فصلنامه علوم‌محیطی، دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳

۷۴-۶۵

بررسی تجزیه‌زیستی تفاله و پسماند چای و تراشه‌های درخت بلوط توسط قارچ گنودرما

اعظم جوانمرد[۱*]، مهناز مظاهری اسدی[۲] و مهران کیانی راد[۳]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

[۳] دانشیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

چکیده

پسماندهای گیاهی و ضایعات کشاورزی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات لیگنینی و سلولزی می‌باشد. در پی رشد جمعیت انسانی و افزایش کشت، تولید و مصرف، دفع این مواد در این حجم امروزه به‌یک معضل مهم محیط‌زیستی تبدیل شده است. این در حالی است که میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات فوق، نه‌تنها نقش مهمی در عدم فساد و رفع آلودگی ناشی از انباشته شدن آن‌ها دارند، بلکه توانایی بازیافت این زیست‌توده‌ها و تبدیل آن‌ها، به مواد با ارزش و بازیافت‌کننده انرژی سازگار با محیط‌زیست را فراهم می‌نمایند. در این تحقیق امکان تجزیه تفاله و پسماند چای‌سیاه به‌همراه تراشه‌های چوب بلوط توسط قارچ گنودرما *Ganoderma* sp. شماره ثبت MM ۱۹۸۷ مورد ارزیابی قرار گرفت. دو محیط کشت حاوی تراشه‌های چوب بلوط و تفاله چای‌سیاه با نسبت‌های متفاوت ۱:۱ و ۴:۱ به‌ترتیب انتخاب شدند. بیش‌ترین بازده رشد و تشکیل سریع کلاهک در محیط حاوی مواد به‌نسبت ۱:۱ مشاهده گردید. وضعیت رشد قارچ در هر دو محیط با سطح اطمینان $p<۰/۰۵$ به‌دست آمد. از طرفی، اختلاف معناداری برای رشد میسلیوم قارچ در دو محیط مشاهده نشد و از نظر آماری و اندازه‌گیری نسبت وزنی، نمونه‌ها یکسان بودند. بر اساس نتایج به‌دست آمده محیط حاوی مواد به‌نسبت ۱:۱ با سرعت کمی بیش‌تر و در مدت ۴۴ روز وارد مرحله تشکیل کلاهک گردید. pH بهینه برای تولید آنزیم‌های قارچی تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنین در هر دو محیط به‌ترتیب بهینه‌سازی محیط‌ها ۷۹/۳ و ۹۴/۳ تعیین شد. نتایج نشان داد تفاله چای‌سیاه به‌همراه تراشه‌های چوب بلوط منابع مناسب برای تجزیه توسط قارچ گنودرما محسوب می‌شوند.

کلمات‌کلیدی: پسماندهای کشاورزی، گنودرما، بافت چوب، قارچ گنودرما، زیست‌توده.

Biodegradation Study of Waste Tea and Oak chips Using the Mushroom Ganoderma sp. MM1987

Azam Javanmard,[1*] Mahnaz Mazaheri Asadi[2] & Mehran Kiani Rad[3]

[1] *MCs. Of Microbiology, TehranT Iran*

[2] *Professor, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Biotechnology Institute*

[3] *Associate Professor, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Biotechnology Institute*

Abstract

Lignin and cellulose are the remarkable portions of plants biomass and agricultural wastes. In the wake of population growth and as a consequence of intensive agriculture activities and human food and other materials' consumption, these compounds are becoming a burgeoning problem to our society and environment. However, microorganisms with the capability of biodegradation of such complex materials have not only an important role in prevention of spoilage of the wastes, but also the potential as good resource for production of high value, environmental friendly waste recycling and energy recovery. In this study, an evaluation was conducted using fungus *Ganoderma sp.* MM1987 growing on decomposing pulp of black tea with oak wood chips. Oak wood chips and black tea pulp are the two substrates which the various ratios of 1:1 to 4:1 of a mixture of them were tested, respectively. The most efficient and rapid formation cap growth was observed in the medium containing a 1:1 ratio. Mushroom growth curve on both substrates with a confidence p value <0.05 was obtained respectively. However, no significant difference was observed for mycelia growth in both substrates where the samples were identical using statistical weight ratio measurements. The 1:1 ratio of substrates can speed up the cap formation in a 44-day time scale. The optimum pHs for the production of fungal enzymes degrading lignin compounds were determined as 3.79 and 3.94 respectively. In conclusion, the results show that black tea residues with oak wood chips are appropriate substrates to be decomposed by *Ganoderma sp.* MM1987.

Keywords: Agricultural waste, Biodegradation, Oak chips, *Ganoderma sp.*, Lignocellulolytic compounds, Biomass.

