. Bacteria and fungi producing cellulase enzyme were cultured by Gram's Iodine method, Congo-Red staining, and on PDA medium containing 5% by volume of carboxymethylcellulose. respectively, Morphological and biochemical identification was performed for the isolates.

Findings: All bacterial isolates producing cellulase belonged to the *Bacillus* genus and the rest of the bacterial isolates did not produce cellulase enzyme. Also, all isolated fungal samples produced cellulase enzyme, the best strain belonging to *Aspergillus fumigatus*. The diversity and production of cellulase enzyme by fungal isolates was more than bacterial isolates. Also, the best fungal isolates showed twice the ability of cellulase enzyme production and consumption of carboxymethylcellulose compound.

Conclusion: It can be concluded that fungi are better decomposers than bacteria for cellulase production and industrial use.

Keywords: Cellulase enzyme, *Aspergillus*, *Bacillus*, Corn silage, Cellulose.



جداسازی و شناسایی عوامل قارچی و باکتریایی

تخمیرکننده (تجزیه کننده سلولز) سیلوهای ذرت در استان قم^۲

کاوه نیل سعادتمند

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ایران. ar.rasouli1990@gmail.com

محمد دخیلی

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ایران (نویسنده مسئول).

dr_dakhili@yahoo.com

سید سهیل آقایی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ایران. soheilaghade@yahoo.com

چکیده

هدف: لیگنوسلولز ترکیب اصلی زیست توده گیاهی در اکوسیستم‌های زمینی و آبی است، که حدود نیمی از ماده تولید شده توسط فتوسنتز را تشکیل می‌دهد و حاوی سه نوع پلیمر، سلولز، همی سلولز و لیگنین است. تنوع بزرگی از قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌توانند با هیدرولیز یا اکسیداز آنزیمی، این ماکرومولکول‌ها را قطعه قطعه کنند. هدف اصلی پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی عوامل قارچی و باکتریایی تجزیه‌کننده سلولز سیلوهای ذرت است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های سیلو ذرت از شهر قنات (استان قم-ایران) جمع آوری شد. نمونه‌ها برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها، ابتدا غنی‌سازی شدند. جداسازی باکتری‌ها روی محیط جامد سنتزی و جداسازی قارچ‌ها روی محیط PDA غنی شده انجام شد. باکتری‌ها و قارچ‌های تولیدکننده آنزیم سلولاز به ترتیب با روش‌های Gram's Iodine، رنگ‌آمیزی کنگورد و روی محیط PDA حاوی ۵ درصد حجمی کربوکسی متیل سلولز کشت شدند. سپس شناسایی مورفولوژی و بیوشیمیایی برای جدایه‌ها انجام شد.

یافته‌ها: همه جدایه‌های باکتریایی تولیدکننده آنزیم سلولاز متعلق به جنس *باسیلوس* بودند. همچنین همه نمونه‌های قارچی جداسازی شده، تولیدکننده آنزیم سلولاز بودند که بهترین سویه متعلق به جنس قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود. تنوع و میزان تولید آنزیم سلولاز توسط جدایه‌های قارچی بیشتر از جدایه‌های باکتریایی بود. همچنین بهترین جدایه قارچی به میزان دو برابر بیشتر از بهترین جدایه باکتریایی توانایی تولید آنزیم سلولاز و مصرف ترکیب کربوکسی متیل سلولز را از خود نشان داد. **نتیجه‌گیری:** قارچ‌ها تجزیه‌کنندگان بهتری نسبت به باکتری‌ها برای تولید آنزیم سلولاز و استفاده صنعتی در سیلوهای ذرت هستند. **کلیدواژه‌ها:** آنزیم سلولاز، *آسپرژیلوس*، *باسیلوس*، سیلو ذرت، سلولز، شهر قنات.



مقدمه

در سال‌های اخیر علاقه پژوهشگران برای استفاده از متابولیت‌های میکروارگانیسم‌ها به علت کاربرد وسیع، تنوع بالا و مزیت دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت استفاده در صنایع بیشتر شده است (۱، ۲). لیگنوسلولز ترکیب اصلی زیست توده گیاهی است، که حدود نیمی از ماده تولید شده توسط فتوسنتز را تشکیل می‌دهد. حاوی سه نوع پلیمر، سلولز^۳، همی سلولز^۴ و لیگنین^۵ است که توسط نیروهای غیرکولانسی و با پیوندهای متقابل کووالانسی به شدت درهم آمیخته و از نظر شیمیایی پیوند خورده‌اند. تنوع بزرگی از قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌توانند با هیدرولیز یا اکسیداز آنزیمی این ماکرومولکول‌ها را قطعه‌قطعه کنند. در سوبستراهای طبیعی، اتصال پلیمرها مانع از تجزیه آن‌ها می‌شود. سیستم‌های ژنتیک مولکولی تجزیه سلولز، همی سلولز و لیگنین در دهه ۱۹۹۰ پیشرفت قابل توجهی کردند. بیشتر آنزیم‌ها در هر میزبان همولگوس^۶ (همگن/همولگ) و هتروگوس^۷ (ناهمگن)، کلون، سکانس و بیان شدند. لیگنوسلولزها در طبیعت از چوب، علف، بقایای کشاورزی، پسماندهای جنگل و پسماندهای جامد شهری ناشی می‌شوند (۳).

