جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

# روش‌های آزمایشگاهی بررسی ریزجانداران فعال‌کننده زیستی


**نگارندگان**

**حسین کاری دولت‌آباد،** عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
**حسین صفاری،** عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور



**نشریه فنی: 637**

**1402**

*مشخصات اثر*

**عنوان: روش‌های آزمایشگاهی بررسی ریزجانداران فعال‌کننده زیستی**

**نگارندگان:** حسین کاری دولت‌آباد و حسین صفاری

**ناشر:** موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

**کارشناس انتشارات:** سمانه پورمنصور

**ویراستار ادبی:** زهرا محمدی

**طراح جلد:** راضیه محمدی

**سال انتشار:** 1402

**حق چاپ برای ناشر محفوظ است.**

**این اثر با شماره 64773 در تاریخ 1402/11/7 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.**

**نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.**

**نشانی:** کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

**کد پستی:** 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

**نمابر :** 02636210121 **تلفن:** 36201900- 026

**وب‌سایت:** http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

**مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.**

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


1- مقدمه ..... 1
2- ریزجانداران تجزیه‌کننده مواد آلی ..... 2
3- نمونه‌برداری و جداسازی ریزجانداران فعال‌کننده زیستی ..... 6
4- خالص‌سازی و نگهداری ریزجانداران فعال‌کننده زیستی ..... 7
5- سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی لیگنین جدایه‌ها ..... 9
6- سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی سلولز جدایه‌ها ..... 10
7- آنزیم‌های تشکیل‌دهنده سیستم سلولاز ..... 11
7-1- آنزیم‌های Endo-β-1,4 Glucanase ..... 11
7-2- آنزیم‌های Exo-β-1,4 Glucanase ..... 12
7-3- آنزیم‌های β-1,4 Glucan glucohydrolase ..... 12
7-3-1- آنزیم β-1,4 Glucan cellubiohydrolase ..... 12
7-3-2- آنزیم β-1,4-Glucosidase ..... 12
8- روش‌های تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز ..... 13
8-1- ارزیابی کلی فعالیت آنزیمی ..... 13
8-1-1- تهیه مایع کشت ..... 13
8-1-2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم Endo-β-1,4 Glucanase ..... 14
8-1-3- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم Exo-β-1,4 Glucanase ..... 16
8-1-4- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم β-1,4-Glucosidase ..... 17

## 1- مقدمه

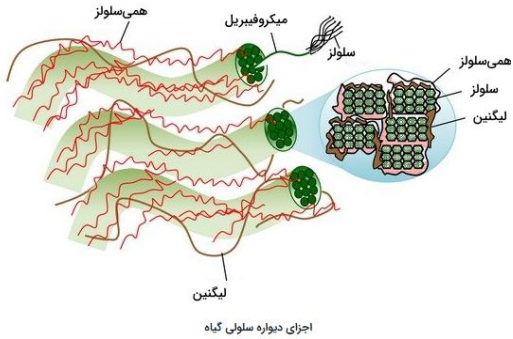
یکی از معضلات بخش کشاورزی تولید ضایعات سلولزی و مقاوم به تجزیه میکروبی است. روشن است تبدیل این ترکیبات به کمپوست با روش‌های سنتی به دلیل زمان‌بر بودن و پایین بودن سطح عناصر غذایی در ترکیب حاصله اقتصادی نبوده و گاهی مشکلات زیست‌محیطی را نیز بدنبال دارد از این‌رو می‌توان برای سرعت بخشی در کمپوست‌سازی از فعال‌کننده‌های زیستی کمک گرفت تا بتوان با تلقیح این نوع ضایعات از سویی کمپوست با کیفیت تولید نمود و از سوی دیگر ضمن اقتصادی کردن تولید کمپوست از این ضایعات به تولید کمی و کیفی محصول و تأمین بخشی از نیاز کودی کشور و رفتن به سمت کشاورزی پایدار ارگانیک قدم برداشت.

فعال‌کننده‌های زیستی شامل مجموعه‌ای از یک یا چند ریزجاندار مفید برای تجزیه سریع‌تر بقایای آلی مانند ضایعات چوب، باگاس نیشکر، کودهای دامی تازه و دیگر بقایای کشاورزی و ضایعات زباله شهری است. فعال‌کننده‌های زیستی با افزایش سرعت تجزیه مواد آلی منجر به کوتاه کردن زمان کمپوست‌سازی می‌شوند. فعال‌کننده‌های زیستی بیشتر شامل ریزجانداران دارای آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات لیگنوسلولزی هستند.

مواد لیگنوسلولزی از فراوانترین منابع کربنی پیچیده در طبیعت و زیست‌توده گیاهی است که شامل سه ترکیب اصلی سلولز، لیگنین و همی‌سلولز می‌شود (Shallom and Shoham, 2003). تجزیه لیگنوسلولز برای عملکرد چرخه جهانی کربن ضروری است. تجزیه مواد لیگنوسلولزی به قندهای منومریک با همکاری آنزیم‌های سلولولیتیک و لیگنینولیتیک به صورت هم‌افزایی، دارای اهمیت فراوان است (Lawford and Rousseuu, 2003).

سلولز به عنوان فراوانترین ماده آلی طبیعت یکی از ترکیبات شیمیایی است که مطالعات گسترده‌ای روی ساختمان آن صورت گرفته است. سلولز یک پلی ساکارید ساختمانی است که بیشترین نقش را در تشکیل اسکلت گیاهان دارد و تقریباً 53 درصد مواد دیواره سلولی درختان و دیگر گیاهان را شامل است. مولکول سلولز اصطلاحاً به صورت نخ مانند در نظر گرفته می‌شود که به شکل فیبریل‌هایی آرایش یافته است. فیبریل‌ها دسته‌های طویلی از مولکول‌ها هستند که بوسیله پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل دو مولکول مجاور سلولز پایدار می‌شوند. نظم مولکولی قوی درباره سلولز طبیعی آن است که مولکول‌های آب و یا آنزیم‌ها و اسیدهای مخرب به راحتی نمی‌توانند به داخل ساختمان آن نفوذ نمایند.