* Corresponding author. *E-mail Address*: mb.javan@rocketmail.com

۱- مقدمه

هر سال در سراسر جهان با تولید محصولات کشاورزی و رشد گیاهان، مقادیر زیادی پسماندهای کشاورزی مانند چوب ذرت ، سبوس برنج، تفاله نیشکر (باگاس)، پوست میوه مرکبات، کاهو، تفاله چای‌سیاه و غیره تولید می‌گردد. این مواد به‌طور کامل مورد استفاده قرار نمی‌گیرند [۱].

ضایعات کشاورزی و پسماندهای گیاهی دارای مقادیر بالایی از ترکیبات لیگنینی و سلولزی می‌باشند [۲]. چای‌سیاه از پای‌جوش‌های جوان و عمدتاً ۲ تا ۴ برگ اول بانضمام جوانه، تولید می‌شود. سایر برگ‌های قدیمی چای که در چای‌سازی به‌کار نمی‌روند و جزء ضایعات لاینفک صنعت تولید چای‌سیاه محسوب شده و به‌عنوان ضایعات چای، در ردیف پسماندهای کشاورزی قرار می‌گیرند [۳].

برگ‌های تازه چای حاوی ۱۰ تا ۳۰ درصد (بر مبنای وزن خشک) ترکیبات پلی فنلی، اسیدهای فنلی، گلیکوزیدها و هم‌چنین محتوی ویتامین های متنوع، ترکیبات آروماتیکی و برخی دیگر از ترکیبات با وزن مولکولی کم و با قدرت تجزیه آسان می‌باشد [۴].

قارچ‌ها توسط آنزیم‌های خارج سلولی تجزیه‌کننده خود، قابلیت تجزیه ترکیب‌های فنلی و غیر فنلی را دارند [۵]. گونه‌های قارچی مختلف جنس های *Ganoderma* و *Pleurotus* با تولید این آنزیم توانایی تجزیه طیف وسیع از آلاینده‌های شیمیایی خطرناک را در محیط‌زیست دارند [۶]. قارچ گنودرما لوسیدوم متعلق به خانواده گنودرماتاسه[۱] می‌باشد و برای اولین بار در سال ۲۲۷-۲۲۱ میلاد مسیح در زمان امپراتور چین شینگ هانگ[۲] در مورد توجه قرار گرفت [۷] . وجود این قارچ به‌طور گسترده در خاور شرق، کوه‌های راکی و در برخی مناطق غربی گزارش شده است [۸]. به اجسام میوه‌ای قارچ درکره، یئونگجی[۳] ؛ درژاپن ریشی[۴]و درچین لینگزی[۵] اطلاق می‌گردد [۱۰و۹].

گنودرما با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی[۶] خود، توانایی تجزیه لیگنین و یا تجزیه توام سلولز و لیگنین را به‌طور هم‌زمان دارند. هم‌چنین آن‌ها قادرند به‌شکل بیماری‌زا و یا ساپروفیت بر روی ریشه و پوست بافت چوبی سخت و نرم درختی رشد نماید [۱۱] .

به‌منظور افزایش رشد و بهبود عملکرد این میکروارگانیسم در محیط، می‌توان از ضایعات سلولزی و یا خاکاره چوب‌های سخت مانند بلوط، نارون، شمشاد جنگلی، مَمرَز ، خرمالو، انجیلی (آسوندار) وکلهو استفاده نمود [۱۲]. سه آنزیم تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنین شامل منگنز پراکسیداز[۷]، لیگنین پراکسیداز[۸] و لاکاز[۹] توسط قارچ گنودرما سنتز و در محیط آزاد می‌گردد. میزان فعالیت این آنزیم‌ها در میان سویه‌های مختلف این قارچ و برحسب تنوع سوبسترای تشکیل‌دهنده محیط کشت قارچ متغیر است [۱۳].

مازاد سوبسترای حاصل از کشت این قارچ، به‌منظور تهیه مواد غذایی حیوانات، بهبود تهویه خاک، کشت مجدد قارچ و تهیه مواد مغذی برای گیاهان و فرآیند تجزیه‌زیستی نیز بهره می‌گیرند [۱۲]. در سال ۲۰۰۸ کیپور و همکارانش توسط کلروفرم از کلاهک‌های جمع‌آوری شده گنودرما عصاره‌ای را استخراج نمودند. این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس سوبتلیس[۱۰] و استافیلوکوکوس اورئوس[۱۱] و انتروکوکوس فکالیس[۱۲] در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکولی[۱۳] و سودوموناس آئروژینوزا[۱۴] دارای اثر مهاری است [۱۴].

هدف از این مطالعه، بررسی تجزیه پسماندهای گیاهی توسط قارچ گنودرما می‌باشد. نوآوری این تحقیق نسبت‌به سایر موارد، استفاده از برگ‌های قدیمی چای‌سیاه که به‌عنوان ضایعات چای و در ردیف پسماندهای کشاورزی محسوب می‌شود برای کشت قارچ گنودرما می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانیسم و مواد اولیه

سویه قارچ مورد استفاده در این مطالعه *Ganoderma* sp.MM1987 بود که از کشور چین تهیه گردید.

