بهینه‌سازی عوامل تغذیه‌ای و رشدی برای تشکیل گلوله‌های قارچ پلوروتوس استراتوس

آیدا معدنی ملاک[۱]، امیر لکزیان[۱*]، الهام خداوردی[۲] و غلامحسین حق‌نیا[۱]

[۱] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

[۲] ایران، مشهد، گروه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۷

چکیده

تاکنون الگوهای رشدی و موفولوژیکی متفاوتی از قبیل (میسیلیوم، خوشه و پلت (گلوله)) در فرآیندهای صنعتی برای قارچ‌های رشته‌ای مشاهده شده است. هدف این مطالعه بهینه‌سازی شرایط رشد قارچ پلوروتوس استراتوس *Pleurotus ostreatus* در تشکیل پلت قارچی با تغییر شرایط مختلف رشدی بود. تاثیر عواملی نظیر محیط کشت قارچ (محیط کشت کرک و محیط کشت عصاره مالت)، دما (۲۵، ۲۸، ۳۲ درجه سانتی‌گراد)، pH (۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵)، سرعت گردش چرخاننده (۱۰۰-۱۳۰-۱۵۰ دور در دقیقه)، نوع منابع کربنی، سطح ماده تلقیحی، حضور عوامل افزودنی و عناصر کم مصرف در شکل‌گیری دو نوع پلت قارچی (ساده و مرکب) بررسی شد. از میان عوامل ذکر شده، pH، سرعت گردش چرخاننده، نحوه آماده‌سازی ماده تلقیحی و زمان مناسب جهت افزودن منابع کربنی به عنوان اثرگذارترین فاکتورها شناخته شدند. فعالیت دو آنزیم لاکاز و منگنز پراکسیداز تولیدی هر دو نوع پلت ساده و مرکب در محیط کشت اصلاح شده کرک اندازه‌گیری شد. طبق نتایج به دست آمده پلت‌های یکنواخت قارچی تنها در pH معادل ۵/۵ تشکیل شدند. اندازه پلت‌ها همبستگی معکوسی با تعداد دور در دقیقه چرخاننده داشت. همچنین شکل‌گیری پلت‌ها با افزودن عوامل افزاینده غیر از پپتون تحت تاثیر قرار نگرفتند. در نهایت با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیمی (لاکاز و پراکسیداز) پلت‌های قارچی مشخص شد که پلت‌های مرکب در مقایسه با پلت‌های ساده قادر به ترشح مقادیر قابل توجهی از آنزیم‌های تجزیه کننده لیگنین هستند. طبق شواهد پلت‌های قارچی گونه *P. ostreatus* عمدتا در نتیجه تراکم میسیلیومی شکل می‌گیرند و تجمع اسپورها لزوما تنها مرحله مهم در ایجاد پلت‌های قارچی نیست.

واژه های کلیدی: پلت‌های قارچی، پلوروتوس استراتوس، pH، سرعت گردش، ماده تلقیح

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۸۴۴، پست الکترونیکی: alakzian@yahoo.com

مقدمه

انجام فرآیندهای زیستی با کمک زیست‌توده قارچی، موضوعی مورد توجه در مباحث زیست فناوری می‌باشد. در طول دهه‌های اخیر کاربرد گونه‌های قارچی در حذف و تجزیه آلاینده‌های آلی و غیر آلی از فاضلاب‌ها به عنوان روشی پیشنهادی در مقایسه با روش‌های سنتی و استفاده از باکتری‌ها در تصفیه فاضلاب‌ها مطرح بوده است (۱، ۱۱). برخی از مزایای قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها اعم از تولید تعداد بیشتری از آنزیم‌ها، حذف آلاینده‌ها با منشا آلی و غیرآلی، تحمل نوسان ورود آلاینده به محیط و تحمل بیشتر در برابر pH پایین و انرژی مصرفی کمتر می‌باشد (۴، ۵، ۱۱، ۲۷). قارچ‌ها عمدتا با دو مکانیسم عمده جذب سطحی و تجزیه آنزیمی، باعث حذف آلاینده‌ها می‌شوند (۱۳، ۲۶، ۴۶). کاربرد قارچ‌ها هم‌چنین به عنوان حامل جهت تثبیت ریزجانداران دیگر مانند جلبک‌های ریز و مخمرها در کشت‌های تلفیقی به عنوان رهیافتی تازه پیرامون انرژی‌های زیستی مطرح می‌باشد (۸، ۴۷).