چندین روش بیولوژیکی برای بازیافت لیگنوسلولز، براساس آنزیم‌های تخریب‌کننده سلولز، همی سلولز و لیگنین، پیشنهاد شده است. از بین آن‌ها به نظر می‌رسد کمپوست و استفاده از آن‌ها به عنوان ماده اولیه تولید اتانول به عنوان یک ماده قابل اشتعال از نظر اقتصادی عملی‌ترین باشد. علاوه بر این، استفاده عمومی از فناوری‌های سازگار با محیط زیست که آنزیم‌های لیگنوسلولز را در مراحل مختلف تولید خمیر کاغذ و کاغذ به عنوان پیش تصفیه برای خمیر، سفیدسازی یا تصفیه فاضلاب معرفی می‌کند، باعث صرفه‌جویی در مصرف برق و کاهش آلاینده‌ها شده است. در فاضلاب این صنایع، پیش تصفیه پسماندهای کشاورزی با قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز، استفاده از آن‌ها را به عنوان ماده اولیه برای تولید کاغذ امکان‌پذیر می‌کند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا آنزیم‌های آن‌ها برای افزایش جوهرزدایی الیاف بازیافتی و آزادسازی تونرها از ضایعات اداری، زمینه امیدوارکننده دیگری در تحقیقات برای آینده است (۳).

آنزیم‌های سلولزی نقش مهمی در فرآیندهای تجزیه بیولوژیکی طبیعی دارند که در آن مواد لیگنوسلولزی گیاه به طور موثر توسط قارچ‌های سلولیتیک، باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها^۸ و پروتوزوها^۹ تخریب می‌شوند. این آنزیم‌ها کاربردهای جدیدی در تولید قندها و اتانول قابل تخمیر، اسیدهای آلی، مواد شوینده و سایر مواد شیمیایی پیدا کرده‌اند. آنزیم‌های سلولزی فرصتی کلیدی برای دستیابی به مزایای فوق‌العاده استفاده از زیست توده فراهم می‌کنند (۴).

قارچ‌ها به دلیل قدرت نفوذ بالا به درون بافت‌های گیاهی نسبت به سایر ریزجانداران، در تجزیه بیولوژیکی مواد سلولزی نقش اساسی دارند. این توانایی در قارچ‌های ریزوکتونیا سولانی، کیتومیوم، آسپرژیلوس فومیگاتوس، بوتریس سینریا، آسپرژیلوس

³ Cellulose

⁴ Hemicelluloses

⁵ Lignin

⁶ Homologous

⁷ Heterologous

⁸ Actinomycetes

⁹ Protozoa



نیدولانس، تریکودرما ویرید و فوزاریوم بیشتر دیده شده است. در کل، قدرت تولید آنزیم سلولاز در قارچ‌ها ۱۰ برابر باکتری‌ها گزارش شده است (۳).

پژوهش‌ها برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز در حال پیشرفت و ادامه می‌باشد و باکتری‌های زیادی مانند فیبروباکتر، تیلاویا، بیفیدوباکتریوم بریو، باسیلوس، کلستریدیوم، اسیتوباکتر جونی، یوباکتریوم سلولوسولونها و سودوموناس سلولز گزارش شده است. از مهم‌ترین باکتری‌های مزوفیل بی‌هوازی، جنس کلستریدیوم است که به صورت اختصاصی برای تجزیه آنزیم سلولاز شناخته شده است. تجزیه سلولز توسط این جنس از باکتری‌ها بیشتر به دلیل مقاومت در برابر حرارت بسیار مهم است. باکتری‌های سلوویبریو، باسیلوس، سودوموناس از جنس‌های هوازی شناخته شده‌اند. در شرایط تخمیر هوازی، دی اکسید کربن و آب محصول اصلی تجزیه سلولز می‌باشد (۳).

محصولات علوفه‌ای که به عنوان خوراک دام استفاده می‌شوند، از قبیل علوفه غلات، ذرت و یونجه، به طور معمول به صورت علوفه سیلو شده نگهداری می‌شوند (۵). سیلو کردن علوفه سبز یکی از راه‌های تأمین خوراک دام است (۶). با توجه به شرایط آب و هوایی کنونی، علوفه سیلو شده یکی از بهترین روش‌ها برای حفظ علوفه تازه با حداقل تلفات است، ولی کیفیت علوفه سیلو شده و ارزش تغذیه‌ای آن تحت تاثیر شمار زیادی از عوامل بیولوژیکی و تکنولوژیکی می‌باشد (۷).

