



Isolation and identification of some bacterial and fungal isolates based on qualitative test of cellulase and ligninase activity from different sources

Hossein Kari Dolatabad^{*1} | Hossein Saffari² | Mitra Rahmati³

1. Corresponding Author, Assistant Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: h.kari@areeo.ac.ir
2. Assistant Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: hosaffary@yahoo.com
3. Assistant Prof., Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: m.rahmati@areeo.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 02.15.2021

Revised: 05.10.2021

Accepted: 07.06.2021

Keywords:

Agricultural residues,
Bacteria,
Cellulase,
Fungi,
Ligninase

ABSTRACT

Background and Objectives: The existence of agricultural wastes, especially wood and degradation-resistant wastes and time-consuming composting of these residues, show the importance of using degrading microorganisms as bioactivators. By inoculating microorganisms into hard-to-decompose agricultural residues, it is possible to increase their composting rate and produce quality compost. The aim of this study was to isolate, identify and determine the efficacy of cellulolytic and ligninolytic bacteria and fungi.

Materials and Methods: Samples were taken from semi-rotten tissues of trees, organic matter including compost, vermicompost, animal manure, animal samples such as termites, earthworms, amur fish and commercial samples containing bioactivators. In order to isolate bacterial and fungal isolates with the ability to produce cellulose and ligninase enzymes, after preparing a series of dilutions from the extracts of each sample, culture was performed on common culture media. After purification of bacteria and fungi, the efficiency in terms of cellulase and ligninase activity was determined by measuring the diameter of the transparent halo on specific culture media. Molecular identification of selected bacterial and fungal isolates was performed by amplification of 16S rDNA region and ITS1-5.8S-ITS2 region, respectively.

Results: A total of 83 bacterial isolates and 18 fungal isolates capable of producing cellulase were identified. BB12 and CCB9 isolates showed the highest cellulase activity with a ratio of halo diameter to colony diameter of 9.5 and 7.5, respectively. In fungal isolates, the highest cellulolytic activity was related to WF2 and WF4 isolates; the ratio of halo diameter to colony diameter in each of these two isolates was 4.57 and 2.4, respectively. Regarding ligninolytic activity, it was found that Chapak culture medium containing one gram of methyl blue is the best medium to study ligninolytic activity and the highest ratio of halo diameter to colony diameter in Chapak medium was in WB6 and WB5 bacterial isolates, respectively in the amount of 10 and 7. In fungal isolates, ligninolytic activity was observed only in WF2 and WF4 isolates; So that the ratio of halo diameter to colony diameter was 2.17 and 2, respectively. The results of molecular identification showed that the selected bacterial isolates were most similar to *Bacillus halotolerans*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus*

amyloliquefaciens, *Bacillus circulans*, *Bacillus sercatus*, *Bacillus* sp. The fungi were more similar to *Penicillium corylophilum* and *Pseudogymnoascus pannorum*. The maximum parsimony tree with 1000 bootstrap replications showed that bacterial and fungal isolates were located in 9 and 2 clades, respectively.

Conclusion: Examination of cellulolytic activity showed that *Bacillus amyloliquefaciens* showed the highest amount of cellulolytic activity and the highest ligninolytic activity was seen in *Serratia marcescens*. In fungal isolates, the highest cellulolytic and ligninolytic activities were observed in *Penicillium corylophilum* and *Pseudogymnoascus pannorum*. Based on the results of this study, further investigation is suggested about the possibility of using a combination of selected microorganisms to prepare initial formulations for faster conversion of agricultural waste into compost.

Cite this article: Kari Dolatabad, Hossein, Saffari, Hossein, Rahmati, Mitra. 2022. Isolation and identification of some bacterial and fungal isolates based on qualitative test of cellulase and ligninase activity from different sources. *Journal of Soil Management and Sustainable*, 11 (4), 141-159.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejsms.2022.18865.2014

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

جداسازی و شناسایی برخی جدایه‌های باکتریایی و قارچی بر اساس آزمون کیفی فعالیت سلولازی و لیگنینازی از منابع مختلف

حسین کاری دولت‌آباد*^۱ | حسین صفاری^۲ | میترا رحمتی^۳

۱. نویسنده مسئول، استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: h.kari@areeo.ac.ir
۲. استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: hosaffary@yahoo.com
۳. استادیار مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: m.rahmati@areeo.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: برجای ماندن بقایای کشاورزی به‌ویژه ضایعات خشبی و مقاوم به تجزیه و زمان‌بر بودن کمپوست شدن این بقایا، اهمیت استفاده از ریزجانداران تجزیه‌کننده به عنوان فعال‌کننده زیستی را نشان می‌دهد. با تلقیح ریزجانداران به بقایای کشاورزی سخت تجزیه‌شونده، می‌توان سرعت کمپوست شدن آن‌ها را افزایش داد و کمپوستی با کیفیت تولید نمود. هدف از این پژوهش جداسازی، شناسایی و تعیین کارایی انواع باکتری‌ها و قارچ‌های سلولولیتیک و لیگنینولیتیک بود.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵	
واژه‌های کلیدی: باکتری، بقایای کشاورزی، سلولاز، قارچ، لیگنیناز	مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از بافت‌های نیمه پوسیده درختان، مواد آلی شامل کمپوست، ورمی‌کمپوست، کود حیوانی، نمونه‌های جانوری مانند موربانه، کرم خاکی، ماهی‌آمور و نمونه‌های تجاری حاوی فعال‌کننده زیستی انجام شد. به منظور جداسازی جدایه‌های باکتری و قارچ با توانایی تولید آنزیم‌های سلولازی و لیگنینازی، بعد از تهیه سری رقت از عصاره‌های هر یک از نمونه‌ها، کشت روی محیط‌های کشت عمومی انجام شد. پس از خالص‌سازی انواع باکتری و قارچ، کارایی از نظر فعالیت سلولازی و لیگنینازی به روش اندازه‌گیری قطر هاله شفاف روی محیط‌های کشت اختصاصی تعیین شد. شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب باکتری و قارچی به ترتیب با تکثیر ناحیه 16S rDNA و ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 انجام شد.
	یافته‌ها: در مجموع ۸۳ جدایه باکتری و ۱۸ جدایه قارچی با قابلیت تولید سلولاز مشخص گردیدند. جدایه‌های باکتری WB12 و CCB9 به ترتیب با نسبت قطر هاله به قطر کلنی ۹/۵ و ۷/۵ بیش‌ترین میزان فعالیت سلولازی را نشان دادند. در جدایه‌های قارچی بیش‌ترین فعالیت سلولولیتیکی مربوط به جدایه‌های WF2 و WF4 بود؛ به طوری‌که نسبت قطر هاله به قطر کلنی

در هر یک از این دو جدایه به ترتیب ۴/۲ و ۵۷/۴ بود. در مورد فعالیت لیگنینولیتیکی مشخص گردید که محیط کشت چاپک حاوی متیل بلو به میزان یک گرم بهترین محیط جهت بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی می باشد و بیشترین نسبت قطر هاله به قطر کلنی در محیط چاپک به ترتیب در جدایه های باکتری WB6 و WB5 و به میزان ۱۰ و ۷ مشاهده گردید. در جدایه های قارچی فعالیت لیگنینولیتیکی فقط در دو جدایه WF2 و WF4 مشاهده شد؛ به طوری که نسبت قطر هاله به قطر کلنی به ترتیب ۱۷/۲ و ۲ بود. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که جدایه های منتخب باکتری بیشترین تشابه را به *Bacillus halotolerans* *Bacillus atrophaeus* *Bacillus subtilis* *Bacillus paralicheniformis* *Bacillus siamensis* *Citrobacter amalonaticus* *Bacillus* sp. *Bacillus circulans* *Bacillus amyloliquefaciens* *Serratia marcescens* و جدایه های منتخب قارچی همانندی بیشتری به گونه های *Penicillium corylophilum* و *Pseudogymnoascus pannorum* داشتند. درخت تبارزایی بیشینه صرفه جویی با اعتبارسنجی بوت استرپ ۱۰۰۰ نشان داد که جدایه های باکتری و قارچی به ترتیب در نه و دو کلاد قرار گرفتند.