ضایعات چای‌سیاه از کارخانه چای‌سازی محسن و تراشه‌های چوب بلوط از کارخانه چوبین پارس و کلیه معرف‌ها و مواد شیمیایی و یا محیط کشت‌ها از شرکت‌های مرک آلمان و شارلو اسپانیا خریداری گردیدند. قبل از کشت و پرورش قارچ لازم است ضایعات چای‌سیاه به‌مدت ۳ دقیقه در آب جوش، سپس ضایعات چای و تراشه‌های چوب بلوط به‌مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شوند.

آماده‌سازی و فرمولاسیون محیط‌های کشت سویه قارچی در محیط‌کشت حاوی(PDA (Potato Dextrose Agar

با pH=۵-۶ و در دمای ۲±۲۸ سانتی‌گراد به صورت اسلنت کشت و درون یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و تجدید کشت آن هر ۱۵ روز یکبار انجام گرفت [۱۵]. در این تحقیق دو محیط کشت، حاوی تراشه‌های چوب بلوط و تفاله‌های چای‌سیاه با نسبت‌های متفاوت در نظر گرفته شد [۱۶]. این طرح در قالب طرح کاملا تصادفی و در ۳ تکرار انجام گرفت. کلیه تجزیه و تحلیل‌های نتایج با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵٪ توسط نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت.

۲-۲- محیط‌های کشت

محیط کشت (الف): این محیط کشت حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه به‌نسبت ۴:۱ بود. به‌ازای هر فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری ۶۰ گرم محیط کشت شامل ۴۵ گرم تراشه‌های چوب بلوط و ۱۵ گرم (۵۰٪ وزن خشک) ضایعات چای بود [۱۷].

محیط کشت (ب): به‌ازای هر فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری ۶۰ گرم محیط کشت شامل چیپس چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه (نسبت ۱ : ۱) معادل ۳۰ گرم چیپس چوب بلوط و ۳۰ گرم تفاله چای اضافه شد [۷]. تلقیح میکروارگانیسم به‌هر دو محیط کشت، براساس وزن خشک میسلیوم در هر لیتر مایع در نظر گرفته شد. ۱۰ میلی‌لیتر یا ۳ گرم وزن تر (۱۰w/w٪) توسط استوانه مدرج در شرایط استریل به‌هر محیط کشت تلقیح گردید. سپس محتوی درون هر فلاسک به‌همراه میسلیوم تلقیح شده به آرامی تکان داده شد تا دانه های مربوط به میسلیوم قارچی در محیط پخش شوند. تمامی محیط‌های کشت به انکوباتورمدل NV-SD 9002 با دمای۲ ± ۲۸ انتقال یافتند. با توجه به نتایج مشاهده شده در نمودار ۱ و۲ ، محیط کشت (الف) پس از ۸ روز و محیط کشت (ب) پس از مدت ۷ روز به‌طور کامل بامیسلیوم‌های قارچی پوشیده شدند، پس از این مرحله نمونه‌ها به‌مدت یک روز در یخچال قرار گرفتند تا شوک سرمایی به آن‌ها وارد شود، سپس به انکوباتور مدل Memmert INE 400 با دمای ۲ ±۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. از این زمان تا آغاز مرحله تشکیل کلاهک، به‌طور روزانه نمونه‌ها وزن شدند تا ضریب رشد میکروارگانیسم طبق معادله (۱) محاسبه گردد [۱۸].

$$\text{ضریب رشد} = \frac{\text{لگاریتم وزن نهایی} - \text{لگارتم وزن اولیه}}{\text{مدت زمان آزمایش}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

سنجش pH: محیط‌های کشت حاوی میسلیوم قارچ در آون (مدل Tehran-STR)، ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک ، سپس ۱ گرم از ماده خشک هر محیط به‌طور جداگانه به فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ عدد گوی شیشه‌ای اضافه شدند. نمونه‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۱/۵ ساعت در شیکر (مدل Clim - O – shake system) با دور ۱۸۰RPM شیک، سپس در محلی ساکن قرار گرفتند. تغییرات به‌وسیله pH، توسط pHمتر دیجیتال (ECOMet) اندازه‌گیری شد [۱۹].

سنجش پروتئین قارچ: میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml) با روش لوری اندازه‌گیری شد [۲۰].

اندازه‌گیری خاکستر: وزن اولیه بوته‌چینی با ترازوی دیجیتال (مدل KERNpLE) اندازه‌گیری، سپس به‌مدت ۳ ساعت در آون (مدل Tehran.STR) ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کامل خشک و فاقد اثرات چربی گردد. در انتها در دسیکاتور سرد و توزین شد. ۱ گرم از نمونه محیط کشت و میسلیوم به‌همراه بوته‌چینی وزن و بر روی شعله قرار گرفت تا کامل سوزانده شوند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۵ ساعت در کوره (مدل Heraeus instrument) با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده گرفتند. پس از اتمام کار، مجدد داخل دسیکاتور سرد و توزین و با ترازوی دیجیتال وزن شدند. درصد خاکستر، طبق معادله (۲) محاسبه گردید [۲۱].