در این راستا، هدف اصلی پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی عوامل قارچی و باکتریایی تجزیه‌کننده سلولز سیلوهای ذرت با توجه به اهمیت آنها در صنعت برای استفاده بهینه از منابع لیگنوسلولزی و معرفی سویه‌های جدید است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های سیلو ذرت، از محل نگهداری سیلو گاوداری‌های واقع در شهر و منطقه قنوات (استان قم - ایران) و روستاهای توابع آن با استفاده از روش استاندارد جمع‌آوری شدند و در ظرف‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان شروع فرآیند آزمایش در یخچال با شرایط ثابت نگهداری شدند. در مجموع از سیلوهای ۱۰ گاوداری نمونه‌برداری انجام شد. گاوداری‌های منتخب، روزانه ۵۰۰ کیلوگرم سیلو ذرت مصرف می‌کنند و تولید سیلوهای ذرت در این گاوداری‌ها به صورت سنتی انجام می‌شود که البته گاهی ذرت بعد از ریخته شدن در بسته‌های پلاستیکی ۳۰ کیلوگرمی، با دستگاه فشرده‌سازی می‌شود.

آماده‌سازی نمونه‌ها

غنی‌سازی باکتری‌ها

برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز، ابتدا مطابق روش کار استاندارد، اقدام به جداسازی باکتری‌ها شد. برای غنی‌سازی محیط رشد، محیط کشت مخصوص باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز با ترکیبات (گرم در لیتر)، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰.۳ درصد کلرید آهن III، ۰.۰۵ گرم کلرید کلسیم، ۰.۰۱ گرم سولفات منیزیم، ۰.۰۱ گرم کلرید پتاسیم، ۰.۰۱ گرم کلرید کلسیم، ۰.۳ گرم کلرید آمونیوم، ۰.۰۵ گرم عصاره مخمر و ۱ میلی‌لیتر از محلول Nitsch's trace element با ترکیبات (گرم در لیتر): ۲.۲ گرم سولفات منگنز، ۰.۵ گرم سولفات روی، ۰.۵ گرم اسید بوریک، ۰.۰۱۶ گرم سولفات مس، ۰.۰۲۵ گرم مولیدات سدیم و ۰.۰۴۶ گرم کلرید



کبالت ساخته شد (۸). این محیط با حجم ۰.۵ گرم در لیتر میکروکریستالین سلولز به عنوان تنها منبع کربن تکمیل شد، همچنین pH محیط قبل از انجام فرآیند استریل با استفاده از NaOH ۱۰ مولار روی ۷ تنظیم گردید.

۴۰ گرم از هر کدام از نمونه‌ها به ظرف ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سنتزی آماده و استریل تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۱۴ روز کامل در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و از روز هفتم به بعد هر روز از ارلن‌ها در شرایط استریل نمونه‌گیری انجام شد و نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند.

بعد از اتمام زمان گرماگذاری، با تهیه رقت سریالی از نمونه‌های لوله 10^{-3} کشت انجام می‌شود. محتویات لوله در پلیت آگار شامل محیط سنتزی غنی شده جامد حاوی آگار بدون ماده مغذی (۱۵ گرم در لیتر) کشت داده و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس کلنی‌های تک، رشد کرده و به صورت خطی کشت داده شدند، تا خالص‌سازی قارچ‌ها و باکتری‌ها به صورت مجزا کامل شود (۸).

شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز

از محیط کشت زایموگرام با ترکیبات (گرم در لیتر): ۲ گرم سدیم نیتрат، ۱ گرم دی-پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰.۵ گرم سولفات منیزیم، ۰.۵ گرم کلرید پتاسیم، ۲ گرم کربوکسی متیل سلولز^{۱۰}، ۰.۲ گرم پپتون مخصوص میکروبیولوژی و ۱۷ گرم آگار تهیه شد. سویه‌های خالص شده در مرحله قبل به صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها با روش‌های Gram's Iodine و کنگورد رنگ‌آمیزی شدند تا باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز از طریق ایجاد هاله شفاف از دیگر باکتری‌ها شناسایی شوند (۹).