اما ساختمان سلولزی که بواسطه اسیدها یا بازهای معدنی متورم شده است، این نظم و سازمان‌بندی را از دست داده است و به آسانی تحت تأثیر آنزیم‌های هیدرولیز کننده قرار می‌گیرد. تجزیه هیدرولیتیک سلولز، روند تکراری کوتاه شدن طول زنجیره و سست شدن سوبستراهای باقیمانده است (Howard *et al.*, 2003). این پلی ساکارید در دیواره سلولی به صورت زنجیره‌های ساده دیده نمی‌شود، بلکه به شکل واحدهای ریز میکروسکوپی میله‌ای شکل به نام میسل مشهود است. سپس این میسل‌ها به صورت واحدهای بزرگتر به نام میکروفیبریل سازمان گرفته و ارتباطات ویژه‌ای با پلی ساکاریدهای دیگر(همی‌سلولزها) و لیگنین برقرار می‌نمایند (شکل 1). لیگنین از واحدهای منو مریک فنیل پروپان تشکیل شده و یک پلیمر بسیار نامنظم و نامحلول است که شامل زیر واحدهای فنیل پروپانوئید بوده و از یک حلقه آروماتیک و یک زنجیره سه کربنه ساخته شده است. برخلاف سلولز و همی سلولز هیچ زنجیره‌ای که دارای زیر واحدهای تکرار شونده باشد درآن وجود ندارد. از این‌رو هیدرولیز آنزیمی این پلیمر بسیار مشکل است (Malherbe and Cloete, 2002).




**شکل1- طرح شماتیک اجزای دیواره سلولی گیاه**

## 2- ریزجانداران تجزیه‌کننده مواد آلی

در مراحل ابتدایی فرایند کمپوست‌سازی جمعیت ریزجانداران مزوفیلیک شروع به توسعه و تجزیه ضایعات می‌کنند. با شکسته شدن کربوهیدرات‌ها دمای توده بالا می‌رود. با بالا رفتن دمای توده ریزجانداران مزوفیل ناپدید و ریزجانداران گرما دوست ظاهر می‌شوند. در زمان کمپوست‌سازی ریزجانداران مواد آلی را به دی اکسید کربن، زیست‌توده، انرژی

گرمایی و محصول نهایی شبه هوموس تبدیل می‌کنند. پیش ماده‌های آلی، عوامل حجم دهنده و مواد افزودنی در کمپوست بیشتر از مواد گیاهی مشتق شده‌اند. ترکیبات اصلی مواد آلی کربوهیدرات‌ها (سلولز)، پروتئین‌ها، لیپیدها و لیگنین هستند. توانایی ریزجانداران در جذب مواد آلی به توانایی آن‌ها در تولید آنزیم‌های مورد نیاز برای تجزیه پیش ماده بستگی دارد. پیش ماده‌های پیچیده‌تر سیستم آنزیمی وسیع‌تری را نیاز دارند، بواسطه عمل هم‌افزایشی ریزجانداران، ترکیبات آلی پیچیده به مولکول‌های کوچکتر تجزیه می‌شوند که می‌توانند توسط سلول‌های میکروبی استفاده شوند (Golueke, 1991).

ریزجانداران برای رشد خود به یک منبع کربن، عناصر پرمصرف مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم و عناصر کم مصرف نیاز دارند. تا زمانی که بخش کوچکی از کربن با سلول‌های آن‌ها در تماس باشد، این عنصر به عنوان منبع انرژی برای ریزجانداران است. مقداری از انرژی تشکیل شده برای استفاده سوخت وساز میکروبی قرار می‌گیرد و بقیه به صورت گرما آزاد می‌شود. نیتروژن یک عنصر حیاتی برای ریزجانداران بوده زیرا بخشی از ترکیب پروتئین، نوکلئو اسیدها، آمینو اسیدها، آنزیم‌ها و کوآنزیم‌های ضروری برای رشد سلول و عملکرد آن‌هاست. اگر نیتروژن اضافی در سیستم باشد به صورت گاز آمونیاک یا دیگر ترکیبات نیتروژنی آزاد می‌شود. اندازه مطلوب نسبت C/N، برابر 40-25 گزارش شده و بسته به نوع پیش ماده متغیر است (Golueke, 1991). ریزجانداران توانایی استفاده از ملکول‌های آلی که در آب محلولند را دارند. اگر رطوبت کمتر از اندازه بحرانی شود فعالیت میکروبی کاهش یافته و ریزجانداران غیر فعال می‌شوند و رطوبت زیاد نیز سبب کاهش تنفس، آبشویی عناصر غذایی و کاهش سرعت تجزیه می‌شود. در شرایط بهینه کمپوست‌سازی در سه مرحله انجام می‌شود: 1- فاز مزوفیلیک 2- فاز ترموفیلیک که از چند روز تا چند ماه ادامه می‌یابد و3- فاز سرد شدن و بلوغ که برای ماه‌ها می تواند ادامه داشته باشد. در شروع کمپوست‌سازی توده دارای درجه حرارت محیط بوده و کمی اسیدی است. منابع کربن محلول و قابل تجزیه آسان مانند مونوساکاریدها، نشاسته و لیپیدها توسط ریزجانداران در مرحله ابتدایی تجزیه استفاده می‌شوند. به دلیل تولید اسیدهای آلی از توده در حال تجزیه pH کاهش می‌یابد. در مرحله دوم ریزجانداران شروع به تجزیه پروتئین‌ها می‌نمایند که در نتیجه با آزاد شدن آمونیوم pH افزایش می‌یابد. پس از تجزیه منابع کربنی که به آسانی تجزیه می‌شوند ترکیبات پایدارتر مانند

سلولز، همی سلولز و لیگنین تجزیه می‌شوند و تا حدی به صورت هوموس تغییر شکل می‌دهند (Tuomela *et al*., 2000; Galai *et al*., 2009).

آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز بوسیله تعداد زیادی از ریزجانداران ساخته می‌شوند. ریزجانداران تجزیه‌کننده سلولز در میان قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها، باکتری‌ها و میکسوباکتری‌ها یافت می‌شود. هیدرولیز آنزیمی سلولز طبیعی توسط گروهی از آنزیم‌ها تسریع می‌شود که به شکل افزایشی با هم عمل می‌کنند. سیستم آنزیمی تجزیه کننده سلولز ریزجانداران مختلف اغلب با هم متفاوت هستند. افزون‌براین، بسیاری از ریزجانداران که توانایی رشد روی سلولز طبیعی را ندارند، آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز تولید می‌کنند. اما سیستم‌های آنزیمی آن‌ها برخی از آنزیم‌های ضروری برای هیدرولیز سلولز طبیعی را ندارند و اغلب می‌توانند برای رشد خود از سلولزی که بطور نسبی متلاشی شده است استفاده نمایند. چنین ریزجانداران علیرغم این کمبودشان ممکن است برای تولید صنعتی آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز ویژه‌ای جالب توجه باشند. برخی از ریزجانداران مقادیر زیادی از آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز را به محیط کشت خود ترشح می‌کنند، در حالیکه دسته دیگر با وجود رشد روی سلولز هیچ آنزیمی و یا مقدار کمی آنزیم به محیط ترشح می‌نمایند.

