ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۹۸- ۹۱

شناسایی و بررسی خصوصیات آنزیمی برخی قارچ های بومی جداسازی شده از فرآیند تولید کمپوست

Identification and characterization of enzymatic activities of some native fungi isolated from composting process

هلن پورمظاهری[۱]، زهرا رسولی[۲]، ابراهیم کریمی[۳]، غلامرضا صالحی جوزانی[*۴]، میثم طباطبایی[۵]، رضا معالی امیری[۶]، مریم موسیوند[۷]

۱و۶- کارشناس ارشد و دانشیار پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه شاهد

۳،۴،۵و۷- استادیاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

Pourmazaheri H[1], Rasouli Z[2], Karimi E[3], Salehi Jouzani G*[4], Tabatabaei M[5], Maali-Amiri R[6], Mousivand M[7]

1,6. MSc Student and Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
2. MSc Student, College of Agriculture, Shahed University
3,4,5,7. Assistant Professors, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:gsalehi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

یکی از مهمترین عوامل مؤثر در فرآیند تولید کمپوست از پسماندهای کشاورزی و شهری، ریزسازواره‌های موجود در پسماند و فرایند کمپوست می باشند. لذا شناسایی این ریزسازواره‌های مفید می‌تواند نقش قابل توجهی در بهبود و غنی‌سازی کمپوست حاصل ایفا نماید که در این بین، قارچ‌ها اثر مؤثرتری در تجزیه مواد آلی بستر دارا هستند. لذا در تحقیق حاضر به منظور جداسازی و شناسایی سویه های مهم قارچی تجزیه کننده ترکیبات آلی، از فرایند تولید کمپوست در کارخانه کمپوست اصفهان نمونه برداری صورت گرفته و عوامل قارچی به_صورت تک اسپور و به روش سری رقت جداسازی و خالص سازی شدند. جدایه های بدست آمده از نظر فعالیت آنزیمی سلولاز، زایلاناز، لیپاز، آمیلاز و پروتناز به روش های کیفی و کمی بررسی شدند. جدایه های بدست آمده از نظر فعالیت آنزیمی بسیار متنوع بودند. علاوه بر این، در بخش مطالعات مولکولی و جهت شناسایی جدایه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر M13F و M13R جهت تکثیر قطعه ۱۱۰۰bp ژن 18SrDNA و در نهایت توالی یابی آنها انجام شد. نتایج توالی و بلاست براساس ژن 18SrDNA و مطالعات فیلوژنیک نشان داد که سه سویه بدست آمده متعلق به جنس و گونه *Aspergillus fumigatus* می‌باشند که بطور معمول در فرایند کمپوست وجود دارند. با توجه به اینکه ضایعات جامد شهری کشور بطور معمول غنی از ترکیبات سلولزی، لیگنوسلولزی، چربی، نشاسته ای و پروتئینی هستند و این سه سویه دارای توانایی بالای تولید آنزیم های تجزیه کننده مواد مذکور هستند، امکان تولید و استفاده از این سویه ها به عنوان عامل تسریع کننده فرایند تولید کمپوست (بوستر میکروبی) وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