غنی‌سازی و جداسازی قارچ‌ها

جداسازی قارچ‌ها براساس روش استاندارد با تهیه رقت سریالی و کشت روی محیط مایع پوتیتو دکستروز، سپس روی محیط جامد پوتیتو دکستروز^{۱۱} انجام شد. ابتدا به ظرف ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری با ترکیبات (گرم در لیتر): ۴۵ میلی‌لیتر محلول پیتون ۰.۱ درصد حاوی ۰.۱ درصد توئن^{۱۲}، ۵ گرم از نمونه سیلو ذرت اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکرانکوباتور قرار داده شدند. سپس با تهیه رقت سریالی، از نمونه‌های لوله 10^{-3} روی محیط PDA کشت جامد انجام شد (۱۰، ۱۱). نمونه محیط‌های حاوی کلنی‌های رشد یافته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز

قارچ‌های جداسازی شده، در محیط PDA به همراه ۵ درصد حجمی کربوکسی متیل سلولز کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز یک ناحیه شفاف دور کلنی ایجاد کردند (۱۲). بهترین سویه قارچی و باکتریایی تجزیه‌کننده سلولز براساس اندازه‌گیری قطر هاله اطراف کلنی انتخاب شدند.

¹⁰ Carboxymethyl Cellulose (CMC)

¹¹ PDA

¹² Tween



بررسی مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها

ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی همه جدایه‌های باکتریایی و قارچی، شامل شکل میکروسکوپی، شکل کلنی، رنگ کلنی، رشد در محیط هوازی یا بی‌هوازی بررسی شد.

بررسی مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی

مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده سلولز، شامل نوع گرم، تجزیه قندها (گلولز، مانیتول، گزیلوز) سیترات، ایندول، حرکت، اوره، pH براساس روش استاندارد کتاب راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برجی^{۱۳} بررسی و تعیین شد (۱۳). جدایه‌های بدست آمده برای استفاده در پژوهش‌های آینده در فریز -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

یافته‌ها

بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت در محیط مخصوص سنتزی، تعداد ۸ باکتری جداسازی شد که مشخصات مورفولوژی میکروسکوپی، ماکروسکوپی و توانایی تجزیه سلولز آن‌ها در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱ - مشخصات مورفولوژی باکتری‌های جداسازی شده با توانایی تجزیه سلولز

نام	شکل میکروسکوپی	رنگ کلنی	نوع کلنی	نوع رشد	تجزیه سلولز
A1	باسیل - رشته‌ای	صورتی مایل به قرمز	ساده	هوازی	+
A2	باسیل - کوتاه (کوکوباسیل)	صورتی مایل به قرمز	ساده	هوازی	+
A3	باسیل - بلند	سفید و کرمی	پودری	هوازی	-
B1	باسیل - باریک (مارپیچی)	سفید ساده	پودری	هوازی	-
B2	کوکوباسیل	قهوه‌ای کمرنگ	معمولی	هوازی	-
B3	باسیل - کوتاه - چندتایی	سفید	معمولی	هوازی	+
B4	باسیل - کوتاه - تک	سفید	معمولی	بی‌هوازی	+
B5	باسیل - کوتاه	سفید	معمولی	بی‌هوازی	+

مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های تجزیه‌کننده سلولز

بعد از جداسازی و تعیین مشخصات مورفولوژی و توانایی تجزیه سلولز، سویه منتخب تجزیه‌کننده سلولز توسط آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند، که نتایج آن در جدول (۲) آمده است.

جدول ۲ - مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب باکتریایی

نام	نوع گرم	گلوکز	مانیتول	گزیلوز	سیترات	ایندول	حرکت	اوره	pH
A1	+	-	+	+	-	-	-	-	۳.۵-۱۰

¹³ Bergey's Manual Systematic Bacteriology



۳.۵-۱۰	-	-	-	-	-	+	-	+	A2
۳.۵-۱۰	-	-	-	-	-	+	-	-	B3
۳.۵-۱۰	-	+	-	-	-	+	-	-	B4
۳.۵-۱۰	-	+	-	-	+	-	-	-	B5

جداسازی قارچ‌ها

بعد از جمع‌آوری و غنی‌سازی نمونه‌ها، کشت روی محیط مخصوص رشد قارچ PDA انجام شد و نتایج بررسی مورفولوژی در جدول (۳) آمده است.

جدول ۳- مشخصات مورفولوژی جدایه‌های قارچی

نام	نوع قارچ	رنگ کلنی	شکل کلنی	نوع کونیدی	توضیحات	تجزیه سلولز
F1	آسپرژیلوس	سفید مایل به شیری و شکلاتی	ساده	-	تولید سم آفلاتوکسین	+
F2	آسپرژیلوس فومیگاتوس	سبز لجنی	پرزی-پشمی	کونیدی فور کوتاه	-	+
F3	آسپرژیلوس فلاوس	سبز زیتونی	پرزی-پشمی	کونیدی فور بلند	وزیکول بزرگ، دو ردیف استریگما	+
F4	پنی سیلیوم	سبز لجنی مایل به خاکی	پرزی	کونیدی فور کوتاه	-	+
F5	آسپرژیلوس نایجر	قهوه‌ای مایل به سفید	پرزی پشمی	کونیدی بلند	وزیکول بسیار بزرگ، دو ردیف استریگما	+
F6	مخمر ساکارومایسس	قهوه‌ای	موکونیدی	-	-	+
F7	مخمر ساکارومایسس جوانه زده	کرمی	موکونیدی	-	-	+

انتخاب بهترین جدایه‌های تجزیه‌کننده

بهترین جدایه‌های قارچی و باکتریایی براساس اندازه‌گیری قطر هاله به عنوان جدایه مناسب جهت ادامه تحقیقات انتخاب شدند. اندازه هاله ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتریایی و قارچی به ترتیب در جدول (۵ و ۶) آمده است.