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{وزن خاکستروبوته} - \text{وزن بوته}}{\text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

۳- نتایج و بحث

نمودار رشد قارچ در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، بازده محیط کشت (ب) حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه به‌نسبت ۱:۱ به‌طور معنی داری بیش از محیط کشت (الف) حاوی همین مواد به‌نسبت ۴:۱ است. با توجه به یکسان بودن نوع مواد بستر، علت تفاوت در مدت زمان رسیدن به مرحله تشکیل کلاهک را می‌توان به‌نسبت متفاوت مواد نسبت داد [۲۳، ۲۲] .

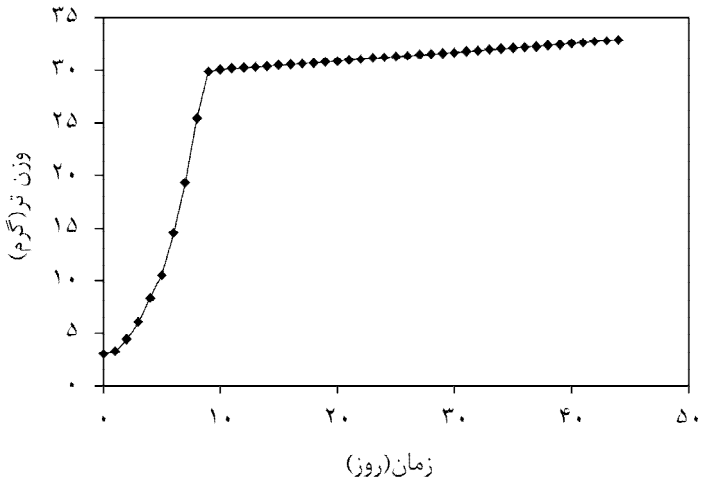
نتایج رشد قارچ گنودرما در محیط‌های کشت با توجه به نمودار تغییر رشد قارچ گنودرما در شکل (۱)، محیط کشت (الف) به‌مدت ۴۶ روز گرماگذاری شد تا وارد مرحله تشکیل کلاهک گردد، در حالی‌که در نمودار تغییر رشد قارچ گنودرما در شکل ۲، مدت زمان شروع فاز تشکیل کلاهک پس از ۴۶ روز تعیین گردید.

۳-۱- نتایج مربوط به نمودار رشد قارچ در محیط‌های متفاوت کشت

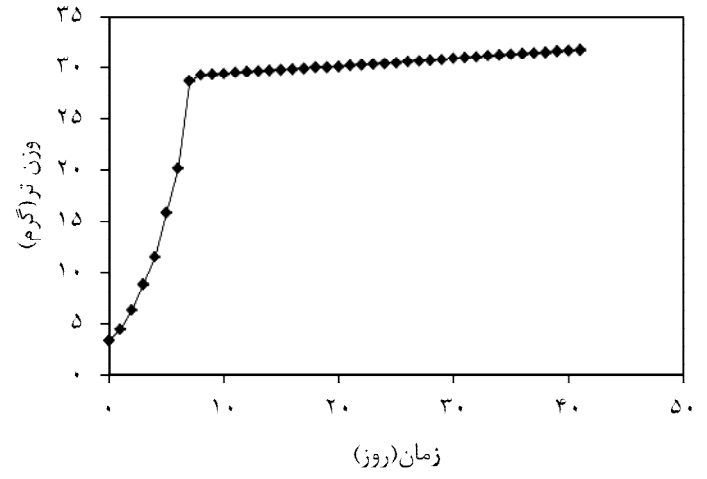
محیط کشت (الف): نمودار رشد قارچ در محیط کشت (الف) حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه به‌نسبت۴:۱ در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

پس از طی مدت زمانی، قارچ با محیط سازگار شده و در مراحل بعد با تجزیه بستر کشت، قابلیت استفاده از مواد موجود در محیط کشت را به‌دست آورد. منحنی در روز ۸ پس از گرماگذاری به حد اکثر رشد لگاریتمی خود رسد و تا مرحله تشکیل کلاهک در روز ۴۶ سرعت و آهنگ رشد قارچ به صورت صعودی و ثابت ادامه یافت.

محیط کشت (ب): نمودار رشد قارچ در محیط کشت (ب) حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه به‌نسبت ۱:۱ در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۱- نمودار رشد قارچ گنودر ما در محیط کشت (الف)



شکل ۲- نمودار رشد قارچ گنودرما در محیط کشت (ب)

پس از طی ۷ روز گرماگذاری، رشد میسلیوم قارچ به حداکثر رشد لگاریتمی خود رسید و پس از آن منحنی رشد تا آغاز مرحله تشکیل کلاهک در روز ۴۴، به صورت صعودی و ثابت پیش رفت.