شناسایی مولکولی،
فعالیت آنزیمی،
قارچ،
کارایی کمپوست

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

مقدمه

رشد بی‌رویه جمعیت به ویژه در مناطق شهری و پیدایش کلان شهرها، تمرکز جمعیتی وموج مصرف گرایی همگام با پیشرفت تکنولوژی موجب تولید طیف وسیعی از ضایعات جامد شهری[1] متنوع شده است به طوری که آهنگ رشد آن در همه کشورها از جمله کشور ایران به طور چشمگیری در حال افزایش است. بطور مسلم این روند، نتیجه غیر قابل اجتناب توسعه بوده و موجب مصرف بی رویه منابع طبیعی و خروج میلیون‌ها تن مواد از چرخه مصرف خواهد شد. بنابراین امروزه در مدیریت ضایعات جامد شهری همگام با رخدادهای بزرگ فرایند های علمی صنعتی، تحولات چشمگیری ایجاد شده است. یکی از روش‌های مؤثر در مدیریت و خنثی کردن آثار نامطلوب ضایعات جامد کشاورزی و شهری، تبدیل آنها به کمپوست[2] است (Wolkowski 2003). این پدیده به عنوان یکی از مهمترین فرآیندهای تبدیل مواد زائد به محصول آلی و ثابت محسوب شده که به طور مستقیم مورد استفاده گیاه بوده و می‌توانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک را نیز بهبود بخشند (Adams and Frostick 2008) ومزیت هایی چون کاهش حجم و افزایش محتوای مواد آلی را داراست (Soumare et al. 2003). فرایند تولید کمپوست فرآیند زیستی است که در آن ریزسازواره‌ها مخصوصا قارچ‌ها، کلیدی‌ترین نقش را در پیشبرد و سرعت بخشیدن به آن بر عهده دارند. هرچه قارچ‌ها و باکتری‌های موجود از قدرت تجزیه کنندگی[3] قوی تری برخوردار باشند، مدت زمان فرآیند کوتاه‌تر شده که از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت است (Ryckeboer et al. 2003). کمپوست تهیه شده از ضایعات جامد شهری با استفاده از روش‌های معمول، به دلیل دارا بودن کیفیت پایین، وجود فلزات سنگین و عوامل بیماریزای انسانی و گیاهی، ایجاد اثرات سوء زیست محیطی، پرهزینه بودن سیستم آن، سختی و زمان‌بر بودن آن همواره مورد بحث و تردید بوده به طوری که در کشورهایی نظیر آلمان، هلند ، اتریش، سوئیس و فرانسه به‌عنوان پیشگامان صنعت کمپوست سازی، بررسی راهکارهای جدید و افزایش کیفیت کمپوست تولیدی مدنظر قرار گرفته است (Hogg et al. 2002; Hargreaves et al. 2008). لذا تلاش در جهت بهبود کیفیت و غنی‌سازی کمپوست تولیدی از ضایعات شهری و همچنین تعیین کارایی آن می تواند نقشی اساسی در گسترش تولید این محصول باارزش و در نتیجه کاهش میزان خسارات زیست محیطی داشته باشد.

از سال‌ها پیش تحقیقات گسترده‌ای در جهان در جهت جداسازی و شناسایی ریزسازواره ها انجام شده و بدین منظور از روش های مختلفی استفاده شده است. از آن جمله می‌توان به استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی[4] و انتخابگر[5]، خصوصیات بیوشیمایی و مورفولوژیک مثل قدرت تجزیه فسفولیپید اسیدهای چرب و یا تجزیه ترکیبات سلولزی و ... اشاره نمود (Forsyth et al. 1948). بررسی‌ها نشان داده که در روش کشت میکروبی تنها بخشی از تنوع میکروبی در تجزیه ها وارد شده و بخش اعظمی از جامعه میکروبی از دست می‌رود و به تبع آن نیز نتایج حاصله نمی‌تواند تصویر جامعی از آنچه در محیط مورد بررسی رخ می‌دهد، به حساب آید (Rappe et al. 2003). از دهه ۹۰ به بعد با گسترش روش‌های مولکولی بر پایه توالی‌های DNA، راهکارهای جدیدی در شناسایی عوامل میکروبی موثر در فرآیند تولید کمپوست به وجود آمد که از آنها می‌توان به نشانگرهای مولکولی مختلف مثل RAPD[6]، ARDRA[7] (Singh et al. 2011 b)، SSCP (Loisel et al. 2006)[8]، T-RFLP[9] (Tiquia et al. 2004)، ITS (Caroline et al. 2009)[10]، 18SrDNA[11] و 16SrDNA[12] (Fredricks et al. 2005) اشاره نمود. نمود که در قارچ‌ها ژن 18SrDNA بیشترین فراوانی را جهت شناسایی مولکولی به خود اختصاص داده است. بهینه سازی عوامل دخیل در فرآیند تولید کمپوست در افزایش کیفیت و کارایی آن نقش اساسی دارند، بطوریکه نوع مواد زاید مورد استفاده، هوادهی و مدت زمان به طول کشیدن بلوغ و رسیدن کمپوست از عواملی هستند که در تحقیقات محققین در

