

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

محسن برجی^۱

چکیده

اخيراً، کاربرد میکرووارگانیسم‌ها 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 هوایی که قادر به استفاده از نمونه‌های لیگنین به عنوان 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 (*Pseudomonas* sp.) شناسایی شدند، قادر به تجزیه لیگنین و پلی‌ساقاریدهای 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 باکتری‌ای 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 ($P < 0.01$). 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 بخشدید. 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 ۱۹۹۴، سطح علفزارها (Grassland) در جهان، $\frac{3}{4}$ میلیارد هکتار است که حداقل هر سال $10-30$ میلیارد تن گیاه علفی (بر اساس وزن خشک) در

این علفزارها تولید می‌شود (۱۸). اگر چه به دلیل کم بودن قابلیت هضم، فقط $20-30$ درصد از بیوماس تولیدی علفزارها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در نواحی تمرکز جمعیت در جهان، حداقل سطح زمین‌ها

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

وجود لیگنین می‌باشد، عمدۀ تحقیقات به شکستن اتصال بین این ماده و هولوسولولزها و یا تجزیه خود ملکول لیگنین متمرکر 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 لیگنوسولولز، از جمله خاک، کمپوست، علوفه خشک، کلش یا خردۀ‌های چوب زندگی می‌کنند و از نظر تجزیه لیگنوسولولز، 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 (Acid precipitable polymeric lignin) (APPL) تبدیل می‌نمایند (۲، ۷، ۱۳، ۲۶ و ۳۶). APPL یک لیگنین تغییر یافته از نظر ساختمانی است. این حد واسط جدید یک لیگنین پلی مری 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 اکتینومیست‌های است.

اما علاوه بر اکتینومیست‌ها تجزیه لیگنین به وسیله باکتری‌های غیر رشته‌ای نیز توسط هایدر و تروجانوسکی (۱۷)، پریستیلو و همکاران (۲۸، ۲۹ و ۳۰) و موری و همکاران (۲۴) گزارش شده است. معدنی شدن لیگنین به وسیله سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) (۳۰) و به وسیله سراشیا مارسیسنس (*Serratia marcescens*) تا ۲ درصد بود، اگر چه سراشیا مارسیسنس تا ۴۴ درصد لیگنین را محلول نمود (۲۹). باکتری‌های جداسده از کمپوست یا خاک

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 جیوه 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 جیوه دام‌ها افزایش خواهد یافت.

کاه‌ها برای مدت طولانی به عنوان منبع تأمین انرژی در تغذیه 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 (۱۴). 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، آلدگی 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، تجزیه 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 لیگنوسولوزی به دلیل

که عصاره حاصل بدون رنگ می‌شد) و برای ۲۴ ساعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. لیگنین از کلش و خاک اره به سه روش مختلف استخراج شد (۲۰).

۱. لیگنین دی اکسان (Dioxane lignin)

۲۵ گرم کلش یا خاک اره در ابعاد یک میلی‌متر خرد گردیده و برای ۵۰ ساعت با ۵۰ میلی لیتر اتانول (٪ ۹۵) – بنزن (٪ ۹۹/۷) در حال جوش (۱:۱) عصاره گیری شد. سپس در یک دسی کاتور خلاء دار خشک شدند. کلش و خاک اره عصاره گیری شده برای مدت ۱۲ ساعت با ۳۰ میلی‌لیتر محلول در حال جوش، متکل از دی اکسان (1,4-Dioxane, or 1,4-diethylene oxide, Merck Co. LTD.) (٪ ۹۹/۵) – آب (۱:۹) عصاره گیری شد. عصاره تحت خلاء تغییظ شده و لیگنین در آب مقطر دی یونیزه شده رسوب داده شد. لیگنین رسوب داده شده سه مرتبه با آب شسته و خشک گردید، سپس با ۵۰ میلی لیتر اتر نفت شسته شد (۲۰).

۲. لیگنین کلیسون (Klason-lignin)

۲۵ گرم کلش و خاک اره عصاره گیری شده با آب داغ (همچنان که در بالا توصیف شد) با ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ٪ ۷۲ در ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲ ساعت فراوری شد. مخلوط به وسیله آب تا ٪ ۳ غلظت اسید رقیق شد و فراوری تا ۴ ساعت دیگر ادامه یافت. بقایا کاملاً با آب شستشو داده شد (۲۰).