در این تحقیق تلقیح قارچ به محیط‌های کشت، در فاز مایع صورت گرفت. مزیت تلقیح قارچ در فاز مایع در مقایسه با زمانی که از میسلیوم رشد یافته بر روی آگار استفاده می‌شود این است که محیط کشت مایع رطوبت بیش‌تری نسبت‌به محیط کشت جامد دارد، هم‌چنین میسلیوم رشد یافته در محیط مایع نیاز به تغییر فرم ندارد، در حالی‌که میسلیوم رشد یافته بر روی آگار جهت سازگاری با شرایط محیط کشت از یک فرم رویشی به فرم دیگر تغییر شکل مورفولوژیکی می‌دهد. این تغییر شکل موجب کند شدن رشد قارچ می‌شود. در حالی‌که میسلیوم‌های رشد یافته در محیط مایع نیاز به سازگاری و تغییرات مورفولوژیکی ندارند. بیش‌تر فعل و انفعالات در محیط مایع انجام می‌شود بنابراین برای افزایش در سرعت رشد، تلقیح به محیط‌های کشت از میسلیوم‌های رشد یافته در فاز مایع صورت گرفت. در هر دو محیط کشت در مراحل آغازی رشد قارچ، میسلیوم‌ها کرکی و به رنگ خاکستری بودند و در مراحل پیشرفته رشد، رنگ میسلیوم‌ها سفید شد، علت این تغییر رنگ را می‌توان به سازگار شدن میکروارگانیسم با شرایط محیط کشت نسبت داد. قبل از ورود به مرحله تشکیل کلاهک و پس از این‌که میسلیوم‌های قارچ در تمامی محیط کشت رشد یافتند، لازم است به محیط‌ها شوک سرمایی داده شود. تحت اثر این شوک میسلیوم‌های قارچ از فرم رویشی خود خارج و وارد مرحله بعدی از رشد، یعنی تشکیل اندام زایشی (کلاهک) می‌شوند.

نتایج مربوط به مقایسه ضریب رشد قارچ گنودرما در شکل ۳ مشاهده می‌شود. تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون مقایسه‌ای میانگین چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. نتایج نشان داد میانگین عدد مربوط به ضریب رشد قارچ در محیط کشت(ب) برابر با ۲۸/۲۲ و برای محیط کشت(الف) ۲۵/۵۴ تعیین شد. میزان عددی ضرب رشد قارچ در محیط کشت(الف) در مقایسه با محیط کشت(ب) کاهش قابل توجهی از خود نشان داد، هم‌چنین مقایسه انحراف معیار تست‌ها نشان داد تفاوت معنادار میان دو محیط کشت از نظر آماری و اندازه‌گیری وزنی نمونه مشاهده نمی‌شود. رشد میسلیوم قارچ در محیط کشت حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای‌سیاه به‌نسبت ۴:۱ (محیط کشت الف) در مقایسه با محیط حاوی این موتد به‌نسبت ۱:۱ (محیط کشت ب) کم‌تر و از نظر زمانی کمی دیرتر وارد مرحله تشکیل کلاهک گردید. بنابر این محیط کشت(ب) به‌عنوان بهترین محیط کشت جهت پرورش قارچ گنودرما بوده و قابلیت بالایی از نظر تجزیه ضایعات کشاورزی در این محیط دیده شد. در مقایسه با این تحقیق در سال ۲۰۱۰ پکسن و همکاران بر روی نسبت‌های متفاوت ضایعات چای (۱۰-۱۵-۲۰ و ۲۵٪) را به‌طور جاگانه با خاکاره چوب بلوط و هم‌چنین صنوبر، قارچ *Ganoderm alucidum* را کشت و مشاهده نمودند نمونه حاوی ضایعات چای به‌نسبت ۲۰٪ و خاکاره ها بیش‌ترین بازده را برای کشت قارچ داشت [۲۴]. در ابتدای مراحل رشد لازم است مواد غذایی موجود در محیط کشت، در دسترس میکروارگانیسم قرار گیرد، ضمن استفاده از مواد ساده و قابل دسترس، خود را با شرایط موجود در

شکل ۳- مقایسه ضریب رشد قارچ گنودرما در دو محیط کشت متفاوت (error bar انحراف معیارهمراه با ۳ تکرارمی‌باشد)

محیط کشت سازگار و در مراحل بعدی رشد بتواند با تجزیه مواد غذایی پیچیده تر انرژی مورد نیاز برای رشد و تکامل خود را فراهم نماید. با توجه به این‌که شرایط دمایی و نوع مواد تشکیل‌دهنده هر دو محیط کشت یکسان است علت اصلی تفاوت در مدت زمان ورود به مرحله تشکیل کلاهک را به‌نسبت مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت میتوان نسبت داد. نمودار ضریب قارچ در هر دو محیط نشان داد محیط کشت(ب) به‌دلیل این‌که دارای مقادیر بیش‌تری از ضایعات چای است، دارای رشد سریع‌تری در مقایسه با محیط کشت(الف) است. ضایعات چای محتوی ویتامین‌های متنوع، ترکیب‌های فنولی متنوع و مولکول‌های کم‌وزن است که به‌آسانی تجزیه می‌شوند [۲۵و۲۳].