[1] Municipal solid waste
[2] Compost
[3] Degradation ability
[4] Culture
[5] Selective Culture
[6] Random Amplified Polymorphic DNA
[7] Amplified rDNA Restriction Analysis
[8] Single Strand Conformation Polymorphism
[9] Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
[10] Internal Transcribed Space
[11] 18S ribosome DNA
[12] 16S ribosome DNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

سطح بین المللی بسیار مورد توجه بوده است (Hargreaves et al. 2008). با توجه به مشکلات موجود در تولید کمپوست در کشور از قبیل طولانی بودن زمان فرآیند تولید کمپوست و در نتیجه اقتصادی نبودن آن، هدف اصلی تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی عوامل قارچی سازگار و دارای توانایی بالا در تولید آنزیم های موثر سلولاز، زایلاناز، پروتئاز و آمیلاز در تجزیه ترکیبات آلی موجود در کمپوست، به‌منظور استفاده‌های آتی از آنها در تسریع فرآیند تولید کمپوست بوده است.

مواد و روش‌ها

جدا سازی و خالص سازی سویه های قارچی

جهت جداسازی سویه های قارچی تجزیه کننده مواد آلی کمپوست، نمونه برداری از فرآیند تولید کمپوست در کارخانه تولید کمپوست اصفهان صورت پذیرفت و جدا سازی به روش تهیه سری رقت طبق مراحل زیر استفاده شد (Rastogie et al. 2010). در استخراج عوامل قارچی از ذرات کمپوست ابتدا نمونه های مختلف کمپوست الک شده تا فاقد هرگونه سنگ، چوب و ... شود. سپس ۱۰۰ گرم از مخلوط کمپوستی را به ۵۰۰ میلی لیتر محلول سالین[1] افزوده و به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر مخلوط شد. پس از نشست فاز جامد، از فاز مایع رویی، در تلقیح محیط های کشت استفاده شد (Rastogie et al. 2010). سپس به منظور غنی سازی ریزسازواره های تجزیه کننده، مقدار ۱۰ میلی لیتر از عصاره فوق به ۱۰۰ میلی لیتر محیط های کشت مختلف (پایه سلولز، زایلن، نشاسته، پروتئین و چربی) اضافه شد. محیط های فوق را به مدت یک هفته درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه و محدوده دمایی ۴۲ درجه سانتی گراد (به منظور جداسازی قارچ های مزوفیل[2] تجزیه کننده) تیمار کرده، پس از آن آن پنج میلی لیتر از هر کدام از محیط ها به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت جدید همان ماده اضافه شد و مجددا تحت شرایط قبلی و پس از یک هفته گرمخانه گذاری[3] ، یک میلی لیتر آن به محیط جدید منتقل شد. این کار، چندین بار تکرار شده تا حالت کدر بودن[4] ایجاد شده توسط اضافه کردن محیط قبلی به محیط جدید که ناشی از ذرات خاک بوده از بین رفته و محیط جدید در اثر رشد ریزسازواره ها کدر شود (Rastogie et al. 2010). از آخرین محیط کشت فرآیند غنی سازی، رقت‌های مختلف تهیه کرده و رقت مناسبی از هریک از این محیط ها به صورت خالص روی محیط کشت جامد (آگار دار) همان ماده کشت داده شد. جدایه-های مختلف تجزیه کننده هر یک از مواد را بر اساس اختلاف در نرخ رشد و اندازه کلنی، قارچ‌ها را جداسازی کرده و کلنی های منحصر ایجاد شده بر محیط‌های کامل آگار غذایی[5] خالص سازی سازی شد. در نهایت با کشت مجدد هر یک از سویه های خالص شده در محیط پایه مایع، هر یک از مواد توانایی رشد هر یک از این قارچ ها ثابت شد. این جدایه‌ها در بانک ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران جهت نگهداری طولانی مدت و ادامه مطالعات ذخیره شدند.

اندازه گیری و مقایسه توانایی تجزیه کنندگی قارچ های مربوط به هر یک از پلیمرها پس از جداسازی قارچ ها، توانایی تجزیه کنندگی و فعالیت آنزیمی آنها مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور مقایسه سویه ها شامل مقایسه نسبی سویه ها از نظر تولید آنزیم بر روی محیط های کشت جامد ویژه انجام شد (Castaldi et al.2008).