نتیجه گیری: بررسی میزان فعالیت سلولولیتیکی نشان داد که باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* بیشترین میزان فعالیت سلولولیتیکی را داشت و بیشترین فعالیت لیگنینولیتیکی نیز در باکتری *Serratia marcescens* به دست آمد. در جدایه های قارچی بیشترین فعالیت سلولولیتیکی و لیگنینولیتیکی در جدایه های *Penicillium corylophilum* و *Pseudogymnoascus pannorum* مشاهده گردید. بر اساس نتایج این پژوهش، پیشنهاد می شود که امکان استفاده از ترکیب ریزجانداران منتخب، جهت تهیه فرمولاسیون های اولیه برای تبدیل سریع تر ضایعات کشاورزی به کمپوست مورد بررسی قرار بگیرد.

استناد: کاری دولت آباد، حسین، صفاری، حسین، رحمتی، میترا (۱۴۰۰). جداسازی و شناسایی برخی جدایه های باکتریایی و قارچی بر اساس آزمون کیفی فعالیت سلولولیتی و لیگنینازی از منابع مختلف. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۱۱ (۴)، ۱۵۹-۱۴۱.

DOI: 10.22069/ejsms.2022.18865.2014



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

ضایعات آلی به دلیل تأثیر بر حاصلخیزی خاک و بهبود و اصلاح مشخصات فیزیکی آن می‌تواند به طور مستقیم به خاک اضافه شود. با وجود این، عدم مدیریت بقایای خام محصولات کشاورزی که ممکن است حاوی ریزجانداران بیماریزا و آلاینده‌های آلی و غیر آلی بوده یا ممکن است مواد آلی ناپایدار تولید کنند، می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست داشته باشد (۱۲). بنابراین، بهره‌گیری از کمپوست‌سازی و فرآیند تجزیه زیستی مواد آلی می‌تواند چنین خطراتی را به دلیل تغییر شرایط زیستی و فیزیکوشیمیایی کاهش داده و حتی از بین ببرد. زیرا، بالا رفتن درجه حرارت ناشی از افزایش فعالیت زیستی، منجر به از بین رفتن بیمارگرها و در نهایت تغییر و تبدیل مواد آلی به مواد هیومیک می‌شود (۴).

ترکیبات لیگنینوسلولزی شامل سلولز (۳۵-۵۰ درصد)، لیگنین (۲۵-۳۵ درصد) و همی سلولز (۲۰-۳۰ درصد) هستند. بهبود و ارتقا توده میکروبی و آنزیمی جهت تجزیه بهتر توده‌های لیگنینوسلولزی یکی از زمینه‌های کاربردی مهم در کشاورزی پایدار محسوب می‌شود (۲۱).

در شرایط طبیعی، توده‌های لیگنینوسلولزی، به‌وسیله ریزجانداران مختلف به‌خصوص گونه‌های مختلف قارچی و باکتریایی با قابلیت تولید آنزیم‌های سلولولیتیک، همی سلولولیتیک و لیگنینولیتیک، تجزیه می‌شوند و پژوهش‌ها نشان داده است که فعالیت میکروبی نقش اساسی و شاخص بر تغییرات صورت گرفته در طی فرایندهای هومیفیکاسیون دارد. بنابراین توانایی ریزجانداران در تجزیه لیگنوسلولز عامل کلیدی در بازیافت ضایعات، به‌ویژه در فرآیند کمپوست‌سازی است. تلقیح با ریزجانداران مفید تجزیه زیستی مواد آلی را فعال می‌کند و خصوصیات نهایی کمپوست را بهبود می‌بخشد (۳ و ۸).

زای و همکاران (۲۰۰۵) روشی را برای بهبود کارایی کمپوست توسط تلقیح با مایه تلقیح A حاوی باکتری‌های *Bacillus azotofixans*، *Bacillus megaterium* و *Bacillus mucilaginosus*، مایه تلقیح B ترکیبی از گونه‌های *Trichoderma koningii* و *Streptomyces cellulosa* و مایه تلقیح C ترکیبی از مایه تلقیح A و B مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که مایه تلقیح‌های B و C به‌طور قابل توجهی توانستند فرآیند کمپوست‌سازی را پایدار نمایند. به‌خصوص مایه تلقیح C که حاوی گونه‌های باسیلوس و گونه‌های قارچی بود در تسریع سرعت تجزیه، کاهش انتشار گازهای بد بو و تثبیت و پایداری محصولات کمپوست بسیار مؤثر شناخته شد (۲۲). چن و استملر (۲۰۰۶) نشان دادند که تلقیح ریزجانداران سلولولیتیک و مقاوم به گرما در توده کمپوست می‌تواند منجر به تجزیه سریع و بهبود کیفیت کمپوست شده و زمان بلوغ آن را کاهش دهد (۲). وارگاس گارسیا و همکاران (۲۰۰۷) بر اساس مطالعه خود نشان دادند که تغییر شکل زیستی مواد آلی فرآیند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل مختلفی می‌باشد که در میان آن‌ها فعالیت میکروبی یکی از مهم‌ترین عوامل است. ترکیب کردن ریزجانداران با توانایی مختلف، تجزیه لیگنوسلولز و فرآیند هومیفیکاسیون را افزایش می‌دهد که نتیجه آن پیشرفت سریع‌تر فرآیند و یا کمپوستی با کیفیت بالاتر است. از طرف دیگر کارایی مایه تلقیح در فرآیند کمپوست‌سازی به شرایطی که فرآیند در آن اتفاق می‌افتد از جمله ماده خام و ماهیت مایه تلقیح بستگی دارد (۱۹). بنابراین هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌های با توانایی فعالیت لیگنینوسلولولیتیکی از منابع مختلف بود تا در نهایت بتوان از این ریزجانداران به عنوان مایه تلقیح جهت تجزیه ضایعات کشاورزی و تسریع در فرآیند کمپوست‌سازی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این پژوهش به منظور جداسازی و ارزیابی فعالیت سلولولیتیک و لیگنینولیتیک جدایه‌های بومی، نمونه‌برداری از بافت‌های نیمه پوسیده درختان، انواع مواد آلی شامل کمپوست‌ها، ورمی‌کمپوست‌ها، کود حیوانی، نمونه‌های جانوری مانند موربانه، کرم خاکی، ماهی‌آمور و نمونه‌های تجاری حاوی فعال کننده زیستی انجام شد. نمونه‌های تجاری از آزمایشگاه تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد.

نمونه‌های جامد مذکور پس از خشک شدن در معرض هوا در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. با توجه به احتمال وجود ریزجانداران سلولولیتیک در سیستم گوارشی موربانه، کرم خاکی و ماهی‌آمور، بخش دستگاه گوارش آنها پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه با ابزار مناسب جدا و به ظروف حاوی سرم نمکی سترون (کلرید سدیم ۸ گرم در لیتر، کلرید پتاسیم ۰/۲ گرم در لیتر، دی سدیم فسفات ۱/۴۴ گرم در لیتر و مونو پتاسیم فسفات، ۰/۲۴ گرم در لیتر) منتقل شد (۹، ۱۴ و ۱۶). سری‌های رقت دهدهی از هر یک از نمونه‌ها تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی سطح پتری‌های حاوی محیط کشت مغذی^۱ حاوی سیکلوهمگزامید جهت جداسازی جدایه‌های باکتری و محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار^۲ حاوی استرپتومایسین جهت جداسازی جدایه‌های قارچی پخش و به مدت حداقل ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و به مدت ۱۵ الی ۳۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای قارچ‌ها گرم‌گذاری شدند. پتری‌ها به صورت مرتب و روزانه بازبینی و خالص سازی جدایه‌ها صورت گرفت.

سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی سلولز جدایه‌ها: به منظور ارزیابی فعالیت سلولولیتیک (توان تجزیه سلولز)، محیط کشت‌های BHM^۳ (Carboxymethyl cellulose، ۱۰؛ KH₂PO₄، ۱؛ MgSO₄.7H₂O، ۰/۲؛ NH₄NO₃، ۱؛ FeCl₃.6H₂O، ۰/۰۵؛ CaCl₂، ۰/۰۲؛ K₂HPO₄، ۱ و Agar، ۱۵ گرم در لیتر) و BSM^۴ (Carboxymethyl cellulose، ۷/۵؛ KH₂PO₄، ۱؛ MgSO₄.7H₂O، ۲؛ NaNO₃، ۲؛ KCl، ۰/۵؛ Protease pepton، ۰/۵ و Agar، ۱۵ گرم در لیتر) استفاده گردید. هر یک از جدایه‌های خالص باکتری به صورت نقطه‌ای در وسط پتری‌ها کشت و حداقل به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری صورت گرفت. در جدایه قارچی یک قرص میسلیمی سه میلی‌متری در وسط پتری‌ها قرار گرفت و گرم‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس صورت پذیرفت. در محیط کشت BHM، برای مشاهده هاله ابتدا سطح پتری‌های حاوی کلنی را با محلول ۰/۳ درصد کنگورد غوطه‌ور کرده و پس از ۲۰ دقیقه محلول کنگورد اضافی باقی‌مانده در سطح پتری‌ها تخلیه و با محلول یک مولار کلرید سدیم جایگزین شد (۱۷). در محیط کشت BSM، سطح پتری‌های حاوی کلنی با آبودین غوطه‌ور گردید (۱۰). جدایه‌های دارای هاله شفاف در اطراف کلنی به عنوان جدایه‌های مثبت انتخاب شدند. از بین دو محیط کشت، بهترین محیط کشت انتخاب و نسبت قطر هاله به قطر کلنی که شاخصی از تولید آنزیم سلولاز است با خط کش دقیق اندازه‌گیری و یادداشت شد.

سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی لیگنین جدایه‌ها: به منظور ارزیابی فعالیت لیگنینولیتیک (توان تجزیه لیگنین)، محیط کشت چاپک (NH₄NO₃، ۵؛ KH₂PO₄، ۰/۵۳؛ K₂HPO₄، ۴/۵۵؛ MgSO₄.7H₂O، ۰/۵؛

3- Bushnell Hass Medium

4- Basal Salt Medium

1- Nutrient agar

2- Potato dextrose agar

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ناحیه 16S rDNA در این واکنش شامل: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه و برنامه حرارتی شامل ۳۰ چرخه ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه استفاده گردید که در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 شامل واسرشت‌سازی اولیه چهار دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل ۶۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه سلسیوس، توسعه ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه صورت پذیرفت که در این مرحله به ترتیب قطعه‌هایی به طول تقریبی ۶۰۰ باز تکثیر شدند.

محصولات تکثیرشده مربوط به ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 پنج جدایه قارچی و ناحیه 16S rDNA ۱۲ جدایه باکتری جهت خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی از طریق شرکت تکاپوزیست تهران به شرکت بایونیر^۱ کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI V.10 اصلاح شد و سپس توالی به دست آمده با توجه به جنس و جدایه با استفاده از ابزار جستجوی Blast در پایگاه‌های NCBI و EzTaxon با توالی‌های موجود مقایسه شدند (۱).

Yeast extract، ۰/۱؛ Agar، ۱۵ گرم در لیتر و Glycerol، ۴۰ میلی مولار) تهیه گردید. در ابتدا و برای مشاهده فعالیت لیگنینولیتیکی از سه ترکیب متیل بلو، تریپان بلو و کنگورد به میزان‌های ۰/۰۷۵ و یک گرم به صورت مجزا و ترکیبی ضمن تهیه محیط کشت چاپک استفاده گردید و هر یک از جدایه‌های خالص در وسط پتری‌ها کشت و حداقل به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و ۲۸ درجه سلسیوس برای قارچ‌ها قرار داده شد و در ادامه بهترین رنگ و میزان ترکیب انتخاب گردید. جدایه‌های دارای هاله شفاف در اطراف کلنی به عنوان جدایه‌های مثبت انتخاب شدند. نسبت قطر هاله به قطر کلنی که شاخصی از تولید آنزیم لیگنیناز است با خط کش دقیق اندازه‌گیری و یادداشت شد (۶ و ۱۳).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب باکتری و قارچ: به منظور استخراج DNA ژنومی جدایه‌های منتخب باکتری و قارچی از کیت استخراج DNA تکثیر ناحیه 16S rDNA از rDNA هسته‌ای در جدایه‌های منتخب باکتری، از ترکیب آغازگرهای 27F به همراه 1492R به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها به ترتیب 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' بود (۷). برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای در جدایه‌های قارچی منتخب، از ترکیب آغازگرهای ITS1 به همراه ITS4 به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها به ترتیب 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' بود (۲۰).

به منظور بررسی ارتباط تبارزایی گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش و بررسی آرایه‌هایی که توالی‌های مشابه آن‌ها از بانک ژن اخذ شده بودند، هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از ابزار Clustal W موجود در نرم‌افزار MEGA نسخه ۶ انجام شد (۱۵). درخت تبارزایی بیشینه صرفه‌جویی^۱ با استفاده از الگوهای از پیش تعیین شده نرم‌افزار MEGA ترسیم گردید. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در شجره‌های حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی بوت‌استرپ^۲ با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید. در نهایت و پس از شناسایی جدایه‌های قارچی و باکتریایی، توالی نواحی ژنی ITS و 16S rDNA همه آن‌ها در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ثبت و شماره دسترسی برای هر یک از آن‌ها به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری R انجام شد. هم‌چنین برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

پس از جداسازی جدایه‌های باکتری و قارچی روی محیط‌های کشت عمومی و غربالگری اولیه بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی‌ها، غربالگری جدایه‌های سلولولیتیک بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله شفاف اطراف کلنی در محیط‌های کشت اختصاصی BHM و BSM صورت پذیرفت. در مجموع ۸۳ جدایه باکتری و ۱۸ جدایه قارچی با قابلیت تولید سلولاز مشخص گردیدند که مشخصات جدایه‌ها در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است.

مقایسه دو محیط کشت BSM و BHM نشان داد، استفاده از محیط کشت BSM با آلودین،

1- Maximum-Parsimony
2- Bootstrap

نشان‌دهنده بهتر هاله و محیط مناسب‌تری برای بررسی فعالیت سلولولیتیکی می‌باشد. برای بررسی فعالیت سلولولیتیکی نسبت قطر هاله به کلنی روی محیط کشت BSM اندازه‌گیری شد که در جدایه‌های باکتری بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی به ترتیب مربوط به WB12، CCB9، WB4، EWB6، TB9، CB8 و SB8 به میزان ۹/۵، ۷/۵، ۷، ۶/۷۵، ۶/۵، ۶ و ۶ بود (جدول ۱، شکل ۱). در جدایه‌های قارچی بیش‌ترین فعالیت سلولولیتیکی متعلق به جدایه‌های WF2، WF4، VCF1، CF4 و SF1 بود. نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مذکور به ترتیب ۶/۵۷، ۲/۴، ۱/۸۲ و ۱/۷۸ و ۱/۷ بود (جدول ۲، شکل ۱).