مواد فنولی ساده که در ضایعت چای‌سیاه وجود دارد در مقایسه با ترکیب‌های پیچیده لیگنینی موجود در تراشه‌های چوب بلوط به آسانی در دسترس قارچ قرار می‌گیرند. محیط کشت(ب) حاوی درصد بالاتری از ضایعات چای‌سیاه است و میکروارگانیسم در مدت زمان طولانی‌تر از مواد ساده و قابل دسترس استفاده می‌کند. وجود درصد بالاتر ضایعات چای‌سیاه، موجب تولید بیش‌تر آنزیم‌های خارج سلولی و غیر اختصاصی توسط گنودرما شد، در نتیجه برای دستیابی‌به ترکیب‌های پیچیده، سازگاری بیش‌تری می‌یابد و در مراحل بعد با تجزیه سایر ترکیب‌های فنلی و لیگنینی دیرهضم و غیرقابل دسترس موج تکثیر میسلیوم‌های خود شده و بنابر این کمی سریع‌تر وارد فاز تشکیل کلاهک می‌شود. با توجه به ساختار ساده این ترکیب‌ها در مقایسه با ترکیب‌های پیچیده لیگنینی موجود در تراشه‌های چوب بلوط، به‌راحتی در دسترس میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند. حال در این محیط کشت درصد تفاله چای بیش‌تر است و میکروارگانیسم این امکان را دارد که مدت زمان طولانی‌تری از مواد ساده و در دسترس را استفاده نماید و برای دستیابی به ترکیب‌های پیچیده‌تر سازگاری بیش‌تری پیدا کند. وجود تفاله چای بیش‌تر موجب تولید میزان بیش‌تری از آنزیم‌های خارج سلولی و غیراختصاصی توسط گنودرما شده و به این ترتیب میکروارگانیسم قادر است با تجزیه سایر ترکیب‌های فنولی و لیگنینی دیر هضم که در تراشه‌های چوب بلوط وجود دارد و در مراحل اولیه قابل دسترسی نمی‌باشند، تکثیر میسلیوم‌های خود را تا مرحله تشکیل کلاهک ادامه دهد و بنابراین کمی سریع‌تر وارد فاز تشکیل کلاهک می‌شود.

۳-۲- نتایج اندازه‌گیری میزان رطوبت موجود در میسلیوم قارچ گنودرما

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رطوبت قارچ گنودرما در جدول ۱ آمده است.

میزان رطوبت موجود در محیط کشت به‌همراه میسلیوم بر حسب درصد وزنی در محیط کشت(ب) معادل ۳/۴۶ درصد و در محیط کشت(الف) معادل ۳/۴۲ درصد می‌باشد. در میان دو محیط کشت تفاوت قابل ملاحظه ای از نظر میزان رطوبت مشاهده نشده است. در مورد میزان رطوبت موجود در میسلیوم قارچ به‌تنهایی برحسب درصد وزنی در محیط کشت(ب) ۳/۰۱ درصد و در محیط کشت(الف) ۲/۹۵ درصد می‌باشد. تفاوت میان میزان رطوبت میسلیوم به‌تنهایی در این دو محیط کشت ۱/۰۶ درصد است. یعنی میزان رطوبت میسلیوم قارچ در محیط کشت(ب) ۱/۰۶ درصد بیش‌تر است.

۳-۳- نتایج مربوط به تغییرات pH در قارچ گنودرما

نتایج مربوط به تغییرات pH طی مراحل رشد قارچ گنودرما در محیط‌های کشت در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۱- نتایج اندازه‌گیری رطوبت نسبی قارچ گنودرما در محیط کشت

محیط	وزن ظرف(گرم)	محیط + میسلیوم	محیط + میسلیوم خشک	درصد وزن خشک
۱	۷۴/۰۴	۱۰۸/۲۹	۸۴/۳	۳/۴۲
۲	۲۶/۵۴	۸۹/۷۴	۶۵/۴	۳/۴۶
محیط	وزن ظرف(گرم)	ظرف + اندامک هوایی	محیط + میسلیوم خشک	درصدوزن خشک
۱	۳۴/۲۶	۳۵/۲۴	۳۷/۲۱	۲/۹۵
۲	۳۳/۴۲	۳۳/۷۷	۳۴/۲	۳/۰۱