۳. لیگنین اسید هیدروکلریدریک (HCl-Lignin)

۲۵ گرم کلش یا خاک اره آسیاب شده (به اندازه یک میلی‌متر) در ۵۰ میلی‌لیتر محلول اسید هیدروکلریدریک (٪ ۴۰) (وزن مخصوص ۱/۱۵ در ۵ درجه سانتی‌گراد) با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ریخته شد و برای ۲ ساعت تا حد لزوم برای حفظ دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مخلوط یخ اضافه گردید و اجازه داده شد که تا ۱۸ ساعت باقی بماند. رسوب پس از صاف کردن با آب جوش شسته و خشک شد (۲۰).

به نام آزوتوباکتر (*Azotobacter*), باسیلوس مگاتریوم (*Bacillus megaterium*) بری یا محلول کردن لیگنین بودند (۲۴ و ۲۹)، سراشیا مارسیسینس، قادر به رنگ همبستگی مثبتی با معدنی و محلول کردن لیگنین داشت (۲۹). اودیر و همکاران (۲۵) باکتری گرم منفی هوایی از خانواده‌های سودوموناسه و نیسریاسه را در خصوص توانایی شان برای محلول نمودن لیگنین دی اکسان صنوبر بدون ماده معدنی کمکی از ۱۲۲ نمونه خاک، جداسازی نمودند. میزان تجزیه لیگنین دی اکسان و لیگنین چوب آسیاب شده بین ۲۰ تا ۴۰ درصد مقدار اولیه طی ۷ روز دوره انکوباسیون بود.

شریواستاوا و همکاران (۳۵) نیز توان حذف لیگنین از شیرابه سیاه صنایع کاغذ سازی را به وسیله باکتری سودوموناس پوتیدا مورد بررسی قرار دادند و حداکثر راندمان را پس از ۱۰ روز، ۸۰ درصد تعیین نمودند.

بر اساس نظر محققین (۱۵) سودوموناس‌ها که باکتری‌های میله‌ای گرم منفی هوایی‌اند، بالاترین توان تجزیه‌ای را دارند. از جمله این گونه‌ها می‌توان به سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) و سودوموناس فلوریسنس (*P. fluorescens*) اشاره نمود.

هدف از پژوهش حاضر، جداسازی باکتری‌های قادر به تجزیه لیگنین و پلی ساکاریدهای مواد خشبي و بررسی توانایی تجزیه‌ای باکتری‌های جدا شده بود. هم‌چنین در این بررسی، 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 شد و با استفاده از یک آسیاب چکشی به ابعاد یک میلی‌متر خرد گردیدند. سپس کلش و خاک اره چهاربار با آب جوش عصاره گیری شدند (عمل عصاره گیری تا زمانی ادامه می‌یافت

پتری‌های تهیه شده برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ 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 کلنجی‌ها مشخص شد. همچنان با انجام سه زیر کشت متوالی، باکتری‌ها تا حد امکان خالص سازی شدند.

جدا سازی باکتری‌ها با تأکید بر استرپتومایزرها

برای جداسازی استرپتومایزرها از نمونه‌های جمع آوری شده از دو محیط کشت جامد و مایع استفاده شد (۱۲ و ۳۱٪). 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 همچنان دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، دمای بهینه برای تجزیه لیگنوسولولز 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 کلنجی‌ها، کشت مجدد از آنها انجام شد. نمونه‌هایی که پس از سه

لیگنین‌ها، همچنان 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 لیگنوسولولز 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 مرحله تغییر نکردن رنگ آب)، در مرحله دوم با مخلوط بنزن (۰/۹۷٪) - اتانول (۰/۹۵٪) (۱:۱ حجمی / حجمی)، در مرحله سوم با اتانول (۰/۹۵٪) و در مرحله آخر دوباره با آب داغ عصاره گیری و بعد از آن در هوا خشک شدند. از این لیگنوسولولز 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 استرپتومایزرها در تجزیه لیگنین بر استفاده از محیط‌های اختصاصی به منظور جداسازی این نوع باکتری‌ها تأکید شده است.