روینا و همکاران (۲۰۱۳) به‌منظور بررسی فعالیت سلولولیتیکی قارچ *Trichoderma harzianum* از محیط کشت BSM حاوی کربوکسی متیل سلولز استفاده کردند و مشخص گردید که غوطه‌ورسازی محیط کشت با آلودین، نشان‌دهنده فعالیت سلولولیتیکی ریزجانداران است که مشابه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش است (۱۰). همتی و همکاران (۲۰۱۸) مشابه این پژوهش از محیط کشت BHM حاوی کربوکسی متیل سلولز برای بررسی فعالیت سلولولیتیکی جدایه‌های باکتری جدا شده از کمپوست و خاک استفاده کردند و به منظور مشاهده تشکیل هاله، از کنگورد ۰/۳ درصد و محلول یک مولار کلرید سدیم استفاده کردند. آن‌ها از این روش به‌عنوان یک روش مناسب برای بررسی فعالیت سلولولیتیکی استفاده کردند (۶).

جدایه‌هایی که فعالیت سلولولیتیکی نشان دادند به‌منظور بررسی فعالیت لیگنینازی انتخاب شدند. در این مطالعه، فعالیت لیگنینولیتیکی با استفاده از سه رنگ متیل بلو، تریپان بلو و کنگورد و با مقادیر ۰/۰۷۵ و یک گرم ارزیابی شد و مشخص گردید محیط کشت چاپک حاوی متیل بلو به میزان یک گرم بهترین

مشخص شد که رنگ‌های کنگورد، متیل رد، تریپان بلو، بنگال رز و فلوکسین سریع‌تر از سایر رنگ‌ها فعالیت لیگنینولیتیکی را نشان دادند (۱۳). تینگ و همکاران (۲۰۱۳) از رنگ رمازول بریلیانت بلو- آر برای بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی باکتری *Ureibacillus terrenus* استفاده کردند (۱۸). همتی و همکاران (۲۰۱۸) برای دستیابی به باکتری‌های لیگنینوسلولولیتیکی مشابه روش‌های استفاده شده در این پژوهش تعداد زیادی جدایه باکتری بومی از خاک‌های مختلف و کمپوست جدا کردند و دریافتند که باکتری‌های ترموفیل توانایی بیش‌تری در تجزیه بقایای آلی دارند. آن‌ها از رنگ کنگورد برای بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی استفاده کردند که مشخص گردید رنگ متیل بلو رنگ مناسب‌تری برای بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی است (۶).

محیط جهت بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی است. بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی به‌ترتیب در جدایه‌های باکتری WB3، WB12، WB5، WB6، CCB3 و MB3 به میزان ۱۰، ۷، ۷، ۶، ۷ و ۵/۶۷ مشاهده گردید (جدول ۱). در جدایه‌های قارچی بیش‌ترین فعالیت لیگنینولیتیکی فقط در دو جدایه WF2 و WF4 مشاهده شد به‌طوری‌که نسبت قطر هاله به کلنی به ترتیب ۲/۱۷ و ۲ مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۱).

ساپارات و همکاران (۲۰۰۸) از ۱۲ رنگ کنگورد، متیل رد، تریپان بلو، متیلن بلو بی، نوترال رد، تولوئیدن بلو، بنگال رز، اتوزین وای، فلوکسین، بریلیانت گرین، کریستال ویولت و فوشین به میزان ۰/۰۱ درصد برای بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی قارچ *Grammothele subargentea* استفاده کردند و

جدول ۱- محل جداسازی و سنجش قدرت فعالیت سلولولیتیکی و لیگنینولیتیکی جدایه‌های باکتری.

Table 1. Isolation and measurement of cellulolytic and ligninolytic activity of bacterial isolates.

فعالیت لیگنینولیتیکی Ligninolytic activity	فعالیت سلولولیتیکی cellulolytic activity	کد جدایه‌های باکتری Code of bacterial isolates	محل جداسازی Isolation place	ردیف No.
نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio	نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio			
۲/۲۷ lmnop	۵/۸۰ defg	VCB1		۱
۰ r	۲/۳۳ yzABCDE	VCB2		۲
۰ r	۲/۵۰ wxyzABCD	VCB3	ورمی کمپوست	۳
۴/۷۶ efg	۲/۹۲ stuvwxyZA	VCB4		۴
۲/۱۴ mnopq	۲/۶۲ uvwxyzABCD	VCB5		۵
۲/۵۴ jklmn	۴/۱۳ jklmnopqr	CB1		۶
۳ jklm	۲/۸۳ stuvwxyZAB	CB2		۷
۱/۹۲ nopq	۵/۸ defg	CB3		۸
۱/۵ pq	۳/۲۵ pqrstuvwxyz	CB4		۹
۴/۲۵ efgh	۳/۸ mnopqrstu	CB5		۱۰
۱/۸۸ nopq	۲/۵ wxyzABCD	CB6		۱۱
۲/۵ klmno	۲/۵۴ wxyzABCD	CB7	کمپوست	۱۲
۰ r	۶ cdef	CB8		۱۳
۰ r	۳ rstuvwxyz	CB9		۱۴
۱/۵۹ pq	۴/۲۵ ijklmnopq	CB10		۱۵
۲/۱۴ mnopq	۴/۲۹ ijklmnopq	CB11		۱۶
۱/۵ pq	۴/۳۸ ijklmnop	CB12		۱۷

ادامه جدول ۱-

Continue Table 1.

فعالیت لیگنولیتیکی Ligninolytic activity	فعالیت سلولولیتیکی cellulolytic activity	کد جدایه‌های باکتری Code of bacterial isolates	محل جداسازی Isolation place	ردیف No.
نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio	نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio			
. r	۲/۸ tuvwxzyAB	MB1	کود آلی	۱۸
. r	۵/۲۹ fghij	MB2		۱۹
۵/۶۷ cd	۳/۵ opqrstvwxy	MB3		۲۰
۱/۵۹ pq	۲/۵۶ wxyzABCD	MB4		۲۱
۴/۰۵ fghi	۳/۳ pqrstvwxy	MB5		۲۲
۱/۶ pq	۳/۵۷ nopqrstvwxy	MB6		۲۳
۲/۵ klmno	۵/۱۷ fghijk	MB7		۲۴
۲ nopq	۵/۳۳ efghi	CCB1	کلکسیون مؤسسه تحقیقات خاک و آب	۲۵
۴/۳۳ efg	۵/۶۷ defgh	CCB2		۲۶
۶ c	۴/۷۱ ghijklmn	CCB3		۲۷
۳/۱۳ jkl	۲/۵۴ wxyzABCD	CCB4		۲۸
۱/۶۹ nopq	۳/۷۵ mnpqrstuv	CCB5		۲۹
۴/۳۳ efg	۱/۴۳ DE	CCB6		۳۰
۳/۴ hij	۱/۶ CDE	CCB7		۳۱
۴/۸۷ def	۳/۲ pqrstvwxy	CCB8		۳۲
۱/۶۷ opq	۷/۵ b	CCB9		۳۳
۱/۳۳ q	۵ fghijkl	CCB10		۳۴
۱/۶۳ pq	۵ fghijkl	CCB11		۳۵
۲/۵ klmno	۵ fghijkl	CCB12		۳۶
۴/۳۳ efg	۳/۱۳ qrstvwxyz	CCB13		۳۷
۱/۸۵ nopq	۳/۸ mnpqrstu	CCB14		۳۸
۱/۲۸ q	۳/۳۳ pqrstvwxy	CCB15		۳۹
. r	۳/۵۷ nopqrstvwxy	CCB16		۴۰
۱/۸۸ nopq	۵/۸ defg	CCB17		۴۱
۱/۸۸ nopq	۳/۵۶ nopqrstvwxy	SB1	خاک نخلستان بهبهان	۴۲
۲/۵ klmno	۳/۶۳ nopqrstvwxy	SB2		۴۳
۲/۵ klmno	۴/۵۷ hijklmno	SB3		۴۴
۱/۵ pq	۲/۸۲ stvwxyzAB	SB4		۴۵
. r	۲/۶ vwxyzABCD	SB5		۴۶
۴/۹۴ de	۳/۲۷ pqrstvwxy	SB6		۴۷
۲ nopq	۵ fghijkl	SB7		۴۸
۲/۱۴ mnpq	۶ cdef	SB8		۴۹
۴/۷۲ efg	۳/۵ opqrstvwxy	SB9		۵۰
. r	۲/۵ wxyzABCD	SB10		۵۱
۱/۷۵ nopq	۴/۸۳ fghijklm	SB11		۵۲
۱/۴۷ pq	۳ rstvwxyz	SB12		۵۳

ادامه جدول ۱ -

Continue Table 1.