جدول۲- نتایج اندازه‌گیری pH قارچ گنودرما

محیط کشت	میانگین pH
الف	۳/۹۴ ± ۰/۰۱
ب	۳/۷۹ ± ۰/۰۰۵

در مقایسه‌ای که میان تغییرات pH محیط کشت در ابتدای کشت و در انتها پس از تشکیل کلاهک انجام گرفت، مشاهده شد تغییرات pH محیط کشت در ابتدای کشت، اسیدی و پس از پرورش قارچ، اسیدی‌تر شد. pH بهینه برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنین خارج سلولی در قارچ در محیط(ب) ۳/۷۹ و در محیط (الف) ۳/۹۴ تعیین شد. تجزیه مواد فنلی و لیگنینی و مواد مشابه موجود در محیط کشت توسط گنودرما می‌تواند موجب افزایش یون H^+ درنتیجه موجب کاهش بالای pH یا اسیدی تر شدن pH محیط می‌گردد.

۳-۴- نتایج اندازه‌گیری پروتئین قارچ گنودرما

نتایج اندازه‌گیری پروتئین قارچ گنودرما بر حسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر در جدول ۳ آمده است.

جدول۳- نتایج اندازه‌گیری پروتئین قارچ گنودرما بر حسب mg/ml

محیط کشت	میانگین
الف	۰/۷۳ ± ۰/۰۰۶
ب	۰/۵۱ ± ۰/۳۷۵

بر اساس نتایج میزان پروتئین موجود در ۱ گرم از قارچ در محیط کشت(الف) در مقایسه با محیط کشت(ب) به‌میزان ۰/۲۲ mg/ml کم‌تر است. علت افزایش این مقدار می‌تواند تأکیدی بر تجزیه بیش‌تر ضایعات چای‌سیاه به‌همراه تراشه‌های چوب بلوط توسط قارچ گنودرما می‌باشد.

۳-۵- نتایج اندازه‌گیری خاکستر قارچ گنودرما

نتایج اندازه‌گیری میزان خاکستر قارچ گنودرما بر حسب درصد در جدول ۴ مشاهده می‌شود.

جدول ۴- نتایج اندازه‌گیری میزان خاکستر قارچ

محیط کشت	%خاکستر
الف	۶
ب	۸

با توجه به نتایج موجود در جدول ۴، درصد کربن موجود در میسلیوم حاصل از محیط کشت(ب) بیش‌تر از محیط کشت(الف) می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل اهمیت استفاده از ضایعات کشاورزی به‌منظور پرورش قارچ، علاوه‌برحذف مواد لیگنینی این ضایعات، تولید محصولی حاوی املاح و ویتامین‌های فراوان است. بنابراین با توجه به اهمیت و ضرورت پاک‌سازی محیط‌زیست از ضایعات حاصل از مواد کشاورزی می‌توان پرورش و تولید قارچ‌هایی مانند گنودرما را در برنامه اقتصادی کشور قرار داد تا با تولید و پرورش این قارچ هم با مشکل آلودگی محیط‌زیست ناشی از پسماندهای کشاورزی مبارزه نمود و هم به صنعت غذایی و دارویی کمک نمود.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد قارچ گنودرما قابلیت کشت برروی ضایعات چای‌سیاه به‌همراه تراشه‌های چوب بلوط را دارد. بیش‌ترین میزان تجزیه ضایعات در محیط کشت حاوی تراشه‌های چوب بلوط و ضایعات چای به‌نسبت ۱:۱، در pH=۳/۷۹ بود. مرحله رویشی، قارچ در دمای ^oC ۲ ± ۲۸ و برای آغاز مرحله کلاهک‌سازی پس از شوک سرمایی به دمای ^oC ۲ ± ۲۱ نیاز داشت. از نتایج به‌دست آمده، امکان تعمیم نتایج، با پرورش این قارچ در مقیاس بالاتر و حذف آلایندگی به روش تجزیه‌زیستی پسماندهای حاصل ازکشاورزی و بافت‌های گیاهی و سموم آن‌ها و هم‌چنین حذف ترکیبات لیگنینی مشابه، به‌منظور حفظ سلامت محیط‌زیست کمک شایانی نمود.

تشکر و قدردانی

لازم است در این‌جا از مساعدت‌های خانم‌ها پگاه عیدیان، سپیده شکری، مرحومه رؤیا کرمی و آقای ناصر تاجیک و پرسنل پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، به‌ویژه جناب آقای مهندس شیخی‌نژاد و سرکار خانم مهندس عمیدی تقدیر و تشکر نمود.

پی‌نوشت‌ها

[1]Ganodermatacea
[2]Shinghang
[3]Yeongji
[4]Reishi
[5]Lingzhi
[6]ExteraCelularLignolytic
[7]ManganezPeroxidaze
[8]Lignin Peroxidaze
[9]Laccase
[10]*Bacillus subtilis*
[11]*Staphylococusaureus*
[12]*Enterococcus feacalis*
[13]*Escherichiacoli*
[14]*Pseudomonas aeruginosa*

منابع

[1] Theradimani M, Thangeshwari S. Biodegradation of Agricultural Waste by White Rot Fungus, Role of Whiterot Fungi in the Biodegradation of Agricultural waste and it's Application for Diseas Management. LAP Lambert Academic Publishing; 2012; P.128.