تقریباً ۱۰-۱۵ میلی‌گرم 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) ۶.۲g Na₂HPO₄ + ۳.۵g KH₂PO₄ + ۰.۵g NaCl + ۱.۰g NH₄Cl (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 لیگنوسولولز استفاده شد. ارلن‌ها و

درجه سانتی گراد برای ۲۰ روز اینکوبه شدند. بعد از طی این مدت بطری‌ها از انکوباتور خارج شدند. پس از خشک کردن محتويات بطری‌ها در داخل خشک کن، کاهش وزن ماده خشک آنها (در مقایسه با وزن اولیه = ۴ گرم) محاسبه شد (۲، ۶، 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 ۶ هفته بود. در پایان انکوباسیون مواد لیگنوسلولزی باقی‌مانده با استفاده از کاغذ صافی جدا و درصد پروتئین (۳)، درصد کربوهیدرات (۶)، 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 سانتی گراد 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 محتويات 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 محتويات ارلن‌ها با استفاده از کراسیبل‌های صافی دار، صاف و کراسیبل‌ها در دمای 3 ± 105 درجه سانتی گراد (تا رسیدن به وزن ثابت) برای دو ساعت خشک

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 سانتی گراد، 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 سانتی گراد برای ۲۰ روز اینکوبه شدند. هر ۴ 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 سانتی گراد 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 کترل 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

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 (فتوتیپی یا ژنتیکی) به ۵ گروه تقسیم می‌شود که هر گروه نیز دارای چندین گونه است (۲۱).

پیروز و همکاران (۳۲) یک صد 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 ۸۶ 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 پراکنده‌گی غالب باکتری‌های مذکور در محیط‌های محتوی مواد لیگنوسلولزی و اهمیت این باکتری‌ها در چرخه کربن محیط زیست در محیط‌های مانند خاک و مواد گیاهی در حال پویایی توجه نمود.

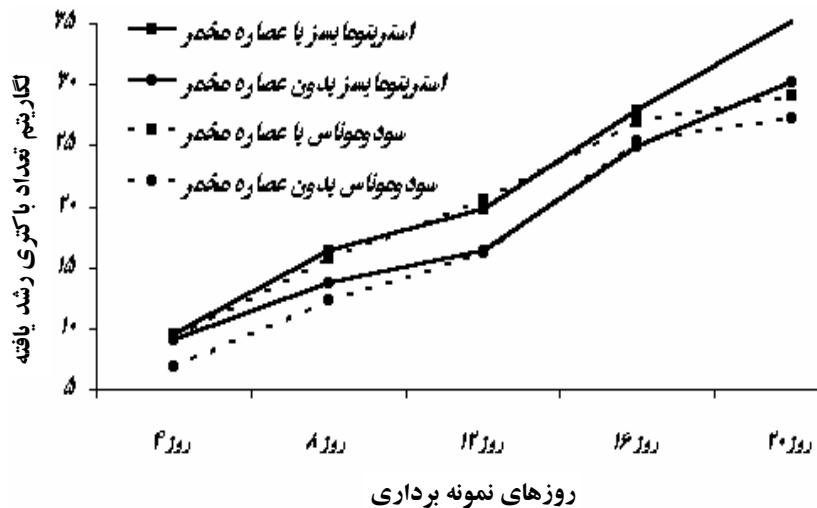
در ارتباط با میزان رشد این باکتری‌ها نتایج این آزمایش نشان داد که از بین عوامل مورد بررسی، نوع ماده لیگنوسلولزی، و عامل کاربرد و جنس باکتری، دارای تأثیر بسیار معنی‌دار بر میزان رشد باکتری بودند (جدول ۱)، در صورتی که استفاده از عصاره مخمر، چنین اثری نداشت (جدول ۱). از بین مواد لیگنوسلولزی، بیشترین رشد باکتری در محیط دارای کلش گندم نسبت به خاک اره مشاهده شد ($0/01 < P < 0/01$) (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 ($0/01 < P < 0/01$). نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها نیز نشان داد که در مجموع،

شدند. مواد موجود در کراسیبل‌ها شامل لیگنین نامحلول در اسید و خاکستر نامحلول در اسید بود. کراسیبل‌ها در کوره الکتریکی با دمای 575 ± 25 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.