فعالیت میکروبی نقش اساسی و شاخص بر تغییرات صورت گرفته در طی فرایندهای هومیفیکاسیون دارد. از این‌رو توانایی ریزجانداران در تجزیه لیگنوسلولز عامل کلیدی در بازیافت ضایعات بویژه در فرایند کمپوست‌سازی است. وجود جمعیت میکروبی کافی که سبب پیشرفت مناسب پایداری مواد آلی می‌شوند تحت تأثیر شرایط محیطی است. تلقیح با ریزجاندارانی مفید تجزیه زیستی مواد آلی را فعال می‌کند و ویژگی‌های نهایی کمپوست را بهبود می‌بخشد (Gaind and Pandey, 2005).

برخی از ترکیبات آزاد شده مانند پلی‌فنل‌ها، قندها و ترکیبات آمینی در اثر فعالیت میکروبی بوجود می‌آیند که به نظر می‌رسد سبب پیشرفت تشکیل هوموس شوند. مایه تلقیح‌های میکروبی به منظور تولید کمپوست‌های با ارزش افزوده بالا یا کاهش مدت زمان کمپوست‌سازی به توده کمپوست افزوده می‌شود و به دلیل ناتوانی در زنده ماندن برخی از این مایه تلقیح‌ها در یک محیط رقابتی ممکن است تأثیر چنین تیمارهایی گاها نامعلوم

باشد از این‌رو انتخاب ریزجاندارانی مفید به عنوان مایه تلقیح مناسب برای داشتن تیمارهای موفق ضرورت دارد (Vargas-Garcı *et al*., 2007).

باکتری‌های سلولولیتیک هوازی راندمان سلولی زیادی برای رشد تنفسی هوازی را تولید می‌کنند که سبب ایجاد پروتئین سلول میکروبی از بیومس سلولزی می‌شود (Singh *et al*., 1991). اگرچه بسیاری از گونه‌های باکتری توانایی زیست‌ساخت آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز را از خود نشان داده‌اند، تنها تعداد کمی از آن‌ها کارایی لازم را برای مصارف صنعتی داشته‌اند. گونه‌های متعلق به بخش‌های تاکسونومیک متعددی برای این منظور مطالعه شده‌اند که باکتری‌های تجزیه کننده سلولز در بین اکتینومیست‌ها و باکتری‌های هوازی گرم مثبت .*Bacillus* sp، *Thermomonospora* sp.، *Thermoactinomyces* sp.، *Thermopolyspora* sp.، *Streptomyces* sp.، *Streptosporangium* sp.، *Micromonospora* sp.، *Nocardia* sp. و *Cellulomonas* sp.، باکتری‌های هوازی گرم منفی *Pseudomonas fluorescens*، *Cellvibrio gilvus* و *Cellvibrio fulvus*؛ باکتری‌های بی‌هوازی گرم مثبت *Ruminococcus albus*، *Eubacterium cellusolvens*، *Ruminococcus flavefaciens*، *Clostridium cellulovorans*، *Clostridium stercorarium* و *Clostridium thermocellum* و باکتری‌های بی‌هوازی گرم منفی *Acetovibrio cellulolyticus* و *Bacteroides cellulosolvens* مشاهده شده‌اند (Tuomela *et al*., 2000).

گرمادوستی در قارچ‌ها به اندازه باکتری‌ها و یا جلبک‌ها نیست تنها تعداد کمی از بین بیش از 50000 گونه قارچی می توانند در دماهای زیاد رشد کنند و این قارچ‌های ترموفیل شناخته شده متعلق به جنس‌های زیگومیست‌ها، آسکومیست‌ها و قارچ‌های ناقص هستند (Mouchacca, 1997). این قارچ‌ها موجب کمپوست شدن و هوموسی شدن مواد می‌شوند. همه سازوکارهای سریع تجزیه مواد آلی بخوبی شناخته نشده و تصور می‌شود که این قارچ‌ها منبع خوبی از آنزیم‌ها باشند که می‌توانند دیواره‌های سلولی گیاهان را در هم بریزد. از قارچ‌های ترموفیل جنس *Chaetomium* در دمای مناسب 55-45 و دمای حداکثر 61-58 فعال است و از قارچ‌های مزوفیل دو گونه از جنس تریکودرما شامل *Trichoderma reesei* و *Trichoderma viride* را می‌توان نام برد که در دمای مطلوب 30 درجه فعال هستند (Maheshwari *et al*., 2000). تریکودرما از گروه قارچ‌های ناقص در خاک‌ها و روی چوب پوسیده و لاشبرگ‌های گیاهی غالب هستند. این برتری ممکن است با استعداد و توانایی

متابولیکی گوناگون و طبیعت رقابتی موثر این گونه‌ها قابل تشخیص است (Rossmann and Davis, 1996). جدایه‌های *Trichoderma harzianum* به دلیل توان استفاده آن‌ها به عنوان عامل کنترل زیستی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند، مثلا گونه‌های تریکودرما توانایی تولید عوامل کنترل بیولوژیک در برابر بیمارگرهای گیاهی خاکزاد را دارد (Cho and Lee, 1999). گونه *T. reesei* از ریزجاندارانی سلولولیتیک است که در سال 1950 جداسازی شد و به دلیل پیشرفت و برنامه‌های مشخص و فرایندهای تولید صنعتی سلولازها که بسیار با ارزش هستند برای سالیان پیاپی در کشورهای مختلف توسعه یافته است. این قارچ تولید کننده مناسب آنزیم‌های سلولولیتیک است اما نمی‌تواند لیگنین را تجزیه کند.

## 3- نمونه برداری و جداسازی ریزجانداران فعال کننده زیستی

در راه اندازی یک فرآیند میکروبی برای هیدرولیز سلولز و لیگنین، نخستین مسئله‌ای که دارای اهمیت است، جداکردن ریزجانداران به عنوان تسریع‌کننده‌های زیستی مورد نیاز، از محیط زیست طبیعی آن‌ها است. روش‌های مختلفی برای بررسی هیدرولیز میکروبی سلولز طراحی و اجرا شده است. اما مشکلی که همه این روش‌ها با آن مواجه‌اند، تنوع سیستم‌های آنزیمی مربوطه در بین ریزجانداران متفاوت، حضور آنزیم‌های مختلف برای هیدرولیز بوده که هرکدام بخش ویژه ای از فرایند را عهده‌دار هستند و بالاخره مسئله القا و مهار این آنزیم‌ها در شرایط محیطی مختلف است (Kluepfel, 1988) .