[2] Loehr R. Agricultural waste Management: problems, prosses, and Approaches. Academic press, New York: fifth Avenue, inc.; 1974. P. 569.

[3] Farhush R, Hadad Khodaparast MH, Gol Movahed GH. Antioxidant Activity of wastes (Camellia sinensL.). Food chemistry; 2007; 100(1): 231-230.

[4] Pan X, Niu G, & Liu H. Microwave .assisted extraction of tea poly-phenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing; 2003; 42: 129-133.

[5] Revankar M. Synthetic dye decolorization by white rot fungus *Ganoderma* sp.WR-1. BioresourceTechnology; 2007; 98: 775-780.

[6] Iclal E. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr).karst cultivation on substratescontaining different protein and carbohyd rate. African Journal of Agricultural research; 2009; 4(1): 1331- 1333.

[7] Wagner R. Current techniques for the cultivation of *Ganodermalucidum* for the production of Biomass, Ganoderic Acid and Poly Sacharides. Food Technol. Biotechnol; 2003; 44(4): 371-382.

[8] Wan-Ting H, Ready T, Ruey-Shyang H, Ching-Tsan H. Oyerexpression and characterization of a thermostable. pH-stable and organic solvent-tolerant Process Biochemistry; 2011;46: 1469-1474.

[9] Fatmawatis S, Shimizu K, Kondo R. Ganoderic acid Df. Anew triterpenoid with aldose reductase activity from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Fitoterapia; 2012; 81: 1033-1036

[10] Yang F.C. Use of stillage grain from a rice – spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochem; 2010; 39(1): 21-260.

[11] Russell R, Paterson M. *Ganoderma -A-therapeutic* fungal biofactory. Phytochemistry; 2006; 67: 198 -2001.

[12] Margesin R, Hammerle M, and Tscherko P. Microbial Activity and Community Compostion durin Bioremediation of Diesel –Oil – Contaminated Soil. Effects of Hydrocarbon Cancentration, Fertilizers, and Incubation Time. Microbial Ecology; 2007; 1-11.

[13] Rigas F, PapadoPoulous K, Dritsa V, Doulia D. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus Ganoderma austral via respons surface methodology. Jornal of Hazardous Materials; 2007; 140: 325-332.

[14] Keypur S. Investigation of the Antibacterial Activity of a chloroform Extract of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganodermaluciddum* (W. Curt, Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). From Iran. International Journal of Medicinal Mushrooms; 2008; 10(4): 345-349.

[15] Ren A, Qin L, Shi L, Dong X, Shuaimu D, Xiangli Y, Wenzhao M. Methyl jasmonat induces Ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus Ganoderma lucidum. Bioresource Technology; 2010; 101: 6785-6790.

[16] Gonzales, MatuteR. Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivation *Ganoderma lucidum*. Micologia Aplicata; 2002; Int 14(2): 19-34.

[17] NasreenZ .Study of different Growth Parameters in Ganodermalucidum. Micologia Aplicada and International; 2005; 17(1): pp. 5-8.

[18] Sandrina A. Heleno, Lillian Barros, Anabela Martins, Maria Joao R.P. Queiroz, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira. Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. Food Research International; 2012; 46: 135-140.

[19] Fernández MD, Javier P, Carmen A, Aragonese P, Tarazona JV Rushton D.G, Ghaly A.E, and Martinell K. Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. Ecotoxicology and Environmental Safety; 2011; 74: 213 -2140.

[20] Lowry H, Rosebrough N. J, Farr A.L and Randall R. J. Journal fo Biological Chemistry; 1951; 193:265 -275.

[21] Ryan J, Estefan G, Rshid A. Soil and plant analysis laboratory manual. North Africa Region, International Center for Agricultural Research in the Dry Area; 2001. P.172.

[22] Davies, A. W. Schubert, R. Spiro, M. (Edsb). Chemical and Biological Properties of Tea Infusion, U and M. Frankfurt; 1997. P. 6.

[23] Peksen. A, Yakupojlu. G. Tea waste as a

supplement for the cultivation of Ganodermalucidum. Worlld J Microbiol Biotech; 2009; l25 (4): 611-718.

[24] Zhang L, Zeng Z, Zhao Ch, Kong H, Lu X, Xu G. A comparative study of volatile components in green, oolong and black teas by using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of- flight mass spectrometry and multivariate data analysis. Journal of Chromatography A; 2013; 1313: 245-252.

[25] Horie H, Kohata K. Analysis of tea components by high- performance liquid chromatography and high–performance capillary electrophorasis. Journal of chromatography A; 2000; 881; 425-436.