آزمون تولید پروتئاز

برای بررسی این آنزیم ابتدا محیط کشت SMA[6] شامل ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۷/۵ گرم آگار تهیه گردید و تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پتری دیش‌های حاوی محیط کشت SMA توسط سویه‌های قارچی تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه برای مزوفیل ها نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی در طول این مدت نشانه فعالیت پروتئازی نژادها است (Maurhofer et al. 1995). همچنین سویه ها با استفاده از کیت EnzChek Ultra (Invitrogen Corporation,USA)

[1] Salin solution
[2] Mesophile
[3] Ancubate
[4] Turbidity
[5] Nutrient agar
[6] Skim milk agar

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

Protease Assay Kit طبق دستورالعمل مربوطه، مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند.

آزمون تولید سلولاز

در بررسی فعالیت این آنزیم ابتدا محیط کشت شامل ۲/۵ گرم کربوکسی متیل سلولز[1](CMC)، ۰/۴ گرم کربنات پتاسیم، ۰/۰۲ گرم کلرید کلسیم، ۰/۰۲ گرم سولفات آهن، ۰/۰۲ گرم کلرید سدیم و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب دیونیزه تهیه و تحت شرایط فوق الذکر اتوکلاو شد. پتری دیش‌های حاوی این محیط کشت توسط نژادهای قارچی تلقیح و به مدت یک هفته در دمای ۴۲ درجه برای مزوفیل ها نگهداری شدند. پس از این مدت، پتری دیش‌ها با استفاده از معرف کنگو قرمز[2] (۰/۰۱ گرم در ۱۰۰ میلی-لیتر آب دیونیزه) آغشته شده و به مدت ۲۰ دقیقه رها شدند و سپس با کلرید سدیم یک نرمال، کنگو قرمز را شسته و تولید هاله روشن بررسی شد. تشکیل هالهٔ بی‌رنگ در اطراف کلنی در طول این مدت نشانه تولید سلولاز توسط نژادهای قارچی است (Majidi et al. 2011). همچنین سویه ها با استفاده از کیت EnzChek Ultra Cellulase (Invitrogen Corporation,USA) Assay Kit طبق دستورالعمل مربوطه، مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند.

آزمون تولید لیپاز

محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب تهیه شد. ۱۰ سی سی توین[3] ۸۰ جداگانه اتوکلاو شده و به محیط درحال سرد شدن افزوده شد. پس از اختلاط کامل محیط در پتری، قارچ به صورت خطی کشت داده شد و پس از چند روز هاله رسوبی در اطراف محل رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفت که نشان دهنده هیدرولیز شدن توین است (Raymond and Crisan 1975).

آزمون تولید آمیلاز

به محیط کشت آگار غذایی ۰/۲ درصد نشاسته محلول افزوده و پس از اتوکلاو به پتری منتقل شد و قارچ به صورت خطی بر روی آن کشت داده شد. پس از چند روز با افزودن محلول لوگول[4] (ید در یدور پتاسیم) در صورتی که قارچ نشاسته را هیدرولیز کرده باشد هاله بی رنگی در اطراف محل رشد ایجاد می شود. جهت تهیه محلول لوگول، ۲ گرم یدور پتاسیم، یک گرم ید و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را مخلوط کرده و این محلول را چند ساعت نگه می داریم تا به خوبی حل شود (Song et al. 2011). همچنین سویه ها با استفاده از کیت (Invitrogen EnzChek Ultra Amylase Assay Kit Corporation,USA) طبق دستورالعمل مربوطه، مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند.

آزمون تولید زایلاناز

به منظور ردیابی جدایه های قارچی مولد آنزیم زایلاناز از محیط کشت XC[5] استفاده شد. جدایه ها بر روی محیط کشت مذکور کشت شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه برای مزوفیل ها انکوبه شدند. مشاهده هاله روشن در اطراف محیط کشت مؤید مثبت بودن آزمون خواهد بود (Khianngam et al. 2009). همچنین سویه ها با استفاده از کیت EnzChek Ultra Xylinase Assay Kit (Invitrogen Corporation,USA) طبق دستورالعمل مربوطه، مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی قارچ ها