فعالیت لیگنولیتیکی Ligninolytic activity	فعالیت سلولولیتیکی cellulolytic activity	کد جدایه‌های باکتری Code of bacterial isolates	محل جداسازی Isolation place	ردیف No.
نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio	نسبت قطر هاله به کلنی Halo to colony diameter ratio			
. r	۳/۱۸ ^{qrstuvwxyz}	TB1		۵۴
. r	۱/۸۳ ^{ABCDE}	TB2		۵۵
. r	۴/۱۱ ^{ijklmnopqr}	TB3		۵۶
۴/۲۵ ^{efgh}	۳/۶ ^{nopqrstuvwxyz}	TB4		۵۷
۱/۶۷ ^{opq}	۵/۸ ^{defg}	TB5	موریانه	۵۸
۱/۶ ^{pq}	۳/۲۷ ^{pqrstuvwxyz}	TB6		۵۹
. r	۳/۵ ^{opqrstuvwxyz}	TB7		۶۰
۱/۶۳ ^{pq}	۵/۸ ^{defg}	TB8		۶۱
۲ ^{nopq}	۶/۵ ^{bcde}	TB9		۶۲
۲ ^{nopq}	۱/۵ ^{DE}	WB1		۶۳
. r	۳/۸۶ ^{lmnopqrst}	WB2		۶۴
۱/۴ ^q	۴/۶۷ ^{ghijklmno}	WB3		۶۵
۲ ^{nopq}	۷ ^{bc}	WB4		۶۶
۷ ^b	۴/۱۴ ^{ijklmnopqr}	WB5		۶۷
۱۰ ^a	۳/۵ ^{opqrstuvwxyz}	WB6	جنگل سی سنگان	۶۸
۴/۷۵ ^{efg}	۳ ^{rstuvwxyz}	WB7	نوشهر	۶۹
۳/۳۳ ^{ijk}	۲/۹۱ ^{stuvwxyzA}	WB8		۷۰
۴/۲۵ ^{efgh}	۱/۷۶ ^{ABCDE}	WB9		۷۱
. r	۳/۶۷ ^{mnopqrstuvw}	WB10		۷۲
۱/۴۱ ^{pq}	۱/۶۷ ^{BCDE}	WB11		۷۳
۷ ^b	۹/۵ ^a	WB12		۷۴
۴ ^{ghi}	۲/۷۵ ^{tuvwxyzABC}	FB1		۷۵
. r	۳/۳۳ ^{pqrstuvwxyz}	FB2	ماهی آمور	۷۶
۷ ^b	۴ ^{klmnopqrs}	FB3		۷۷
. r	۱/۲ ^E	EWB1		۷۸
۱/۳۲ ^q	۲/۴۴ ^{xyzABCD}	EWB2		۷۹
۱/۶۷ ^{opq}	۱/۶ ^{CDE}	EWB3		۸۰
. r	۲ ^{zABCDE}	EWB4	کرم خاکی	۸۱
. r	۳ ^{rstuvwxyz}	EWB5		۸۲
. r	۶/۷۵ ^{bcd}	EWB6		۸۳

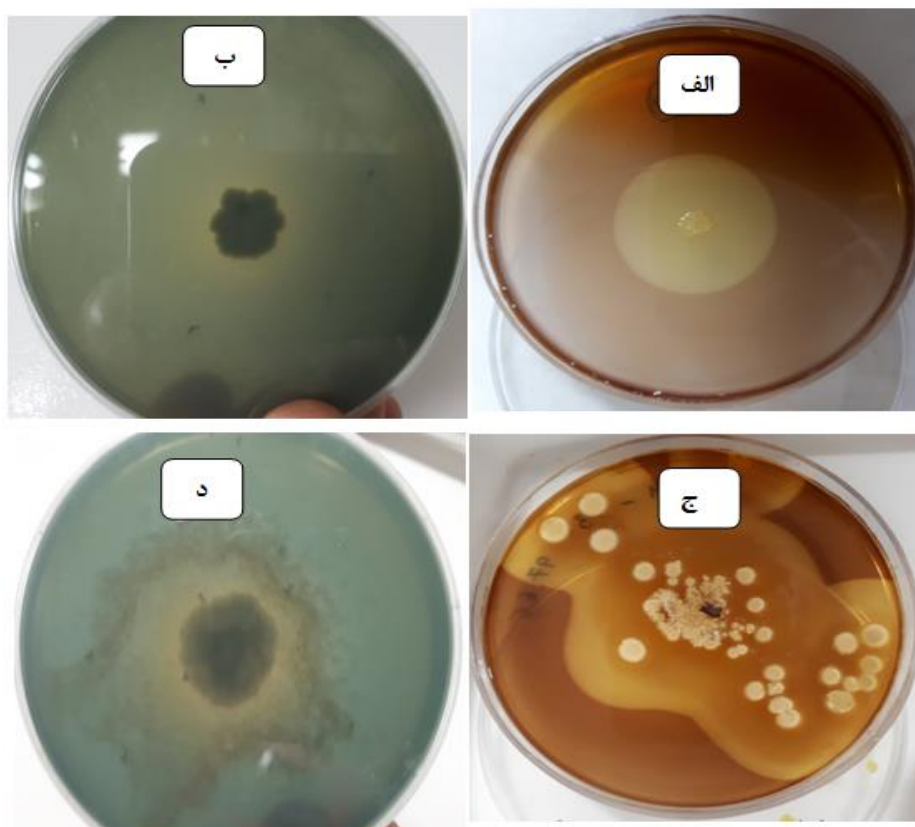
اعداد دارای حروف متفاوت در هرستون دارای اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.
Values followed by different letters within columns are significantly different using Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

جدول ۲- محل جداسازی و سنجش قدرت فعالیت سلولولیتیکی و لیگنینولیتیکی جدایه‌های قارچی.

Table 2. Isolation and measurement of cellulolytic and ligninolytic activity of fungal isolates.

فعالیت لیگنینولیتیکی Ligninolytic activity	فعالیت سلولولیتیکی cellulolytic activity	کد جدایه‌های قارچی Code of fungal isolates	محل جداسازی Isolation place	ردیف No.
نسبت قطراله به کلنی Halo to colony diameter ratio	نسبت قطراله به کلنی Halo to colony diameter ratio			
. b	۱/۷ ^{bc}	SF1	خاک نخلستان بهبهان	۱
. b	۱/۰۶ ^c	SF2		۲
. b	۱/۰۳ ^c	WF1	جنگل سی سنگان نوشهر	۳
۲/۱۷ ^a	۴/۵۷ ^a	WF2		۴
. b	۱/۳۱ ^c	WF3		۵
۲ ^a	۲/۴۰ ^b	WF4		۶
. b	۱/۰۳ ^c	CF1	کمپوست	۷
. b	۱/۰۹ ^c	CF2		۸
. b	۱/۱۳ ^c	CF3		۹
. b	۱/۷۸ ^{bc}	CF4		۱۰
. b	۱/۸۷ ^{bc}	VCF1	ورمی کمپوست	۱۱
. b	۱/۰۸ ^c	VCF2		۱۲
. b	۱/۰۷ ^c	VCF3		۱۳
. b	۱/۱۲ ^c	MF1	کود آلی	۱۴
. b	۱/۲۰ ^c	MF2		۱۵
. b	۱/۰۴ ^c	MF3		۱۶
. b	۱/۰۸ ^c	MF4		۱۷
. b	۱/۱۰ ^c	MF5		۱۸

اعداد دارای حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.
Values followed by different letters within columns are significantly different using Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).