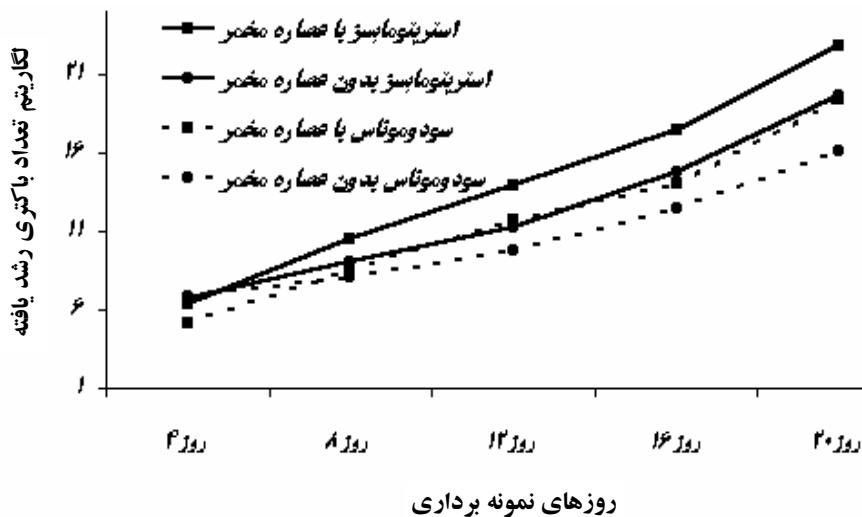
در آزمایش تعیین تعداد باکتری‌ها (منحنی رشد) و تعیین pH محیط کشت از یک طرح کاملاً تصادفی متعادل با آزمایش فاکتوریل استفاده شد که عامل‌ها (فاکتورها) شامل استفاده یا عدم استفاده از باکتری (سه سطح) و ماده لیگنوسلولزی (دو سطح) بودند. در تعیین تجزیه لیگنوسلولزها نیز عوامل آزمایشی همانند آزمایش فوق بود. در 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 (۴) 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 (Streptomycetaceae) 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).



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



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

باکتریایی دارای تأثیر بسیار معنی‌داری ($P < 0.01$) 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 سودموئناس و شاهد پس از آن

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

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی تأثیر فرآوری باکتریایی در مقایسه با شاهد (بدون باکتری)، pH محیط کشت، کاهش وزن باقی مانده، کربوهیدرات، بروتین، pH محیط کشت و تغییر آزادی شبیه‌ای مواد لیگنوسلولزی (کلش گندم و خاک اره)

		شبیه‌ای مواد لیگنوسلولزی (کلش گندم و خاک اره)		متانع تغییر آزادی		درجه تعداد باکتری (کاریترم)		تعداد باکتری		بروتن		وزن باقی مانده		کربوهیدرات		APPL		لیگنین محلول		لیگنین نامحلول	
		(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)
۱۱۲۹/۱۸**	۱/۴۵**	۰/۰۰۰۸۲**	۰/۰۰۰۷۶**	۲۷/۷/۰۹**	۳۰/۰۹**	۱/۵۳**	۱۱۲۴/۱۵**	۱/۰۴۴**	۰/۰۴۲	۰/۹۶ ns	۷/۹۶ ns	۱/۱۲۴/۱۵**	۱	(A)	۰/۰۰۰۵۲**	۰/۰۱۵**	۰/۰۰۰۵۴**	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۰۵۱	۰/۰۰۰۵۰	
۳/۴۷ ns	۰/۰۸۵**	۰/۰۰۰۵۲**	۰/۰۰۰۵۲**	۲۲/۴/۰۵**	۲/۹۰**	۰/۰۴۰	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	۰/۰۰۰۴۷ ns	
۵۷/۲۱**	۱/۹/۹۳**	۰/۰۱۲**	۰/۰۱۲**	۱۲۳/۸۷**	۱۰/۹۶**	۱۹/۲۷**	۱۲۳/۷۶**	۱۰/۹۶**	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۶ ns	
۰/۰۰۰۹ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۵ ns	
۰/۱۶۳ ns	۰/۰۶۰ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۰۲۵ ns	
۰/۲۵۵ ns	۰/۰۳۴**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	۰/۰۰۰۴۳**	
۰/۲۸۵ ns	۰/۱۲ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	۰/۰۰۰۰۷۶ ns	
۱/۱۴۵	۱/۱۳/۲۵	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	۰/۰۰۰۰۷۸ ns	
۰/۹۱	۰/۱۳/۵۶	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	۰/۰۰۰۰۷۴ ns	
۰/۲۲۳	۰/۱۳/۵۶	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	۰/۰۰۰۰۷۱ ns	