قارچ‌ها پس از آبگیری از ریسه‌های قارچ در دستگاه لیوفلایزر با استفاده از روش CTAB استخراج شدند. جهت بررسی کیفیت نمونه‌های استخراج شده DNA، از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز استفاده شد. دی ان ای‌هایی با الگوی نواردهی پررنگ جهت انجام آزمایشات انتخاب شدند. از دستگاه نانودراپ نیز جهت بررسی کمیت DNA استفاده شد (Velegrak et al. 1999). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای M13F (5'-TAAAACGACGGCCAG-3') و M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') قارچ‌ها و به کمک دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad در ۴۰ چرخه با اندکی تغییرات انجام شد (Singh et al. 2011a). محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده و تجزیه شد. نمونه های تکثیر شده DNA به مرکز توالی یابی Seqlab آلمان ارسال شده و به منظور شناسایی گونه‌ها و تهیه دندروگرام، از نرم افزارهای Chromas، Bioedit، DNAstar ، Blast و MEGA5 استفاده شد.

[1] Carboxyl methyl cellulose
[2] Congo red
[3] Tween
[4] Logol
[5] XC medium

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

نتایج و بحث

سه سویه قارچی با نام های ABRII12، ABRII13 و ABRII14 از فرآیند تولید کمپوست جداسازی شدند که دارای دمای بهینه ۳۷ درجه سانتیگراد، اسیدیته بهینه ۵/۱ و همچنین مدت زمان بهینه رشد ۲۴ ساعت در محیط کشت عمومی PDB[1] بودند بررسی کیفی و کمی فعالیت آنزیمی سه جدایه مذکور نشان داد که این سه سویه از نظر فعالیت آنزیمی سلولاز، زایلاناز، آمیلاز و پروتئاز متفاوت می باشند. اما هیچکدام از سویه ها فعالیت لیپازی نشان ندادند (شکل ۱ و جدول۱ و ۲). ارزیابی های کمی نشان داد که در میان سویه ها، سویه ABRII13 و ABRII12 (۴/۲ واحد بر میلی لیتر) دارای بیشترین و کمترین فعالیت پروتئاز بودند. مقایسه کیفی سویه ها نشان داد که سویه ABRII14 قادر به تولید سلولاز بوده ولی در بررسی های کمی بین سویه های مورد مطالعه هیچ یک قادر به تولید سلولز بطور قابل ملاحظه نبودند. این سویه می تواند منابع سلولزی مانند چوب، ضایعات گیاهی تر و ... موجود در توده را تجزیه و فرآیند کمپوستینگ را تسریع نماید. به جز سویه ABRII12، سویه های ABRII13 و ABRII14 (۱۶۵ واحد بر میلی لیتر) توانستند آنزیم تجزیه کننده نشاسته را به میزان قابل توجهی تولید نمایند. این آنزیم نیز از کمک کننده های تجزیه منابع آلی به شمار رفته و در فرآیند کمپوستینگ می تواند نقش مهمی ایفا نماید. هر سه سویه قادر به تولید زایلاناز بودند که سویه ABRII12 و ABRII13 (۸۵/۵ میلی واحد بر میلی لیتر) دارای بیشترین میزان تولید نسبت به ABRII14 (۶۴ میلی واحد بر میلی لیتر)بوده و این سویه ها می توانند منابع سختی چون چوب موجود درضایعات را تجزیه و کمپوستینگ را تسریع نمایند. این آنزیم نیز نقش شایان توجهی در طول فرآیند ایفا می کند (Savitha et al. 2007).

نتایج نشان داد که ABRII12 توانایی تجزیه پروتئین (۴٫۱۵۶۷ Unit/ml) و زایلن (۸۵٫۵ mUnit/ml)، ABRII13 قادر به تجزیه پروتئین (۴٫۳۳۸۶ Unit/ml)، زایلن (۸۴٫۹۹۶۷ mUnit/ml)، نشاسته (۱۶۴٫۰۵۳۳ Unit/ml) و ABRII14 پروتئین (۴٫۵۸ Unit/ml)، زایلن (۶۴٫ ۱۲۶۷ mUnit/ml)، نشاسته (۱۶۵٫۷۸ Unit/ml) و سلولاز را به میزان کمی (۰٫۰۷ mUnit/ml) دارد. سویه های قارچی مورد مطالعه بازه متفاوتی از فعالیت آنزیمی (پروتئاز، سلولاز، زایلاناز و آمیلاز) را بروز دادند که با بکارگیری آنها به عنوان مخلوط میکروبی به صورت مکمل و چند آنزیمی عمل کرده و کلیه سوبستراها را مورد تجزیه قرار می‌دهند که علاوه بر کاهش مدت زمان انجام فرآیند کمپوستینگ می توان ضایعات موجود در بستر پسماندها را به خوبی تجزیه نمود و سبب افزایش کیفیت کمپوست حاصله شد (Rhodes 2006; Raut et al. 2008).