شکل ۱- هاله شفاف تشکیل شده اطراف کلنی جدایه‌های باکتری و قارچی. الف) فعالیت سلولولیتیکی جدایه باکتری TB9. ب) فعالیت لیگنینولیتیکی جدایه باکتری CCB5. ج) فعالیت سلولولیتیکی جدایه قارچی WF2. د) فعالیت لیگنینولیتیکی جدایه قارچی WF4.

Figure 1. Clear halo formed around the colony of bacterial and fungal isolates.
A) Cellulolytic activity of bacterial isolate TB9. B) Ligninolytic activity of bacterial isolate CCB5.
C) Cellulolytic activity of fungal isolate WF2. D) Ligninolytic activity of fungal isolate WF4.

جدایه‌هایی که بیشترین فعالیت سلولولیتیکی و لیگنینولیتیکی را بر اساس نسبت قطر هاله به کلنی داشتند با روش مولکولی شناسایی شدند. بر اساس فعالیت سلولولیتیکی جدایه‌های باکتری CB8، CCB9، WB12، WB4، TB9، SB8، EWB6 و WB12 با نسبت‌های بیشتر از عدد شش قطر هاله به کلنی و بر اساس فعالیت لیگنینولیتیکی جدایه‌های باکتری CCB3، MB3، WB12، FB3، WB5 و WB6 با نسبت‌های بیشتر از عدد پنج قطر هاله به کلنی انتخاب گردیدند. در مورد جدایه‌های قارچی به دلیل این‌که تنها دو جدایه قارچی WF2 و WF4 فعالیت

لیگنینولیتیکی داشتند و همچنین میزان فعالیت سلولولیتیکی آن‌ها بیش‌تر از بقیه جدایه‌های قارچی بود جهت شناسایی مولکولی انتخاب گردیدند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری منتخب در جدول ۳ آمده است.

توالی‌های نوکلئوتیدی نواحی ژنی 16S rDNA و ITS1-5.8S-ITS2 مربوط به ۱۴ جدایه باکتری و قارچی به بانک ژن NCBI^A ارسال شد.

جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری منتخب.

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of selected bacterial isolates.

ایندول Indole	ژلاتیناز Gelatinase	آمیلاز Amylase	اوره‌آز Urease	کاتالاز Catalase	اکسیداز Oxidase	گرم Gram	شکل Shape	سویه باکتری Bacterial strain
-	+	+	-	+	+	+	میله‌ای	CB8 (CL-1)
-	+	+	-	+	-	+	میله‌ای	CCB3 (CL-2)
-	+	+	+	+	-	+	میله‌ای	MB3 (CL-3)
-	+	+	-	+	-	+	میله‌ای	CCB9 (CL-4)
-	+	+	-	+	-	+	میله‌ای	SB8 (CL-5)
-	+	+	-	+	+	+	میله‌ای	TB9 (CL-6)
-	+	+	+	+	-	+	میله‌ای	WB4 (CL-7)
-	+	+	-	+	+	+	میله‌ای	WB12 (CL-8)
+	-	+	-	+	-	-	میله‌ای	FB3 (CL-9)
-	+	+	+	+	-	+	میله‌ای	EWB6 (CL-10)
-	+	+	+	+	-	+	میله‌ای	WB5 (CL-11)
-	+	-	-	+	-	-	میله‌ای	WB6 (CL-12)

جدول ۴- جدایه‌های باکتری و قارچی شناسایی شده و شماره‌های دسترسی بانک مولکولی و کلکسیون مؤسسه تحقیقات خاک و آب.

Table 4. Identified bacterial and fungal isolates and accession numbers of molecular bank and Soil and Water Research Institute collection.

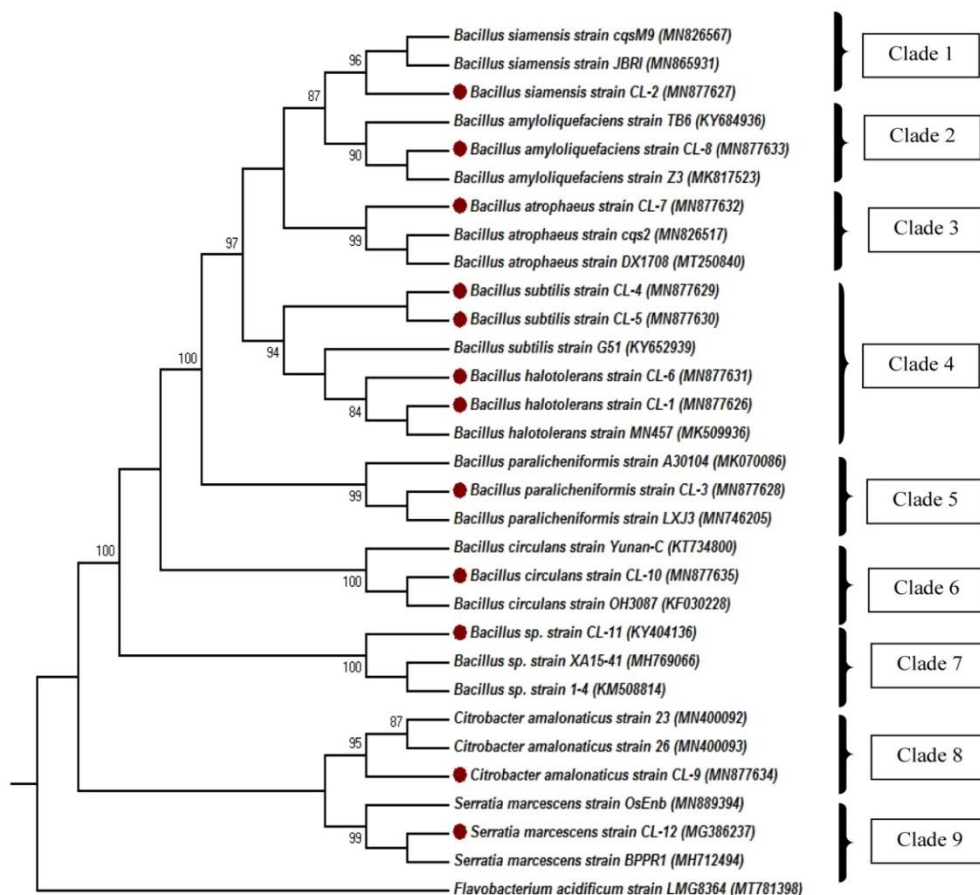
شماره دسترسی کلکسیون مؤسسه تحقیقات خاک و آب Accession numbers of Soil and Water Research Institute collection	شماره دسترسی بانک مولکولی Accession numbers of molecular bank	نام ریزجاندار Microorganism name	سویه Strain	ردیف No.
CCSM-B 00625	MN877626	<i>Bacillus halotolerans</i>	CB8 (CL-1)	۱
CCSM-B 00626	MN877627	<i>Bacillus siamensis</i>	CCB3 (CL-2)	۲
CCSM-B 00627	MN877628	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	MB3 (CL-3)	۳
CCSM-B 00628	MN877629	<i>Bacillus subtilis</i>	CCB9 (CL-4)	۴
CCSM-B 00629	MN877630	<i>Bacillus subtilis</i>	SB8 (CL-5)	۵
CCSM-B 00630	MN877631	<i>Bacillus halotolerans</i>	TB9 (CL-6)	۶
CCSM-B 00631	MN877632	<i>Bacillus atrophaeus</i>	WB4 (CL-7)	۷
CCSM-B 00632	MN877633	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	WB12 (CL-8)	۸
CCSM-B 00633	MN877634	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	FB3 (CL-9)	۹
CCSM-B 00634	MN877635	<i>Bacillus circulans</i>	EWB6 (CL-10)	۱۰
CCSM-B 00635	KY404136	<i>Bacillus</i> sp.	WB5 (CL-11)	۱۱
CCSM-B 00636	MG386237	<i>Serratia marcescens</i>	WB6 (CL-12)	۱۲
CCSM-F 00063	MN879384	<i>Penicillium corylophilum</i>	WF2 (CL-13)	۱۳
CCSM-F 00064	MN879385	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	WF4 (CL-14)	۱۴