جدول ۵- اندازه قطر هاله جدایه‌های باکتریایی به میلی متر

نام	اندازه قطر هاله	نام	اندازه قطر هاله
A1	۳	B4	۱.۵
A2	۲.۵	B5	۵

	۴	B3
--	---	----

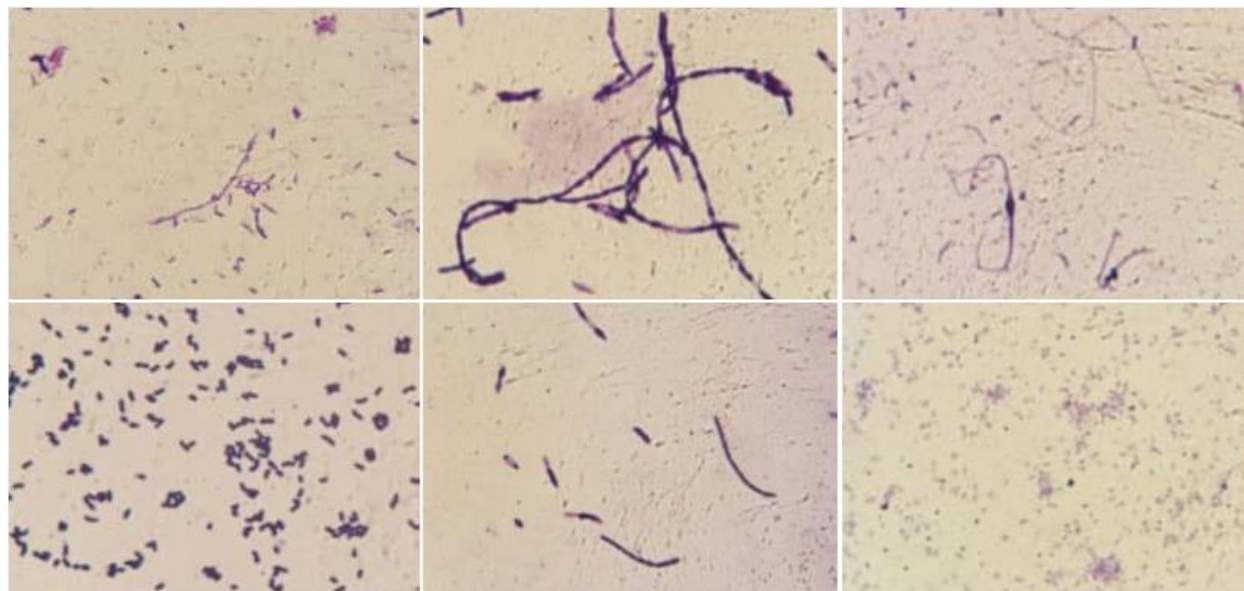
جدول ۶- اندازه قطر هاله جدایه‌های قارچی به میلی متر