محیط‌های طبیعی که در مطالعات جداسازی ریزجانداران تجزیه کننده سلولز و لیگنین روی آن‌ها کار می‌شود به ترتیب اهمیت عبارتند از خاک‌های مختلف، فضولات نشخوارکنندگان، برگ‌ها و خاشاک در حال پوسیدن و بالاخره گل و لای مرداب‌ها. نخستین کارهایی که در این زمینه انجام شده است به دهه‌های 50 و60 میلادی بر می‌گردد. روش‌های نوین ارزیابی مستقیم فعالیت تجزیه‌کنندگی سلولز گونه‌های کشت داده شده اغلب شامل اندازه‌گیری میزان کاهش در مقاومت کششی فیبرهای پنبه و یا کاهش در وزن مواد سلولزی پس از گرماگذاری با باکتری‌های مورد بررسی است. این روش‌ها معایبی دارند که از جمله آن‌ها اختیاری بودن زمان برای بررسی ویژگی‌های یاد شده است. اما به تازگی تجارب دیگری در رابطه با استفاده از آزمایش‌های شفاف‌کنندگی محیط‌های کدر ونیمه کدر به دست

آمده است. در این روش‌ها، ضمن بررسی کیفی هیدرولیز و یا نبودن هیدرولیز سوبسترا توسط ریزجانداران آزمایش شده، یک عیار نیمه کمی نیز برای تعیین میزان فعالیت تجزیه کنندگی سلولز با اندازه‌گیری قطر هاله‌های ایجاد شده می‌توان به دست آورد. نکته مشترکی که در تمامی روش‌های جداسازی ریزجانداران تجزیه‌کننده لیگنینوسلولز به چشم می‌خورد، استفاده از یک محیط معدنی پایه با منبع نیتروژن به همراه سلولز و لیگنین به عنوان منبع عمده یا تنها منبع کربنی است. علت این امر آن است که آنزیم‌های میکروبی تجزیه کننده سلولز و لیگنین عمدتاً القاءپذیر بوده و تنها در شرایطی با مقادیر قابل تشخیص تولید می‌شوند که سلولز یا مشتقات آن و یا برخی از مونو یا دی ساکاریدها منبع اصلی کربن محیط باشند که این برخلاف آنزیم‌های دائم بیان شونده مانند آمیلازها است که همواره توسط ریزجانداران تولید می‌شوند (Montenecourt and Eveleigh, 1977).

برای جداسازی ریزجانداران فعال‌کننده زیستی میزان 10 گرم و یا 10 میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های جامد و یا مایع را داخل ارلن مایر 250 میلی‌لیتری دارای 90 میلی‌لیتر محلول سرم نمکی سترون ریخته و به مدت 60 دقیقه روی شیکر دورانی با دور 130 دور در دقیقه قرار داده می‌شود. سپس برای تهیه سری‌های رقت یک میلی‌لیتر از محلول هموژنیزه به لوله‌های دارای نه میلی لیترآب مقطر استریل اضافه تا رقت 0/01 بدست آید. رقت‌های $10^{-3}$، $10^{-4}$، $10^{-5}$ و $10^{-6}$ نیز تهیه می‌شود. در نهایت 100 میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده در سه تکرار روی سطح تشتک پتری‌های دارای محیط کشت نوترینت آگار[1] سیکلوهگزامیددار جهت جداسازی جدایه‌های باکتری و محیط کشت پتیتو دکستروز آگار[2] استرپتومایسین‌دار برای جداسازی جدایه‌های قارچی منتقل و به مدت حداقل 24 ساعت در 28 درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و به مدت 15 الی 30 روز در دمای 25 درجه سلسیوس برای قارچها نگهداری می‌شود. تشتک‌های پتری به صورت مرتب و روزانه بازبینی می‌شوند (کاری دولت آباد و همکاران، 1400).

## 4- خالص‌سازی و نگهداری ریزجانداران فعال‌کننده زیستی

باکتری‌هایی که روی محیط کشت نوترینت آگار رشد کردند به دقت جداسازی و در چند مرحله تا حصول اطمینان از خالص بودن باکتری، خالص‌سازی می‌شوند. به منظور

[1] Nutrient agar
[2] Potato dextrose agar

نگهداری باکتری‌ها به مدت طولانی از روش اسلنت کردن استفاده می‌شود. بدین صورت که پس از ریختن محیط کشت نوترینت آگار در لوله آزمایش و قرار دادن لوله به صورت شیبدار، یک سطح شیبدار داخل لوله برای کشت باکتری فراهم می‌شود. باکتری‌ها روی این سطح شیبدار کشت و درون انکوباتور در دمای 28 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت نگه‌داری می‌شوند. باکتری‌ها پس از رشد در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شده و هر سه ماه یک‌بار تجدید کشت می‌شوند.

قارچ‌های رشد نموده روی محیط کشت جداگانه و توسط سوزن‌های سترون برداشته شده و به داخل تشتک‌های پتری دارای محیط کشت پتیتو دکستروز آگار منتقل می‌شوند. برای تهیه یک جدایه خالص روش نوک ریسه استفاده می‌شود. برای این منظور قارچ در تشتک‌های دارای آب دو درصد کشت داده شده و بیست و چهار ساعت پس از کشت، محل نوک ریسه‌ها در پشت تشتک پتری علامت‌گذاری می‌شود. نوک ریسه‌ها به همراه مقداری از آگار اطراف آن با سوزن سترون به محیط کشت پتیتو دکستروز آگار منتقل و تشتک‌ها به مدت سه تا چهار روز در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند (کاری دولت آباد، 1400).

برای نگهداری جدایه‌های قارچی از کاغذ صافی سترون و لوله‌های فالکون 15 میلی‌لیتری دارای محیط غذایی کشت پتیتو دکستروز آگار استفاده شد. در روش کاغذ صافی سترون ابتدا یک قطعه آگار دارای میسلیوم خالص قارچ در مرکز تشتک پتری دارای محیط غذایی کشت پتیتو دکستروز آگار قرار داده شد. سپس تکه‌های کاغذ صافی سترون دور تا دور این قطعه قرار داده شدند. تشتک‌ها به مدت 1-2 هفته درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد قارچ و نفوذ میسلیوم به داخل کاغذ صافی، تشتک‌ها از انکوباتور خارج شده، قطعات کاغذ صافی دارای میسلیوم‌های قارچ در زیر هود لامینار از روی محیط کشت برداشته شده و در بین کاغذ خشک‌کن سترون به مدت 48 ساعت خشک شد. سپس به کمک قیچی سترون به قطعات کوچکتری برش داده شدند و قطعات مربوط به هر جدایه به لوله‌های پلاستیکی درب‌دار 1/5 میلی‌لیتری سترون منتقل شدند. درب لوله‌ها با پارافیلم مسدود شد و برای نگهداری به درون فریزر با دمای 20- درجه سلسیوس منتقل شدند (کاری دولت آباد، 1400).