کلاذ شماره ۱: جدایه مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه CL-2 متعلق به گونه *Bacillus siamensis* بود که با درجه اعتبارسنجی ۹۶ درصد در کنار گونه مشابه خود در بانک ژن قرار داشت. این جدایه دارای تشابه ۹۹ درصدی با گونه *B. siamensis* با شماره دسترسی MN877627 بود. کلاذ شماره ۲: جدایه مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه CL-8 متعلق به گونه *Bacillus amyloliquefaciens* با درجه اعتبارسنجی ۹۰ درصد بود. این جدایه دارای تشابه ۹۹ درصدی با گونه *B. amyloliquefaciens* با شماره دسترسی MN877633 بود. کلاذ شماره ۳: جدایه مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه CL-7 متعلق به گونه *B. atrophaeus* بود که با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد در کنار گونه‌های مشابه خود با شماره‌های دسترسی MN826517 و MT250840 در بانک ژن قرار داشت. درصد تشابه جدایه مورد بررسی با گونه‌های مشابه در بانک ژن ۱۰۰ درصد بود. کلاذ شماره ۴: جدایه‌های مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه‌های CL-1 و CL-6 متعلق به گونه *B. halotolerans* با درجه اعتبارسنجی ۸۴ درصد و جدایه‌های CL-4 و CL-5 متعلق به گونه *Bacillus subtilis* با درجه اعتبارسنجی ۹۴ درصد هستند. درصد تشابه جدایه‌های ذکر شده با گونه مشابه در بانک ژن ۱۰۰ درصد بود. کلاذ شماره ۵: جدایه مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه CL-3 متعلق به گونه *Bacillus paralicheniformis* بود که با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد در کنار گونه مشابه خود در بانک ژن قرار داشت. این جدایه دارای تشابه به میزان ۱۰۰ درصد با گونه *B. paralicheniformis* با شماره دسترسی MN746205 بود. کلاذ شماره ۶: جدایه مورد مطالعه در این کلاذ شامل جدایه CL-10 متعلق به گونه *Bacillus circulans* بود که با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد در کنار گونه‌های مشابه خود در بانک ژن قرار داشت. این جدایه دارای تشابه

اکثر گونه‌های منتخب در این پژوهش از نوع باکتری‌های گرم مثبت بودند (جدول ۴). همتی و همکاران (۲۰۱۸) برای شناسایی مولکولی باکتری‌های با فعالیت لیگنینوسلولولیتیکی از آغازگرهای عمومی 1492R و 27F جهت تکثیر ناحیه ژنومی 16S rDNA استفاده کردند که مشخص گردید شش گونه برتر گونه‌های گرم مثبت *Paenibacillus validus*، *Paenibacillus koreensis*، *Paenibacillus cellulositrophicus thailandensis*، *Bacillus nealsonii* و *Paenibacillus lautus* بودند (۶). بررسی آنزیم‌های ترشح شده توسط گونه‌های باسیلوس نشان داد که گونه‌های *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus licheniformis* و *Bacillus polymyxa* توانایی تولید سلولاز را دارند (۵). صفاری و همکاران (۲۰۱۶) از محیط کشت CMC برای جداسازی باکتری‌های سلولولیتیک استفاده کردند که بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و تشکیل هاله در اطراف کلنی، هشت جدایه انتخاب شد. شناسایی مولکولی بر اساس ناحیه 16S rDNA نشان داد که گونه‌های غالب *Brevibacterium*، *Bacillus methylotrophicus halotolerans*، *B. subtilis*، *Bacillus sonorensis*، *Achromobacter Stenotrophomonas rhizophila* و *Pseudomonas azotoformans marplatensis* و *Ochrobactrum thiophenivorans* بودند (۱۱). درخت تبارزایی بیشینه صرفه‌جویی بر اساس توالی‌های مربوط به ۱۲ جدایه باکتری و ۱۸ توالی موجود در بانک ژن که دارای هم پوشانی و تشابه بالایی بودند رسم گردید. گونه *Flavobacterium acidificum* با شماره دسترسی MT781398 به‌عنوان گروه خارجی در جدایه‌های باکتریایی انتخاب گردید (شکل ۲). در این درختچه بر اساس نحوه انشعاب شاخه‌ها، جدایه‌ها به ترتیب از بالا به پایین در ۹ کلاذ قرار گرفتند و تمام کلادها با درجه اعتبارسنجی زیاد حمایت شدند (شکل ۲).

با شماره‌های دسترسی MN400092 و MN400093 در بانک ژن قرار داشت. درصد تشابه جدایه مورد بررسی با گونه‌های مشابه در بانک ژن ۱۰۰ درصد بود. این گونه متعلق به خانواده Enterobacteriaceae و راسته Enterobacteriales است. کلاد شماره ۹: جدایه مورد مطالعه در این کلاد شامل جدایه CL-12 متعلق به گونه *Serratia marcescens* با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد بود. این جدایه دارای تشابه به میزان ۹۹ درصد با گونه MH712494 *S. marcescens* با شماره دسترسی Yersiniaceae بود. اعضای این کلاد متعلق به خانواده Enterobacteriales می‌باشند.

به‌میزان ۹۹ درصد با گونه *B. circulans* با شماره دسترسی KF030228 بود. کلاد شماره ۷: جدایه مورد مطالعه در این کلاد شامل جدایه CL-11 متعلق به *Bacillus sp.* با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد بود. این جدایه دارای تشابه به میزان ۹۹ درصد با *Bacillus sp.* با شماره‌های دسترسی MH769066 و KM508814 داشت. اعضای این ۷ کلاد متعلق به خانواده Bacillaceae، راسته Bacillales و شاخه Firmicutes هستند. کلاد شماره ۸: جدایه مورد مطالعه در این کلاد شامل جدایه CL-9 متعلق به گونه *Citrobacter amalonaticus* بود که با درجه اعتبارسنجی ۹۵ درصد در کنار گونه‌های مشابه خود

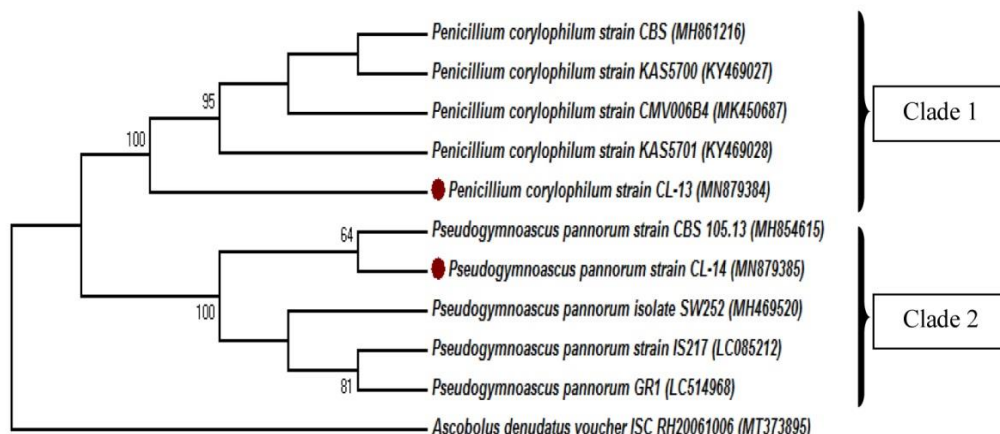


شکل ۲- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس روش پیشینه صرفه جویی و با استفاده از توالی نواحی 16S rDNA. آزمون اعتبارسنجی بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شده و مقادیر بالاتر از ۶۰ درصد روی انشعابات مربوطه نوشته شده است. گونه *Flavobacterium acidificum* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد.