نام	اندازه قطر هاله	نام	اندازه قطر هاله
F1	۴	F5	۵.۵
F2	۱۰	F6	۵
F3	۴	F7	۳.۵
F4	۶		

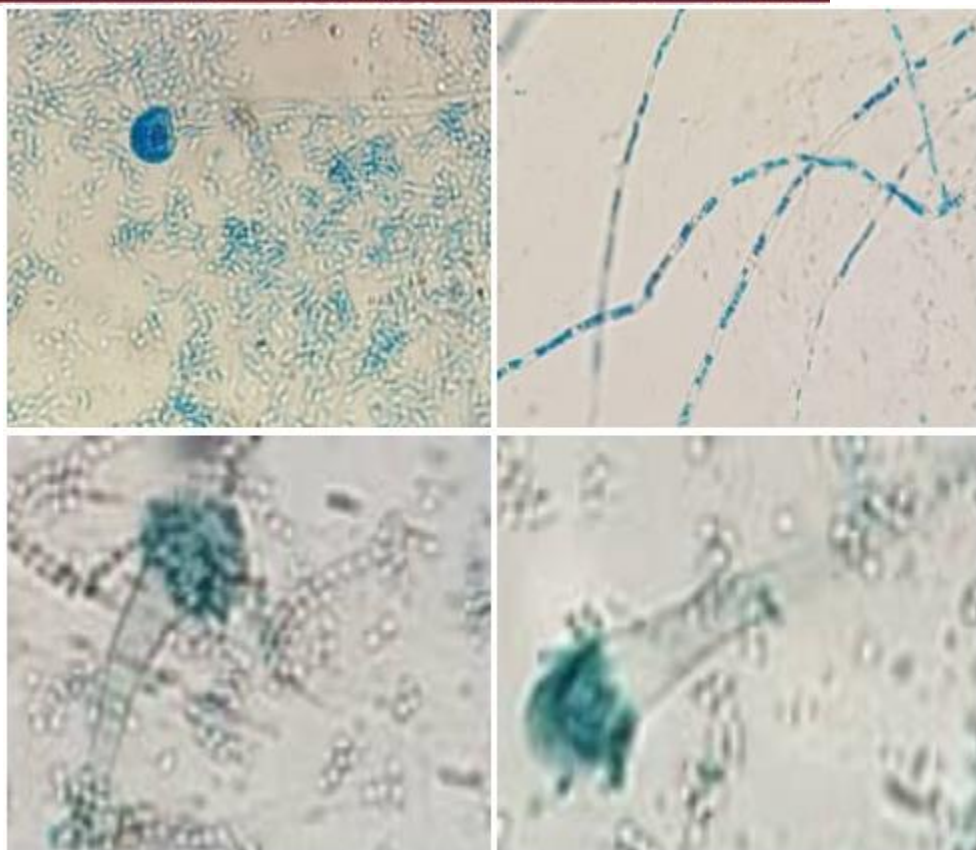
براساس بررسی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی، همه جدایه‌های باکتریایی بدست آمده، از جنس باسیلوس بوده و اکثر جدایه‌های قارچی از نوع آسپرژیلوس می‌باشند.

در مورد قارچ‌ها تنوع جنس بیشتری دیده می‌شود و می‌توان نتیجه گرفت با توجه به قطر هاله ایجاد شده و تنوع در جنس جدایه‌ها، قارچ‌ها تاثیر بیشتری روی تجزیه ذرت و تولید سیلو ذرت دارند. همچنین میانگین قطر هاله تولیدشده بر اثر تجزیه سلولز در قارچ‌ها بسیار بیشتر از باکتری‌ها در این پژوهش می‌باشد، که نشان دهنده توانایی آنزیمی بالای قارچ‌ها در فرآیند تجزیه سلولز است.

جدایه باکتریایی B5 و قارچی F2 به عنوان سویه‌های منتخب و بهترین تولیدکنندگان آنزیم سلولاز براساس اندازه قطر هاله تولید شده انتخاب شدند. جدایه‌های فوق به ترتیب ۵ و ۱۰ میلی متر قطر هاله روی بستر کشت جامد ایجاد کردند. تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های باکتریایی و تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های قارچی به ترتیب در شکل (۱ و ۲) آمده است.



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های باکتریایی



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های قارچی

نتیجه‌گیری

لیگنوسلولز ترکیب اصلی زیست توده گیاهی در اکوسیستم‌های زمینی و آبی است، که حدود نیمی از ماده تولید شده توسط فتوسنتز را تشکیل می‌دهد. سلولز بزرگ‌ترین و محکم‌ترین بخش ساختار لیگنوسلولز را تشکیل می‌دهد و به همین علت تجزیه آن برای انجام فرآوری یا کاربردهای مشابه در صنایع مختلف، بسیار مهم است، تجزیه سلولز با روش‌های شیمیایی، فیزیکی، و مکانیکی مختلفی انجام می‌شود که هر کدام با توجه به نوع مصرف ماده فرآوری شده، بعد از انجام فرآیند دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشد. امروزه استفاده از آنزیم‌های طبیعی که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود، به روشی جذاب و امیدوارکننده برای پژوهشگران و علاقمندان به استفاده از مزیت‌های لیگنوسلولز تبدیل شده است.

هدف اصلی پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی عوامل قارچی و باکتریایی تخمیرکننده (تجزیه‌کننده سلولز) سیلوهای ذرت بود که با جداسازی سویه‌های قارچی و باکتریایی مختلف با توانایی تولید آنزیم سلولاز و تجزیه سلولز، به صورت کامل انجام شد. برای انجام این پژوهش و جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم سلولاز، ابتدا شناسایی سیلوهای ذرت در شهر و منطقه قنوات (استان قم-ایران) انجام شد و سپس جمع‌آوری نمونه‌ها و انتقال آن به آزمایشگاه تحقیقاتی انجام گرفت. جمع‌آوری و



کشت نمونه‌ها به روش استاندارد با چندین بار تکرار انجام شد، که بعد از جداسازی میکروارگانیسم‌ها، شناسایی مورفولوژیکی برای همه جدایه‌ها انجام شد. در مرحله بعد تولید آنزیم سلولاز توسط آن‌ها بررسی شده و در نهایت اقدام به شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی گردید. در پایان فرآیند پژوهش ۷ جدایه قارچی و ۵ جدایه باکتریایی با توانایی تجزیه سلولز بدست آمد که بهترین جدایه قارچی و باکتریایی به ترتیب در آزمایش تولید آنزیم و ایجاد قطر هاله ۱۰ و ۵ میلی‌متر هاله شفاف در محیط کشت جامد حاوی کربوکسیل-متیل سلولز اطراف کلنی تشکیل دادند که به عنوان جدایه‌های منتخب برای انجام تحقیقات بعدی برگزیده شدند.