روش استفاده از لوله‌های فالکون به این ترتیب است که قرص‌هایی به قطر پنج میلی متر از حاشیه پرگنه‌های فعال هر جدایه برداشته شد و به محیط کشت مورب پتیتو دکستروز آگار درون لوله‌های فالکون منتقل شد. سپس به مدت هفت روز درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس قرار داده شدند. و برای نگهداری، به دمای چهاردرجه سلسیوس منتقل شدند (کاری دولت آباد، 1400).

## 5- سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی لیگنین جدایه ها

به منظور ارزیابی فعالیت لیگنینولیتیک (توان تجزیه لیگنین)، محیط کشت چاپک دارای متیل بلو، تریپان بلو و کنگورد با ترکیب‌های مطابق جدول 1 تهیه و هر یک از جدایه‌های خالص رشد یافته روی محیط کشت‌های نوترینت آگار و پتیتو دکستروز آگار، در وسط تشتک‌های پتری کشت و حداقل به مدت 96 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و 28 درجه سلسیوس برای قارچ‌ها قرار داده می شوند. برای مشاهده فعالیت لیگنینولیتیکی از سه ترکیب متیل بلو، تریپان بلو و کنگورد به میزان یک گرم به صورت مجزا و ترکیبی استفاده می‌شود. جدایه‌های دارای هاله شفاف در اطراف کلنی به‌عنوان جدایه‌های مثبت انتخاب می‌شوند (شکل 2). نسبت قطر هاله به قطر کلنی که شاخصی از میزان تولید آنزیم لیگنیناز است با خط کش دقیق اندازه‌گیری و یادداشت می‌شود (Saparrat *et al*., 2008; Hemati *et al*., 2018).

**جدول 1- ترکیبات و مقادیر مورد نیاز برای تهیه محیط کشت چاپک**

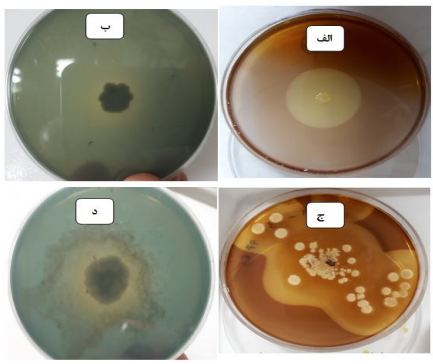
| نام ترکیب | گرم در لیتر |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 5 |
| $KH_2PO_4$ | 0/53 |
| $K_2HPO_4$ | 4/55 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0/5 |
| Yeast extract | 0/1 |
| Congored یا Trypan Blue یا Methyl blue | 1 |
| Glycerol | 40 میلی مولار |
| Agar | 15 |

## 6- سنجش فعالیت تجزیه کنندگی سلولز جدایه ها

به منظور ارزیابی فعالیت سلولولیتیک (توان تجزیه سلولز) محیط کشت‌های BHM 7 و BSM8 با ترکیب‌های مطابق جدول 2 تهیه و هر یک از جدایه‌های خالص رشد یافته روی محیط کشت‌های نوترینت آگار و پتیتو دکستروز آگار، در وسط تشتک‌های پتری کشت و حداقل به مدت 96 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و 28 درجه سلسیوس برای قارچ‌ها قرار داده می‌شوند. در محیط کشت BHM، برای مشاهده هاله نخست سطح تشتک‌های پتری دارای کلنی را با محلول 0/3 درصد کنگورد غوطه‌ور کرده و پس از 20 دقیقه محلول کنگورد اضافی باقیمانده در سطح تشتک‌های پتری تخلیه و با محلول یک مولار کلرید سدیم جایگزین می‌شود (Teather and Wood, 1982). در محیط کشت BSM، سطح تشتک‌های پتری دارای کلنی با آیودین غوطه‌ور می‌شود (Rubeena *et al.*, 2013). جدایه‌های دارای هاله شفاف در اطراف کلنی به‌عنوان جدایه‌های مثبت انتخاب می‌شوند (شکل 2). نسبت قطر هاله به قطر کلنی که شاخصی از میزان تولید آنزیم سلولاز است با خط کش دقیق اندازه گیری و یادداشت می‌شود.

**جدول 2- ترکیبات و مقادیر مورد نیاز برای تهیه محیط کشت‌های BHM و BSM**

| محیط‌کشت BHM | | محیط‌کشت BSM | |
|---|---|---|---|
| گرم در لیتر | نام ترکیب | گرم در لیتر | نام ترکیب |
| 10 | Carboxymethyl cellulose | 7/5 | Carboxymethyl cellulose |
| 1 | $KH_2PO_4$ | 1 | $KH_2PO_4$ |
| 0/2 | $MgSO_4 .7H_2O$ | 2 | $MgSO_4.7H_2O$ |
| 1 | $NH_4NO_3$ | 2 | $NaNO_3$ |
| 0/05 | $FeCl_3. 6H_2O$ | 0/5 | KCl |
| 0/02 | $CaCl_2$ | 0/5 | Protease pepton |
| 1 | $K_2HPO_4$ | 15 | Agar |
| 15 | Agar | | |




**شکل 2- هاله شفاف تشکیل شده اطراف کلنی جدایه‌های باکتری و قارچی.**

**الف) فعالیت سلولولیتیکی جدایه باکتری، ب) فعالیت لیگنینولیتیکی جدایه باکتری، ج) فعالیت سلولولیتیکی جدایه قارچی، د) فعالیت لیگنینولیتیکی جدایه قارچی (کاری دولت آباد و همکاران، 1400).**

## ۷- آنزیم‌های تشکیل‌دهنده سیستم سلولاز

برای هیدرولیز سوبستراهای سلولزی توسط سیستم‌های سلولاز، همکاری و هماهنگی بین چند آنزیم مورد نیاز است. آنزیم‌های تشکیل‌دهنده سیستم سلولاز اصولاً بر سه گروه کلی تقسیم می‌شوند. این آنزیم‌ها شامل endo-β-1,4-glucanase، exo-β-1,4 glucanase و β-1,4-Glucosidase هستند. سیستم سلولولیتیک باکتری‌ها ساده‌تر از قارچ‌هاست زیرا باکتری‌ها تنها آنزیم‌های اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز را تولید می‌کنند ولی علیرغم این واقعیت برخی گونه‌های باکتری‌ها توانایی تجزیه سلولز کریستالی را نیز از خود نشان داده‌اند.