ns نشان دهنده عدم معنی دار بودن اثر عوامل آزمایشی در سطح احتمال ۰،۵ و ۱ درصد می‌باشد.
* و ** : به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن اثر عوامل آزمایشی در سطح احتمال ۰،۰۵ و ۰،۰۱ است.
۱. جذب در طول موج ۰۰۰ نانومتر تعیین شده است.
۲. درجه آزادی خطای برای تعداد باکتری و pH، ۰،۷۶ و برای سایر معیارهای اندازه‌گیری شده ۰،۴ بوده است.

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	نگذشتن نامحطر (٪)	نگذشتن محلول (٪)	APPL	وزن بقایه گندم (گرم)	کربوهیدرات (٪)	پروتئین (٪)	pH	تجدد باکتری (گردش)
کلش، بدون عصاره مخمر، بدون باکتری	۱۶/۱۶ ^c	-۰/۱۵۳ ^g	۰/۰۱۶ ^f	۳/۸۷ ^{ab}	۵۴/۶۶ ^{bc}	۳/۰۴ ^{fg}	۷/۹۴ ^{cd}	۰/۰۰ ^b
کلش، بدون عصاره مخمر، استرپتوマイزر	۱۲/۰۱ ^{cd}	۲/۲۶ ^c	۰/۰۲۰ ^b	۲/۹۲ ^e	۳۸/۸۸ ^f	۰/۰۳ ^b	۷/۹۲ ^{de}	۱۸/۸۴ ^a
کلش، بدون عصاره مخمر، سودوموناس	۱۴/۳۷ ^{cd}	۱/۱۵ ^e	۰/۰۱۳۳ ^e	۳/۴۷ ^{cd}	۴۹/۷۹ ^{cd}	۳/۰۴ ^d	۶/۸۷ ^e	۱۸/۰۵ ^a
کلش، با عصاره مخمر، بدون باکتری	۱۵/۰۰ ^{cd}	۰/۰۴۶ ^f	۰/۰۰۲۴ ^f	۴/۱۹ ^a	۵۷/۶۸ ^{ab}	۳/۰۵ ^{de}	۶/۹۴ ^{cd}	۰/۰۰ ^b
کلش، با عصاره مخمر، استرپتوマイزر	۱۱/۳۶ ^d	۳/۱۷ ^b	۰/۰۲۶۷ ^a	۲/۶۰ ^f	۳۱/۵۸ ^g	۰/۰۸۴ ^a	۷/۰۸ ^a	۱۸/۹۴ ^a
کلش، با عصاره مخمر، سودوموناس	۱۳/۸۵ ^{cd}	۱/۰۱ ^d	۰/۰۱۷۷ ^{cd}	۳/۲۸ ^d	۴۱/۳۵ ^{ef}	۰/۰۳۸ ^c	۷/۹۴ ^{cd}	۱۸/۶۹ ^a
خاک اره، بدون عصاره مخمر، بدون باکتری	۲۷/۳۰ ^a	۰/۰۳۷ ^f	۰/۰۰۰۹ ^f	۳/۹۴ ^{ab}	۶۲/۵۲ ^a	۱/۰۸۵ ^j	۶/۹۸ ^{bcd}	۰/۰۲۲ ^b
خاک اره، بدون عصاره مخمر، استرپتوマイزر	۲۳/۳۲ ^{ab}	۲/۴۲ ^c	۰/۰۱۶۶ ^{cd}	۳/۱۹ ^{de}	۴۵/۷۵ ^{de}	۳/۰۵ ^{ef}	۷/۰۰ ^{bc}	۱۸/۶۶ ^a
خاک اره، بدون عصاره مخمر، سودوموناس	۲۵/۰۵ ^{ab}	۱/۰۵ ^d	۰/۰۱۲۶ ^e	۳/۶۵ ^{bc}	۵۲/۹۳ ^{bc}	۲/۰۳ ^h	۶/۹۶ ^{cd}	۱۸/۲۴ ^a
خاک اره، با عصاره مخمر، بدون باکتری	۲۷/۳۰ ^a	۰/۰۵۸ ^f	۰/۰۰۱۱ ^f	۳/۹۶ ^{ab}	۵۱/۳۹ ^{ab}	۲/۰۷ ⁱ	۶/۹۸ ^{bcd}	۰/۰۱۶ ^b
خاک اره، با عصاره مخمر، استرپتوマイزر	۲۲/۱۴ ^b	۳/۶۹ ^a	۰/۰۱۹۴ ^{bc}	۲/۹۴ ^e	۳۶/۷۵ ^{fg}	۳/۰۶ ^d	۷/۰۶ ^a	۱۸/۰۵ ^a
خاک اره، با عصاره مخمر، سودوموناس	۲۴/۸۴ ^{ab}	۲/۴۴ ^c	۰/۰۱۴۹ ^{de}	۳/۳۷ ^{cd}	۴۸/۹۱ ^{cd}	۲/۰۱ ^g	۷/۰۳ ^{ab}	۱۸/۰۴ ^a
خطای استاندارد	۴/۹۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۰۲۹	۰/۰۳۴	۱۴/۲۵	۰/۰۶۲	۰/۰۷۸	۶/۰۵۷