خوخار و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی اقدام به جداسازی و شناسایی قارچ‌های رشته‌ای بسیار سلولیتیک کردند. تعداد ۷۰ قارچ تجزیه‌کننده سلولز از نمونه‌های مختلف شامل خاک، پساب صنعتی، دانه میوه، سبزیجات، نان و چوب در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۰ جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *تریکودرما*، *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* بودند و توانایی تجزیه سلولز آن‌ها بررسی و مقایسه شد (۱۴). داماسو و همکاران (۲۰۱۲) نیز در پژوهشی اقدام به جداسازی قارچ‌های سلولوتیک از سوبسترهای مختلف کردند. ۲۱۵ سویه قارچی جداسازی شد، که از مجموع آن‌ها ۷ جدایه از خاک، ۶ جدایه از درختان و یک جدایه از باگاس نیشکر، جداسازی و شناسایی شدند که متعلق به جنس‌های *تریکودرما*، *پنی سیلیوم* و *آسپرژیلوس* بودند (۱۵).

رددی و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی اقدام به غربالگری و شناسایی سویه‌های قارچی از خاک‌های چیتور دیستریک هند کردند. تمرکز این پژوهش روی ارزیابی جدایه‌های سلولوتیک قارچی از نمونه خاک‌های مختلف بود و ۲۳ جدایه بدست آمد، که ۹ عدد دارای فعالیت سلولزی بودند. همه سویه‌ها از نظر مشخصات مورفولوژیکی و میکروسکوپی شناسایی شدند. جدایه‌ها از نظر تولید آنزیم بررسی شدند و *آسپرژیلوس* بیشترین و *تریکودرما* کمترین میزان تولید را از خود نشان دادند (۱۶).

شریف و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهشی اقدام به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده سلولز کردند. در این پژوهش باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز از خاک و قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز از خاک و چوب‌های در حال پوسیدگی جداسازی شدند. بهترین تجزیه‌کننده‌های سلولز شناسایی مولکولی شدند که بهترین باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و در قارچ‌ها *آسپرژیلوس نایجر* و *تریکودرما ویرید* بودند (۱۷).

سی‌پوئک و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی اقدام به جداسازی و غربالگری قارچ‌های سلولوتیک از بستر مصرف شده قارچ خوارکی کردند. بیشترین تعداد جدایه‌ها مربوط به جنس‌های *تریکودرما*، *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* بودند. سویه‌ها از نظر میزان فعالیت آنزیمی بررسی شدند که *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اگزالیکوم* قوی‌ترین فعالیت سلولوتیک را روی پلیت داشت (۱۸).

راووی و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی اقدام به جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده از منابع مختلف استان اسیوت (شمال مصر) کردند، نمونه‌ها از ۵ منبع مختلف شامل خاک باغ، خاک زمین کشاورزی، روده نوشخوارکنندگان، لجن رودخانه نیل و کمپوست جمع‌آوری شدند و در محیط‌های انتخابی سلولز آگار و کربوکسیل متیل سلولز آگار کشت شدند. سپس بهترین جدایه‌ها شناسایی مولکولی شدند که شامل باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس تورنجینسیس*، *بروی باسیلوسبرویس*، *بروی باسیلوس پارانبرویس* و *باسیلوس پومیلوس* بودند (۱۹).



ام-بارک و همکاران (۲۰۱۹) نیز در پژوهشی اقدام به جداسازی، غربالگری و شناسایی قارچ‌های لیگنوسلولوتیک از شمال مراکش مرکزی کردند. نمونه‌ها از غلات، چوب در حال پوسیدگی، تفاله زیتون، تفاله و کمپوست آن‌ها جمع آوری شد. ۱۲۷ قارچ خالص در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت انتخابی حاوی سلولز و لیگنین به عنوان تنها منبع کشت، جداسازی و غربالگری شدند، بهترین جدایه‌های تولیدکننده آنزیم با روش مولکولی شناسایی شدند که متعلق به جنس‌های موکور، پنی سیلیوم، پی سیلومایسس، فوزاریوم، اسپریلیوس، کرولاریا، هومیکولا، تریکودرما و کاسموسیپورا بودند (۲۰).