### ۷-۱- آنزیم‌های Endo-β-1,4 Glucanase

آنزیم‌های اندوگلوکاناز یا CMCase با منشأ قارچی که بیشترین مطالعات روی آن‌ها صورت گرفته است، جرم مولکولی بین 5300 تا 5500 دالتون دارند و در حالت خاص و خنثی محتوی کربوهیدرات آن‌ها بین صفر تا 44/7 درصد متغیر است. این آنزیم‌ها قطعه قطعه شدن زنجیر سلولزی را بصورت تصادفی از محل اتصالات گلیکوزیدی " بتا 1و 4" تسریع می‌کنند که نتیجه آن با کاهش سریع در طول پلیمر و افزایش تدریجی غلظت قند احیا کننده همراه است. اندوگلوکانازها میزان فعالیت بالایی برای هیدرولیز کربوکسی متیل سلولز (CMC جانشین

سلولز که در آب محلول است) و سلولز اصلاح شده با اسید و نیز هیدروکسی اتیل سلولز (جانشین دیگری از سلولز محلول) را از خود نشان می‌دهند (Bhat and Bhat, 1997).

### ۷-۲- آنزیم‌های Exo-β-1,4 Glucanase

آنزیم‌های اگزوگلوکانازها که به‌نام کلی آویسلاز[1] نیز نامیده می‌شوند به دو گروه عمده B-1,4 Glucan glucohydrolase و B-1,4 Glucan cellobiohydrolase تقسیم می‌شوند که آنزیم اول واحدهای گلوکز و آنزیم دوم واحدهای سلوبیوز را از انتهای غیر احیاکننده زنجیر سلولزی جدا می‌کند (Bhat and Bhat, 1997).

### ۷-۳- آنزیم‌های β-1,4 Glucan glucohydrolase

اطلاعات بدست آمده برای آنزیم گلوکوهیدرولاز نسبت به اعضای دیگر سیستم سلولاز کمتر است. گزارش شده است که این آنزیم به سلولز اصلاح شده با اسید فسفریک، سلوالیگوساکارید و CMC تمایل زیادی نشان می‌دهد. این آنزیم بصورت یک آنزیم فرعی به موازات آنزیم سلوبیوهیدرولاز عمل می‌کند. با این که تمامی آنزیم های جداشده از این دسته در برابر سلوالیگوساکاریدها فعال هستند، فعالیت در برابر سلولز بی شکل و CMC به منبع آنزیمی بستگی دارد (Deobald and Crawford, 1997).

### ۷-۳-۱-آنزیم β-1,4 Glucan cellubiohydrolase

این آنزیم‌ها که به سلوبیوهیدرولاز نیز موسوم هستند، تمایلی به سوبستراهای مشتق از سلولز نشان نمی‌دهند. این مسأله مبین ویژگی سوبسترایی بالاتر نسبت به اندوگلوکانازها است. قارچ تریکودرما تولیدکننده این آنزیم است و با اندوگلوکانازها به شیوه هم‌افزایی عمل می‌کند. سلوبیوهیدرولاز روی دکسترین‌ها و سلولز کریستالی یا فیبری مؤثر هستند اما روی سلوبیوز یا CMC اثری نشان نمی‌دهند (Wood and McCrae, 1982).

### ۷-۳-۲- آنزیم β-1,4-Glucosidase

این آنزیم یا سلوبیاز[2]، سلوبیوز و سلوالیگوساکاریدهای کوتاه زنجیره را به گلوکز هیدرولیز می‌کنند، اما به سلولز یا سلودکسترین‌های بلند زنجیره حمله نمی‌کنند. آنزیم سلوبیاز در واقع بخشی از کمپلکس سلولاز نیست زیرا به سلولز طبیعی یا هیچکدام از مشتقات نیمه صناعی

[1] Avicelase
[2] Cellobiase

آن تمایلی نشان نمی‌دهد. با این وجود آنزیم فوق هنگامی که گلوکز به عنوان محصول نهایی هیدرولیز مورد نظر است یک بخش عمده از این فرایند هیدرولیز را عهده‌دار است. در صورت حضور گلوکز فعالیت این آنزیم به شدت کاهش می‌یابد (Juhasz *et al.*, 2004).

## ۸- روش های تعیین میزان فعالیت آنزیم های سلولاز

به علت اینکه سیستم آنزیمی سلولاز متشکل از چند نوع آنزیم است که بطور هم‌افزایی عمل می‌کنند، آنزیم‌شناسان درصدد ابداع چندین سنجش آنزیمی به منظور روشن ساختن عملکرد کمپلکس آنزیمی در هیدرولیز سلولز بوده‌اند. در این راستا به دلیل اینکه در آزمایشگاه‌های مختلف واحد فعالیت آنزیم به صورت اختیاری در نظر گرفته می‌شد، مقایسه کمی داده‌ها غیر ممکن به نظر می‌رسید. در سال1984 کمیته بیوتکنولوژی IUPAC یک مجموعه روش‌های استاندارد برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز منتشر نمود.

### ۸-۱- ارزیابی کلی فعالیت آنزیمی

فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز (اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز) را می‌توان با استفاده از سلولزهای کریستالی مانند الیاف کتان، کاغذ صافی و یا آویسل تعیین کرد. از بین این مواد می‌توان الیاف کتان و کاغذ صافی تهیه شده از الیاف کتان را بهترین سوبسترا دانست. در روش پیشنهادی کمیته بیوتکنولوژی IUPAC ، از کاغذ صافی سلولزی به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود (Mandels *et al.*, 1976). در این روش قندهای احیا کننده تولید شده توسط سیستم آنزیمی سنجیده شده و واحد آنزیمی برابر با تعداد میکرومول قند احیاء کننده آزاد شده در یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی در یک دقیقه است. هرگاه اندازه‌گیری کلی قندهای احیاء کننده در محیط دارای یون و یا عوامل احیاء کننده انجام شود از آویسل رنگ شده به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود.

#### ۸-۱-۱-تهیه مایع کشت

برای تهیه مایع کشت، نخست محیط کشت نوترینت براث در مقادیر لازم تهیه و سپس 20 میلی‌لیتر در ارلن‌های 100 میلی‌لیتری توزیع و در اتوکلاو با دمای 121درجه سلسیوس به مدت 20 دقیقه استریل شود. سپس در زیر لامینار و کنار شعله از هر جدایه یک لوپ باکتری در داخل ارلن کشت داده شود. ارلن‌ها به منظور هوادهی برای رشد باکتری روی

شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه قرار داده شود. پس از 18 ساعت گرماگذاری روی شیکر، در شرایط استریل به میزان دو درصد حجمی از مایع کشت که در هر میلی لیترآن جمعیتی معادل $10^8$ است به محیط دارای سوبستراهای اختصاصی آنزیم‌های سلولولیتیک تلقیح شود.