Figure 2. A Maximum Parsimony tree based on 16S rDNA region sequences. The bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. *Flavobacterium acidificum* was selected as an external group.

درخت تبارزایی ترسیم شده با روش بیشینه صرفه‌جویی بر اساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 نشان داد که کلاد ۱ حاوی جدایه CL-13 می‌باشد که متعلق به گونه *Penicillium corylophilum* است. این گونه با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد حمایت می‌شود. میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های این کلاد بیش از ۹۹ درصد بود. کلاد ۲ حاوی جدایه CL-14 متعلق به گونه *Pseudogymnoascus pannorum* است که با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد حمایت می‌شود. درصد تشابه جدایه مورد بررسی با جدایه‌های مشابه در بانک ژن بیش از ۹۹ درصد بود.

درخت تبارزایی بیشینه صرفه‌جویی بر اساس توالی‌های مربوط به ۱۲ جدایه باکتری و ۱۸ توالی موجود در بانک ژن که دارای هم‌پوشانی و تشابه بالایی بودند رسم گردید. ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در دو جدایه قارچی تعیین توالی گردید. در جدایه‌های قارچی توالی‌های مربوط به این دو جدایه که دارای هم‌پوشانی و تشابه بالایی با هشت توالی موجود در بانک ژن بودند مورد مقایسه قرار گرفتند و برای ترسیم درخت تبارزایی، گونه *Ascobolus denudatus* با شماره دسترسی MT373895 به عنوان گروه خارجی در جدایه‌های قارچی انتخاب گردید (شکل ۳).



شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی و با استفاده از توالی نواحی ITS1-5.8S-ITS2. آزمون اعتبارسنجی بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شده و مقادیر بالاتر از ۶۰ درصد روی انشعابات مربوطه نوشته شده است. گونه *Ascobolus denudatus* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد.

Figure 3. A Maximum Parsimony tree based on ITS1-5.8S-ITS2 region sequences. The bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. *Ascobolus denudatus* was selected as an external group.

معرف آلودین در مقایسه با محیط کشت BHM واضح‌تر بود. بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی در محیط کشت BSM به ترتیب مربوط به جدایه‌های WB12، CCB9، WB4، EWB6 و TB9 بود. از میان جدایه‌های قارچی بیش‌ترین فعالیت سلولولیتیکی مربوط به جدایه‌های WF2، WF4، VCF1، CF4 و

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و غربالگری جدایه‌های سلولولیتیک روی محیط‌های کشت اختصاصی در مجموع ۸۳ جدایه باکتری و ۱۸ جدایه قارچی با قابلیت تولید سلولاز انتخاب شدند. هاله مربوط به فعالیت سلولازی در محیط کشت BSM و

۷-۱ قرار دارند که یک گروه مونوفیلیتیک با اعتبارسنجی ۱۰۰ را تشکیل می‌دهند. دو گونه باکتری *S. marcescens* و *C. amalonaticus* نیز شناسایی شدند که در دو کلاد جداگانه قرار گرفتند. تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 نشان داد که جدایه‌های قارچی متعلق به گونه‌های *Penicillium corylophilum* و *Pseudogymnoascus pannorum* بودند. درخت تبارزایی ترسیم شده با روش بیشینه صرفه‌جویی بر اساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 نشان داد که جدایه‌های قارچی این مطالعه در دو کلاد قرار دارند که با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد حمایت می‌شوند. بر اساس نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود که امکان استفاده از ترکیب ریزجانداران منتخب، جهت تهیه فرمولاسیون‌های اولیه برای تبدیل سریع‌تر ضایعات کشاورزی به کمپوست مورد بررسی قرار بگیرد.

SF1 بود. بر اساس یافته‌های این پژوهش، بهترین محیط جهت بررسی فعالیت لیگنینولیتیکی، محیط کشت چاپک حاوی یک گرم متیل بلو بود. بیش‌ترین نسبت قطر هاله به کلنی به ترتیب در جدایه‌های باکتری WB6، WB5 و WB12 مشاهده شد. در جدایه‌های قارچی فعالیت لیگنینولیتیکی تنها در دو جدایه WF2 و WF4 مشاهده شد. جدایه‌های منتخب اکثراً گرم مثبت و متعلق به گونه‌های *B. siamensis*، *B. halotolerans*، *B. subtilis*، *B. paralicheniformis*، *B. amyloliquefaciens*، *B. atrophaeus* و *B. circulans* بودند. درخت تبارزایی بیشینه صرفه‌جویی با اعتبارسنجی بوت‌استرپ ۱۰۰۰ نشان داد که جدایه‌های باکتری در ۹ کلاد قرار می‌گیرند و گونه‌های باسیلوس در کلاد

منابع

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 17. 3389-3402.
- Chen, Z., and Stamler, J.S. 2006. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 16: 8. 259-265.
- Gaind, S., and Pandey, A.K. 2005. Biodegradation study of crop residues as affected by exogenous inorganic nitrogen and fungal inoculants. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 45: 4. 301-311.
- García-Gómez, A., Bernal, M.P., and Roig, A. 2005. Organic matter fractions involved in degradation and humification processes during composting. *Compost Science & Utilization*. 13: 2. 127-135.
- Han, S.J., Yoo, Y.J., and Kang, H.S. 1995. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cel gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 43. 26012-26019.
- Hemati, A., Aliasgharzad, N., and Khakvar, R. 2018. In vitro evaluation of lignocellulolytic activity of thermophilic bacteria isolated from different composts and soils of Iran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14: 424-430.
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6. 3832-3845.
- Kumar, R., Singh, S., and Singh, O.V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 377-91.

9. Mudziwapasi, R., Chigu, N.L., Kuipa, P.K., and Sanyika, W.T. 2016. Isolation and molecular characterization of bacteria from the gut of *Eisenia fetida* for biodegradation of 4, 4 DDT. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 4: 5. 041-047.
10. Rubeena, M., Neethu, K., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K.N., Josh, M.S., Jisha, V.N., Pradeep, S., and Benjamin, S. 2013. Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 214-221.
11. Saffari, H., Pourbabaee, A.A., Asgharzadeh, A., and Besharati, H. 2017. Isolation and identification of effective cellulolytic bacteria in composting process from different sources. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 63: 3. 297-307.
12. Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., García, D., and Roig, A. 2002. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. *Biodegradation*. 13: 6. 361-371.
13. Saparrat, M.C., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A., and Martínez, M.J. 2008. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. *Process Biochemistry*. 43: 4. 368-375.
14. Sivasubramanian, K., Ravichandran, S., and Kavitha, R. 2012. Isolation and characterization of gut micro biota from some estuarine fishes. *Marine Science*. 2: 2. 1-6.
15. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 12. 2725-2729.
16. Tarayre, C., Brognaux, A., Bresseur, C., Bauwens, J., Millet, C., Mattéotti, C., Destain, J., Vandenbol, M., Portetelle, D., De Pauw, E., and Haubruge, E. 2013. Isolation and cultivation of a xylanolytic *Bacillus subtilis* extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171: 1. 225-245.
17. Teather, R.M., and Wood, P.J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 4. 777-780.
18. Ting, A.S.Y., Tay, H., Peh, K.L., Tan, W.S., and Tee, C.S. 2013. Novel isolation of thermophilic *Ureibacillus terrenus* from compost of empty fruit bunches (EFB) of oil palm and its enzymatic activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2: 2. 162-164.
19. Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., and Moreno, J. 2007. Effect of inoculation in composting processes: modifications in lignocellulosic fraction. *Waste Management*. 27: 9. 1099-1107.
20. White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 18: 1. 315-322.
21. Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., and Champreda, V. 2010. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*. 47: 283-290.
22. Xi, B., Zhang, G., and Liu, H. 2005. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste. *Journal of Hazardous Materials*. 124: 1. 165-172.