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

- در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف غیر همسان است در سطح ۰.۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.
- میزان پروتئین نمونه اولیه کلش گندم ۳/۵ درصد و خاک اره ۲ درصد بود. نسبت کربن به ازوت در کلش ۶۸ و در خاک اره ۱۵۶ بود.
- میزان کربوهیدرات نمونه اولیه کلش گندم ۵۶ درصد و خاک اره ۶۰ درصد بود.
- میزان لیگنین نمونه اولیه کلش گندم ۱۶ درصد و خاک اره ۲۸ درصد بود.

تجزیه لیگنوسلولز می‌باشد. ریچارد (۳۴) 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). (۳۴)

استفاده از ترکیبات ازت دار 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 (۱۶) 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 هم آهنگی دارد. پستای و همکاران (۲۷) در بررسی‌های خود روی یازده سویه اکتینومیستی جدا شده از موریانه‌ها در A6 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

قرار گرفتند. همچنین به همان ترتیب که در مورد رشد باکتریایی عنوان شد، اگر 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 منع کربن، مواد لیگنوسلولزی است. بنابراین تنها در صورتی باکتری‌ها امکان رشد خواهند داشت که بتوانند با استفاده از آنزیم‌های سلولاز، زایلاتاز و پراکسیدازهای خود از کربن موجود استفاده کنند (۳۶). 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 منع کربن (کلش گندم و خاک اره) دانست. تیونسرو و همکاران (۳۹) در پژوهش بر روی باکتری Thermomonospora fusca (Thermomonospora fusca) با توجه به تعیین هم زمان میزان رشد و تولید آنزیم‌های بروون 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 خشبي، میزان و نوع ارتباطات لیگنین با سایر اجزای دیواره سلولی، وجود کربوهیدرات‌های غیر ساختمنی و محلول، وجود و میزان ازت و نسبت کربن به ازت باشد (۱۰) که قابلیت استفاده از مواد خشبي 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 (۳۴). خود میزان لیگنین نیز از جمله عوامل مهم در میزان