**۸-۱-۲- اندازه گیری فعالیت آنزیم Endo-β-1,4 Glucanase**

مشتقات محلول سلولز مانند کربوکسی متیل سلولز برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم استفاده می‌شود. با توجه به اینکه آنزیم اندوگلوکاناز از این سوبسترا به طور اختصاصی استفاده می‌کند، آنزیم‌های اگزوگلوکاناز خالص شده مانند گلوکوهیدرولاز و سلوبیوهیدرولاز روی این سوبسترا فعالیتی نداشته و یا این فعالیت بسیار اندک است. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز روی کربوکسی متیل سلولز (CMC) [1] یا از راه ارزیابی میزان قند احیاءکننده در محلول و یا از شیوه تغییر در ویسکوزیته سوبسترا اندازه‌گیری می‌شود.

تعیین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در محلول رویی با دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)[2] و در زمان‌های گرماگذاری 18، 24، 36، 48 و72 ساعته به منظور دستیابی به مناسبترین زمان انجام می‌شود (Miller, 1959).

- روش آماده‌سازی محلول DNS

ابتدا یک گرم پودر دی نیترو سالیسیلیک اسید را در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل و 30 گرم پتاسیم سدیم تارتارات به آن اضافه شود. سپس 20 میلی‌لیتر از سود دو نرمال نیز به آن‌ها افزوده و پس از انحلال کامل در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری به حجم رسانده شود. اطراف ظرف با فویل پوشانده و در یخچال چهار درجه سلسیوس نگهداری شود (Colowick and Kaplan, 1955).

- روش تهیه بافر سیترات یکدهم مولار pH =6

مقدار 9/5 میلی‌لیتر از اسید سیتریک یک دهم مولار به 41/5 میلی‌لیتر سیترات سدیم ($Na3C6H5O7$) یکدهم مولار اضافه و سپس حجم نهایی به 100 میلی‌لیتر رسانده شود.

- روش تهیه سوبسترا

[1] Carboxymethyl cellulose
[2] Dinitrosalicylic acid

ابتدا محلول دو درصد از نمک سدیم کربوکسی متیل سلولز در آب مقطر تهیه شود. سپس دو حجم از آن با یک حجم از بافر سیترات یکدهم مولار و یک حجم از آب مقطر مخلوط شود. بدین ترتیب غلظت کربوکسی متیل سلولز به یک درصد می‌رسد (Stewart and Leatherwood, 1976).

- روش تهیه محلول آنزیمی

در فواصل زمانی یاد شده از هر ارلن در شرایط استریل میزان یک میلی‌لیتر نمونه برداشت شود. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ با 8000 دور در دقیقه و به مدت 15 دقیقه قرار داده شود. محلول صاف رویی بدون باکتری به عنوان محلول آنزیمی استفاده شود. برای نگهداری طولانی مدت، محلول آنزیمی در ظرف یخ و در فریزر دمای 28- درجه سلسیوس قرار داده شود.

- تهیه استانداردهای گلوکز

یک‌دهم گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر حل شود و سپس رقت‌های 0/0 ، 0/05 ، 0/1، 0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و یک از آن تهیه شود. سپس 400 میکرولیتر از هر رقت به 400 میکرولیتر از محلول DNS اضافه شود و همانند ترتیبی که در قسمت بالا گفته شد جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS-CE2040 در طول موج 540 نانومتر قرائت شود.

- تعیین فعالیت آنزیم و تعریف واحد آنزیمی

یک میلی‌لیتر از سوبسترا به لوله آزمایش دارای یک میلی‌لیتر از محلول صاف رویی منتقل شود و پس از مخلوط کردن داخل انکوباتور دمای 40 درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شود. پس از یک ساعت 400 میکرولیتر از نمونه داخل هر لوله آزمایش را در لوله دیگری منتقل کرده و 400 میکرولیتر از محلول DNS را به آن اضافه شود. لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار گیرد و پس از سرد شدن 3/2 میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها افزوده و توسط ورتکس[1] محتویات آن‌ها خوب مخلوط شود. لوله‌ها به مدت 20 دقیقه به حال خود رها سپس جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS-CE2040 در طول موج 540 نانومتر قرائت شود. با تقسیم جذب هر نمونه بر زاویه خطی منحنی استاندارد گلوکز، غلظت کلی قندهای احیا کننده به دست می‌آید (Miller, 1959). برپایه تعریف یک

[1] Vortex

واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول گلوکز را در شرایط استاندارد نمونه آزاد نماید.

**۸-۱-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم Exo-β-1,4 Glucanase**

آنزیم‌های اگزوگلوکاناز دارای فعالیت اندکی روی کربوکسی متیل سلولز هستند، ولی فعالیت بالایی را روی آویسل نشان می‌دهند. سلولز آمورف و سلوالیگوساکاریدها، سوبستراهای مناسبی برای اگزوگلوکانازهای خالص شده هستند؛ ولی باید در نظر داشت که اندوگلوکانازها نیز می‌توانند از این سوبستراها استفاده کنند. پس می‌توان گفت که برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز از آویسل یا سلولز متورم شده با اسید فسفریک استفاده می‌شود. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اگزوگلوکاناز با آویسل به شرح زیر است (Zhang *et al*., 2009):

مواد لازم:

1- آویسل (FMS PH 101 or PH 105 or Sigmacell 20)

2- بافر استات سدیم (0/1 مولار با pH=8)

3- محلول فنل پنج درصد

4- اسید سولفوریک 98%

مراحل کار:

1- تهیه سوسپانسیون آویسل 1/25% در بافر استات‌سدیم (میزان رطوبت آویسل لحاظ شود).

2- افزودن 1/6 میلی‌لیتر از سوسپانسیون آویسل به لوله آزمایش (13×100میلی متر)

3- در صورت لزوم تهیه سری رقت آنزیم با بافر استات سدیم

4- به تعادل رسیدن سوبسترا (سوسپانسیون آویسل) و محلول آنزیمی در حمام بخار در دمای 50°C

5-0/4 میلی لیتر از محلول آنزیمی (پس از بن ماری در دمای 50°C) با 1/6 میلی‌لیتر آویسل مخلوط شود.

6- مخلوط در دمای 50°C انکوباسیون شود.

7- برای متوقف کردن واکنش آویسل با آنزیم، در مخلوط آب و یخ قرار داده شود.

8- یک میلی‌لیتر مخلوط آنزیمی و سوبسترا را در میکروتیوب ریخته و به مدت سه دقیقه در دور 13000 سانتریفیوژ شود.

9- برای تهیه شاهد آنزیمی 1/6 میلی‌لیتر بافر استات با 0/4 میلی‌لیتر محلول آنزیمی مخلوط شود.