در همه پژوهش‌های ذکر شده جنس قارچی *آسپریلیوس* و جنس باکتریایی *باسیلیوس* به عنوان تجزیه‌کننده سلولز و تولیدکننده آنزیم سلولاز شناسایی و جداسازی شده که نشان‌دهنده و اثبات‌کننده توانایی سویه‌های این دو جنس در تجزیه سلولز است که مشابه یافته‌های پژوهش حاضر و اثبات‌کننده صحت نتایج آن است. این دو سویه توانایی بالایی در تولید آنزیم سلولاز دارد و گزینه‌های بسیار مناسبی برای پژوهش‌های آینده و کاربردهای زیستی هستند.

براساس نتایج بدست آمده تنوع و میزان تولید آنزیم سلولاز توسط جدایه‌های قارچی بیشتر از جدایه‌های باکتریایی در پژوهش حاضر بوده است و همه جدایه‌های قارچی توانایی تولید آنزیم سلولاز دارند؛ در حالی که بخشی از جدایه‌های باکتریایی توانایی تولید آنزیم فوق را دارند، همچنین بهترین جدایه قارچی به میزان دو برابر بیشتر از بهترین جدایه باکتریایی توانایی تولید آنزیم سلولاز و مصرف ترکیب کربوکسیل متیل سلولز را از خود نشان داد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که قارچ‌های تولیدکننده آنزیم سلولاز با هزینه و زمان کمتری قابلیت جداسازی و شناسایی به نسبت جدایه‌های باکتریایی دارند و با توجه به شواهد بدست آمده و مزایای مشخص شده در نمونه‌های سیلو ذرت، در نهایت با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت قارچ‌ها تجزیه‌کنندگان بهتری نسبت به باکتری‌ها برای تولید آنزیم سلولاز و استفاده صنعتی هستند.

References

1. Rasouli A, Aghaei SS & Zargar M. Bio-production of Single-cell Oil by *Rhodococcus Erythropolis* PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources. *Journal of Microbial Biology*. 2020; 9(35): 71-85.
2. Rasouli A, Aghaei SS & Zargar M. Single-cell oil production using low-cost carbon sources by newly isolated *Kocuria* Y205. *Archives of Hygiene Sciences*. 2021;10(2):143-54.
3. Pérez J, Muñoz-Dorado J, De la Rubia T & Martinez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*. 2002; 5: 53-63.
4. Abedin JI. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from soil sample: BRAC University; 2015.
5. Driehuis F, Elferink SO & Spoelstra S. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of applied Microbiology*. 1999; 87(4): 583-94.



6. McDonald P, Henderson A & Heron S. *The biochemistry of silage*. Chalcombe Publications. Marlow Bucks, UK. 1991; 340.
7. Gebrehanna M, Gordon R, Madani A, VanderZaag A & Wood J. Silage effluent management: A review. *Journal of Environmental Management*. 2014;143:113-22.
8. Rastogi G, Muppidi GL, Gurram RN, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR & et al. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2009; 36(4): 585.
9. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S & Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*. 2008; 57: 503-7.
10. Gomes N, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonca-Hagler L & Smalla K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and soil*. 2001; 232:167-80.
11. Markovina A-L, Pitt JI, Hocking AD, Carter DA & McGee PA. Diversity of the *Trichocomaceae* in the Katandra nature reserve, central coast, NSW, Australia. *Mycological research*. 2005; 109(9): 964-73.
12. Limtong P, Vangnai S, Sunanthapongsuk V & Piriyaipin S. Isolation and selection of thermophilic cellulolytic microorganisms for compost production in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*. 1990; 24(1):108-15.
13. Brenner DJ, Boone DR, Garrity GM, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA & et al. The Proteobacteria: Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria: Bergey's Manual Trust Athens, GA, USA; 2005.
14. Khokhar I, Haider MS, Mushtaq S & Mukhtar I. Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. *Journal of applied sciences and environmental management*. 2012;16(3).
15. Damaso MCT, Terzi SdC, Farias AX, Oliveira ACPd, Fraga ME & Couri S. Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012; 55: 513-20.
16. Reddy PLN, Babu BS, Radhaiah A & Sreeramulu A. Screening, identification and isolation of cellulolytic fungi from soils of Chittoor district, India. 2014.
17. Shareef I, Gopinath S, Satheesh M & Christopher SX. Isolation and identification of cellulose degrading microbes. 2015.



18. Seephueak P, Preecha C & Seephueak W. Isolation and screening of cellulolytic fungi from spent mushroom substrates. *Int J Agric Technol*. 2017;13(5):729-39.
19. Rawway M, Ali SG & Badawy AS. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from different sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*. 2018; 6(1):15-24.
20. M'barek HN, Taidi B, Smaoui T, Aziz MB, Mansouri A & Hajjaj H. Isolation, screening and identification of ligno-cellulolytic fungi from northern central Morocco. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2019; 23(4): 207-17.