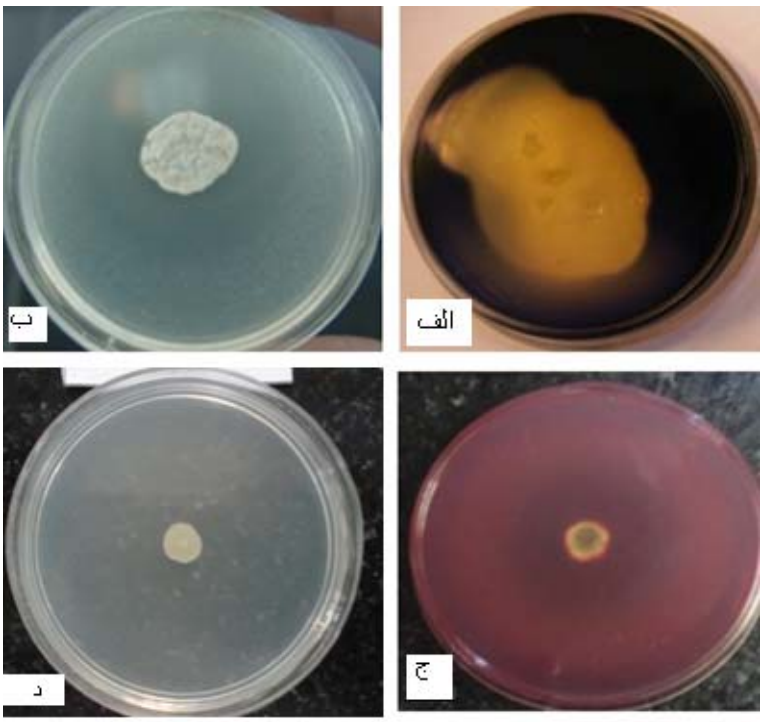
در این مطالعه سویه‌های قارچی دخیل در فرآیند کمپوستینگ ضایعات شهری با روش مولکولی مبتنی بر توالی‌های ریبوزومی شناسایی شدند. استفاده از این ژن‌ها در شناسایی توسط محققین مختلف گزارش شده است (Tiquia ; Hatamoto et al. 2008 2005). پس از استخراج دی ان آ سویه های قارچی و الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز نتایج به دست آمده در تایید کیفیت و استخراج مطلوب مورد بهره برداری قرار گرفت. سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از محصولات حاصل از PCR بر روی ژل آگارز یک درصد شدند و نوارها مورد نظر با نشانگر اندازه ۱۰۰۰ bp، SMO323 شرکت فرمنتاز مقایسه شد، قطعه ۱۱۰۰bp برای ژن 18SrDNA در همه سویه‌ها شناسایی شد (شکل۲).

پس از توالی‌یابی قطعات و جدا نمودن[2]، سه سویه قارچی مشابه هم *Aspergillus fumigates* دیده شد که نتایج توالی یابی محصول PCR توالی 18SrDNA و مقایسه آن با توالی های موجود در NCBI[3] با استفاده از موتور جستجوگر BLAST[4] نشان داد که سویه های جداسازی شده با توانایی تولید آنزیم های متفاوت شباهت بسیار بالایی با توالی قارچ *Aspergillus fumigates* نشان دادند که نتایج حاصل از دندروگرام نیز موید همین مطلب بود اما بدلیل اینکه از نظر فعالیت آنزیمی متفاوت بودند، به‌عنوان سه جنس و گونه متفاوت که به‌طور معمول در

[1] Potato dextrose broth

[2] Align
[3] National center for biotechnology information
[4] Basic local alignment search tool

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]