10- برای تهیه شاهد سوبسترا 1/6 میلی‌لیتر از آویسل 1/25% با 0/4میلی لیتر بافر استات مخلوط شود.

11- برای تعیین قند محلول کل در محلول رویی به روش فنل –اسید سولفوریک مراحل زیر انجام شود:

11-1- در لوله آزمایش مقدار 0/7 میلی‌لیتر از محلول رویی با 0/7 میلی لیتر فنل مخلوط شود.

11-2- با احتیاط کامل مقدار 3/5 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به محتویات لوله ازمایش اضافه شود.

11-3- پس از تعادل در دمای اتاق به مدت 20 دقیقه شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 490 نانومتر قرائت شود.

12- فعالیت آنزیم بر اساس رابطه خطی بین مقدار کل قند آزاد شده و سری رقت آنزیمی محاسبه شود. هر واحد فعالیت آنزیم اگزو گلوکاناز معادل مقدار آنزیمی است که بتواند معادل یک میکرو گرم گلوکز را از آویسل در هر دقیقه آزاد نماید.

**۸-۱-٤- اندازه گیری فعالیت آنزیم β-1,4-Glucosidase**

روش اندازه‌گیری آنزیم بتا گلوکوزیداز با سلوبیوز به شرح زیر است (Zhang *et al.*, 2009):

مواد موردنیاز:

1- سلوبیوز 15 میلی مول تازه تهیه شده در بافر سیترات

2- بافر سیترات 50 میلی مول با pH= 4/8

مراحل کار:

یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی داخل لوله آزمایش ریخته شود.

2- محلول آنزیمی و سوبسترا (سلوبیوز 15 میلی مول) در دمای 50°C به تعادل رسد.

3- به لوله آزمایش دارای عصاره آنزیمی یک میلی لیتر سوبسترا اضافه و سپس در دمای 50°C به مدت 30 دقیقه قرار داده شود.

4- لوله آزمایش به مدت پنج دقیقه روی حمام بخار قرار گیرد و سپس لوله‌ها بلافاصله به مخلوط آب و یخ منتقل شود تا واکنش متوقف شود.

5- شاهد سوبسترا شامل مخلوط یک میلی‌لیتر سلوبیوز و یک میلی‌لیتر بافر سیترات تهیه شود.

6- شاهد آنزیم شامل مخلوط یک میلی‌لیتر محلول سلوبیوز و یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی رقیق شده (مقادیر مختلف از محلول گلوکز آماده) است. نکته اینکه مراحل تهیه محلول شاهد سوبسترا و شاهد آنزیمی همانند محلول آنزیمی نمونه‌ها است.

7- با افزودن محلول آماده کیت بر اساس دستورالعمل کیت گلوکز اکسیداز مقدار آزادسازی قند پس از رسیدن به تعادل در دمای اتاق و تثبیت رنگ صورتی ایجاد شده با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 546 -500 نانومتر قرائت شود.

8- مقدار گلوکز واقعی نمونه بر اساس رابطه و منحنی استاندارد بین مقدار گلوکز کیت گلوکز و قرائت دستگاه محاسبه شود.

## منابع

کاری‌دولت‌آباد، ح. 1400. جداسازی، شناسایی و تعیین کارایی فعال‌کننده زیستی باکتریایی و قارچی از منابع مختلف. موسسه تحقیقات خاک و آب. 58 ص.

کاری دولت‌آباد، ح؛ صفاری، ح و رحمتی، م. 1400. جداسازی و شناسایی برخی جدایه‌های باکتریایی و قارچی بر اساس آزمون کیفی فعالیت سلولازی و لیگنینازی از منابع مختلف. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار. 11(4):141-159.

Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology advances, 15(3-4): 583-620.

Cho, C.F. and Lee, W.C. 1999. Formulation of a biocontrol agent by entrapping biomass of *Trichoderma viride* in gluten matrix. Journal of bioscience and bioengineering, 87(6): 822-824.

Colowick, S. P. and Kaplan, N.O. 1955. In: Methods in Enzymology. Academic Press INK London. pp: 149-158.

Deobald, L.A., Crawford, D.L. 1997. Lignocellulose biodegradation. In: Hurst CJ., Knudsen GR, Stetzenbach L. D. and Watter, M. V. (EDs.). Manual of Environmental Microbiol. ASM press, Washington DC, USA. pp: 730-737.

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.

Galai, S., Limam, F. and Marzouki, M.N. 2009. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes. Applied Biochemistry and Biotechnology. 158: 416-431.

Golueke, C.G. 1991. Principles of composting. The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting. The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, pp.14-27.

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.

Howard, R.L., Abotsi, E.L.J.R., Van Rensburg, E.J. and Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of biotechnology, 2(12): 602-619.

Juhasz, T., Szengyel, Z., Szijarto, N. and Reczey, K. 2004. The effect of pH on the cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. Applied Biochemistry and Biotechnology, pp: 201-211.

Kluepfel, D. 1988. Screening of prokaryotes for cellulose & hemicelluloses degrading enzymes methods. In: Methods in Enzymology. pp: 160-180.

Lawford, H.G. and Rousseuu, J.D. 2003. Cellulosic fuel ethanol alternative fermentation process designs with wild type an recombinant *Zymomona mobilis*. Applied Biochemistry and Biotechnology 105: 457- 469.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G. and Bhat, M.K. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiology and molecular biology reviews, 64(3): 461-488.

Malherbe, S. and Cloete, T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 1(2):105-114.

Mandels, M., Andrestti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnology and bioengineering symposium, 6: 17.

Miller, G.L. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, 31: 426-428.

Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E. 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Applied and Environmental Microbiology, 34: 777–782.

Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogamie Mycologie, 18: 19-70.

Rossmann, S.N., Cernoch, P.L. and Davis, J.R. 1996. Dematiaceous fungi are an increasing cause of human disease. Clinical infectious diseases, 22(1): 73-80.

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.*

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.

Shallom, D. and Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Current opinion in microbiology, 6(3): pp. 219-228.

Singh, A., Abidi, A.B., Agrawal, A.K. and Darmwal, N.S. 1991. Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. Zentralblatt für mikrobiologie, 146(3):181-184.

Stewart, B.J., Leatherwood, J.M. 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. J. Bacteriology. 128: 609-615.

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.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72: 169-183.

Vargas-Garcı, 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.

Wood, T.M. and McCrae, S.I. 1982. In "Enzymatic hydrolysis of cellulose" Carbohydrate Research, 110: 291 – 303.

Zhang, Y.H.P., Hong, J. and Ye, X. 2009. Cellulase assays. Methods in Molecular Biology. 581: 213-231.