استفاده از عصاره مخمر) موجب افزایش ۷۵ درصدی میزان پروتئین نمونه شده‌اند (محاسبات ارائه نشده‌اند). همچنان که کروکر (۱۹) نیز با رشد یک آرتروباكتر 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 ($P < 0/01$) (جدول ۱). بیشترین میزان تجزیه کربوهیدرات‌ها در محیط کشت دارای کلش گندم و عصاره مخمر و تلقیح شده با استرپتومایسز دیده شد ($P < 0/05$). همچنان که در مطالعه کراوفورد و همکاران (۱۳) استرپتومایسز ویریدوسپوروس بعد از ۸ هفته موجب کاهش $44/4$ درصدی کربوهیدرات 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 و خاک اره) 53 درصد بوده است که با پژوهش مذکور هم آهنگی دارد (جدول ۲). توان تجزیه کربوهیدراتی به عنوان تابعی از توان ترشح آنزیم‌های اندوگلوكاتاز 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 کربوهیدرات، تأثیر باکتری به کاهش کاملاً معنی‌دار وزن منجر شده ($P < 0/01$)، در صورتی که نوع ماده لیگنوسلولزی و استفاده از عصاره مخمر، اثر کمتری اعمال ممدوه است (۱) ($P < 0/01$) (جدول ۱). همچنین در خصوص اثر کاربرد باکتری، بیشترین کاهش وزن به ترتیب در محیط‌های دارای استرپتومایسز و سودومونناس تعیین شد. در پژوهش پستانی و همکاران (۲۷) توان تجزیه لیگنو سلولز ساقه ذرت

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 (۱۶). 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 pH 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 p_H نظر یانگ و همکاران (۴۰) سیستم بافری محیط کشت، M9 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 دی‌سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی‌هیدروژن 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 شرایوستاوا و همکاران (۳۵) 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 ۱ و ۲ نشان داده شده است. در ارتباط با میزان پروتئین، مشخص شد که هر سه فاکتور مورد بررسی، تأثیر بسیار معنی‌داری بر پروتئین، مواد لیگنوسلولزی داشتند (جدول ۱) ($P < 0/01$) به نحوی که در بعضی از موارد، باکتری‌های مورد بررسی (به خصوص در صورت

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 ($P < 0.05$). در مطالعه آناتایی و کراوفورد (۶) میزان کاهش لیگنین توسط استرپتومایسز ویریدوسپوروس در چوب نرم‌ها، چوب سخت‌ها و گراس‌ها به ترتیب $30/9$ ، $32/0$ و $44/2$ درصد و برای استرپتومایسز ستوئی به ترتیب $34/1$ ، $29/5$ و 39 درصد بود که نشان دهنده بیشتر بودن میزان تجزیه لیگنین در گراس‌ها نسبت به چوب‌ها است. چندین دلیل برای این مسئله 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 خشبي به منظور کاهش یا حذف لیگنین می‌تواند به عنوان یک راه کار، جایگزین روش‌های فیزیکی و شیمیایی در تولید خوارک 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-respirometry) (استفاده از سلولز و لیگنین رادیو اکتیو) و آنزیمی خواهد داشت. تولید انواع آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات دیواره سلولی و انواع پروپیوتیک‌ها با استفاده از سویه‌های میکروبی مؤثر، از جمله نتایج بسیار کاربردی مطالعات این چنینی خواهد بود.

(بر اساس کاهش وزن) در ۱۱ سویه اکتینو میستی (بعد از ۴ هفته رشد) نشان داد که در ۵ سویه، بیشترین کاهش وزن $40-50$ درصد، در سه سویه کاهش وزن متوسط $30-40$ درصد و سه سویه کاهش وزن $20-30$ 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 ($P < 0.01$) (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 ($P < 0.01$) (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 ($P < 0.01$) (جدول ۱). این مسئله 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.

سپاسگزاری

مسئولین سازمان مرکزی که در تصویب و تأمین اعتبار این پروژه مساعدت نمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم. از کمک‌های تکنیکی آقای شجاعی سعدی و خانم ریبعی نیز تشکر می‌نمایم.

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

منابع مورد استفاده

1. 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 Streptomyces in agitated submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1165-1168.
3. Ammon. 1979. Official Methods of Analysis. 12th ed., PP. 927-928, Assoc. Anal. Chem., Washington, DC.
4. Amnon. 1985. User's Guide: Statistics (Version 5 ed.). Cary, NC: SAS Institute.
5. Amnon. 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 ¹⁴C-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.

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.* 57: 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. Carnicer, A. Rodriguez and G. De La Fuente. 1994. Limited degradation of industrial, synthetic and natural lignin by *Serratia marcescens*. *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.* 57: 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.