شکل ۱- واکنش های مختلف به صورت تولید مثبت آنزیم ها که با سنجش کیفی در سویه ABRII14 مورد ارزیابی قرار گرفتند: الف) فعالیت آمیلازی: با افزودن محلول لوگول در صورتی که قارچ نشاسته را هیدرولیز کرده باشد هاله بی رنگی در اطراف محل رشد ایجاد می شود. ب) فعالیت پروتئازی: تشکیل هالهٔ بی‌رنگ در اطراف کلنی نشانه فعالیت پروتئازی سویه ها است. ج) فعالیت سلولازی: پس از آغشته نمودن محیط با معرف کنگو سپس با شستشو با کلرید سدیم یک نرمال، کنگو قرمز را شسته و تولید هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی در طول این مدت نشانه تولید سلولاز توسط نژادهای قارچی است. د) فعالیت لیپازی: سویه ها قادر به تولید لیپاز نبوده در نتیجه آن هاله‌ای اطراف کلنی مشاهده نمی‌شود.

جدول ۱-نتایج سنجش کیفی فعالیت آنزیمی در سه سویه قارچی جداسازی شده

قارچ ها	سلولاز	زایلاناز	آمیلاز	پروتئاز	لیپاز
ABRII12	-	+	-	+	-
ABRII13	-	+	+	+	-
ABRII14	+	+	+	+	-

فرآیند کمپوستینگ حضور دارند (Anastasi et al. 2005). قارچ-های موثر دیگری چون *Fusarium lateritiu* و *Trichoderma harzianum* که نقش بسزایی در تجزیه مواد آلی موجود در طول فرآیند دارند، شناسایی شده‌اند (Marshal et al. 2003) ولی در این بین *Aspergillus fumigatse* ها به‌عنوان سازگارترین و موثرترین در فرآیند تجزیه ماده خام سخت معرفی شده اند که در این مطالعه شناسایی بر اساس روش‌های مولکولی بوده و نام گذاری صورت نمی‌گیرد بلکه بلاست و در پی آن شناسایی صورت می‌پذیرد.

آسپرژیلوس‌ها در گروه قارچ‌های ناقص قرار دارند و از بزرگترین گروه کپک ها هستند که در شرایط بسیار نامساعد رطوبتی قادر به فعالیت بوده و بیش از ۲۰۰ گونه از این جنس تا کنون شناسایی شده که پتانسیل بکارگیری آنها در صنعت وجود دارد (Rhodes 2006). با توجه به فعالیت آنزیمی فوق العاده آسپرژیلوس ها، این قارچ ها در صنایع تخمیری و تجزیه ترکیبات پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرند. این قارچ ها بر حسب نوع منبع غذایی و شرایط کشت، اسیدهای آلی مثل اسید سیتریک، اسید گلوکونیک، اسیدتانیک و آنزیم هایی مثل آمیلاز، پکتیناز، بتاگالاکتوزیداز و ترکیبات دیگر تولید می‌کنند (Gregg et al. 2001).

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مبنی بر توان تولید چندگانه آنزیمی سویه های بدست آمده، این قارچ‌ها می‌توانند در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

صورت استفاده در فرایند تولید کمپوست نقش به‌سزایی در تجزیه بستر آلی موجود در کمپوست داشته باشد و در کوتاه کردن فرآیند و همچنین در افزایش کیفیت تولید تاثیر شگرفی داشته باشد. علاوه بر این نتایج تحقیق نشان داد که استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر نواحی حفاظت شده استفاده شده، علاوه بر افزایش سرعت شناسایی و سادگی، روش مطمئنی برای شناسایی می باشد. در صنایع تخمیری و تجزیه مطالعه قابلیت سویه‌های آسپرژیلوس جهت تولید آنزیم نشان داد هریک ازآن ها بطور جداگانه قادر به تولید آنزیم‌های متفاوت و در نتیجه قادر به تجزیه مواد آلی متفاوت موجود در بستر کمپوست در حال تولید بودند که با بکارگیری توام آنها می توان علاوه بر کوتاه کردن فرآیند، کمپوست را از لحاظ کیفی نیز غنی نمود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق در قالب پروژه پژوهشی مشترک بین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و شهرداری اصفهان انجام پذیرفت. از کلیه همکاران بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده و همچنین همکاران شهرداری اصفهان و کارخانه کمپوست شهرداری اصفهان که همکاری صمیمانه ای در اجرای این تحقیق داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Adams JD, Frostick LE (2008) Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. Waste Management 29:598-605.

Anastasi A, Varese GC, Marchisio VF (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. Mycologia 97:33-44

Ball A, Jackson A (1999) The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. Bioresource Technology 54:311-314.

Caroline Howard C, Bremner P, Fowler M, Isodo B, Scott N, Slater A (2009) Molecular Identification of Hypericum perforatum by PCR Amplification of the ITS and 5.8S rDNA Region. Biochemistry Molecular Biology and Biotechnology 75:864-869

Castaldi P, Garau G, Melis P (2008) Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. Waste Management 28:534-540.

Forsyth W, Webley M (1948) The microbiology of composting. a study of the aerobic themophilic bacterial flora developing in grass composts. Journal of Applied Microbiology 11: 34-39.

Fredricks D, Fiedler T, Marrazzo J (2005) Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. N Engl J 353:1899-1911

Gregg M, Recer G, Browne M, Horn E, Hill K, Boehler W (2001) Ambient air levels of Aspergillus fumigatus and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. Aerobiologia 17:99-108

Hargreaves JC, Adl MS, Warman PR (2008) A review of the use of composted municipal.

Hatamoto M, Tanahashi T, Murase J, Matsuya K, Hayashi M, Kimura M, Asakawa S (2008) Eukaryotic communities associated with the decomposition of rice straw compost in a Japanese rice paddy field estimated by DGGE analysis. Biology and fertility of soils 44:527-532

Hogg D, Barth J, Favoino E, Centemero M, Caimi V, Amlinger F, Devliegher W, Brinton W, Antler S (2002) Comparison of compost standards within the EU, North America, and Australasia. Waste and Resources Action Programme Committee (UK).

Khianngam S, Tanasupawat S, Lee J, Lee K, Akaracharanya A (2009) Paenibacillus siamensis sp. nov., Paenibacillus septentrionalis sp. nov. and Paenibacillus montaniterrae sp. nov., xylanase-producing bacteriafrom Thai soils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:130-134.

Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgene J, Godon J (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. Environmental Microbiology 8:720-731

Majidi S, Roayaei M, Ghezelbash G (2011) Carboxymethyl cellulase and filter paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. Microbiology Journal 1:8-16.

Marshall MN, Cocolin L, Mills DA, VanderGheynst JS (2003) Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. Journal of Applied Microbiology 95:934-948

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Defago G (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant Pathology 44:40-50.

Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougel C, Thioulouse J, Nazaret S (2001) Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. Applied and Environmental Microbiology 67:4479-4487.

Rappe M, Giovannoni S (2003) The uncultured microbial majority. Annual Reviews in Microbiology 57:369-394.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]

Rastogi G, Bhalla A, Adhikari A, Bischoff K, Hughes S, Christopher L, Sani R (2010) Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. Bioresource Technology 8798-8806.

Raut M, William P, Bhattacharyya JK, Chakrabarti T, Devotta S (2008) Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste – A compost maturity analysis perspective. Bioresource Technology 99 : 6512-6519.

Raymond AT, Crisan EV (1975) Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine substrates. Applied Microbiology 29:206-210.

Rhodes J (2006) *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence 44: 77-81.

Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K (2007) Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper Pulp. Earth and Environmental Science 78: 217-221.

Singh A, Sharma A, Johri B (2011)b Phylogenetic profiling of culturable bacteria associated with early phase of mushroom composting assessed by amplified rDNA restriction analysis. Annals of Microbiology

Singh P, Raghukumar P, Verma P, Shouche Y (2011)a Fungal Community Analysis in the Deep-Sea Sediments of the Central Indian Basin by Culture-Independent Approach. Environmental Microbiology 61:507-517

Tiquia S. M (2005) Microbial Community Dynamics in Manure Composts Based on 16S and 18S rDNA T-RFLP Profiles. Environmental Technology 26: 157-160.

Tiquia SM, Ichida JM, Keener HM, Elwell DL, Burtt EH, Michel FC (2004) Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. Applied Microbiology and Biotechnology 67: 412-419

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.10.2]