یکی از مورد مهمترین گروه‌های قارچی به لحاظ استفاده در فرآیندهای زیست فناوری، قارچ‌های رشته‌ای می‌باشند (۲۵، ۴۰). اصطلاح رشته‌ای بودن به دلیل ایجاد فرم هیفی در چنین قارچ‌هایی تخصیص یافته است. قارچ‌های رشته‌ای جز جانداران یوکاریوت هتروفیک وابسته به منبع خارجی کربن بوده و به صورت جنسی و غیرجنسی تولید مثل می‌کنند (۳۱، ۴۳). مورفولوژی و نحوه رشد قارچ‌های رشته‌ای در محیط کشت مایع پارامتر مهمی در انجام فرآیندهای زیستی می‌باشد. تاکنون سه نوع متفاوت از اشکال رشدی، رشد میسیلیومی، پلت و خوشه فرم در مورد قارچ‌های رشته‌ای شناسایی شده است (۷، ۱۵، ۲۳، ۴۸).

در میان اشکال مختلف رشدی قارچ شکل‌گیری پلت‌های قارچی از مزایای زیادی در فرآیندهای زیستی برخوردار می‌باشند و به عنوان امتیازی مهم برای هریک از گونه‌های قارچی از نقطه نظر صنعتی محسوب می‌شوند (۳، ۲۴). گزینش رشد قارچ در قالب پلت در صنایع مختلف باعث شده است که موانع موجود در نتیجه به‌کارگیری میسیلیوم پراکنده و آزاد قارچی (Freely suspended mycelium) تا حد زیادی از میان برداشته شود. مزیت‌های اصلی استفاده از فرم پلت قارچی در مقایسه با سایر فرم‌ها تولید زیست‌توده متراکم و بالا بوده که همین امر بقای قارچ را در برابر تنش‌های محیطی بهبود بخشیده و باعث ایجاد مقاومت و پایداری در رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی محیط می‌شود (۱۹). از دیگر مزایای استفاده از این پلت‌های قارچی می‌توان به جداسازی آسان زیست‌توده از محیط کشت و استفاده مکرر و مجدد از آن‌ها، مصرف کمتر انرژی جهت نگهداری ثابت دما در طی انجام فرآیند، انتقال بهتر اکسیژن و عناصر غذایی به واسطه سطح تماس و کاهش چسبندگی به بدنه راکتورهای زیستی اشاره نمود (۱۱، ۱۲، ۱۸، ۲۳، ۲۹). در هر پلت قارچی ۳ ناحیه اصلی، منطقه فشرده نیمه هوازی، لایه احاطه کننده هسته و ناحیه موئین خارجی قابل مشاهده است که ناحیه خارجی بوده که در آن هیف‌ها زیست پذیر بوده و فعال‌ترین بخش پلت به لحاظ متابولیکی را تشکیل می‌دهند (۱۱، ۴۰).

همان‌طور که در عمل مشاهده شده است، دستیابی به پلت‌های یکنواخت با اندازه مطلوب در انجام فرآیندهای زیستی کار ساده‌ای نبوده به این خاطر که عوامل متعددی در شکل‌گیری و مورفولوژی پلت‌های قارچی دخیل هستند. از آن جمله می‌توان به رژیم چرخش، ترکیب محیط کشت، pH، دما، غلظت اکسیژن محلول، وجود مواد افزودنی و گرانروی محیط کشت، میزان ماده تلقیحی، شرایط تلقیح و دیگر عوامل اشاره نمود (۳۲، ۳۹). چنین عواملی در هریک از گونه‌ها به طور متفاوتی اثرگذار هستند. در نتیجه مطالعه شکل‌گیری پلت‌های قارچی با فهم مکانیسم‌های دخیل در ایجاد این پلت‌ها به توسعه و بهبود کاربرد چنین زیست‌توده‌های قارچی کمک می‌کند (۴۰).

بنابراین بررسی تفکیکی گونه‌های قارچی و بهینه‌سازی فاکتورهای رشدی جهت تشکیل پلت‌های قارچی حتی در مقیاس آزمایشگاهی می‌تواند از دو جنبه مهم: ۱) سهولت برداشت و استفاده مجدد زیست توده قارچی به شکل پلت قارچی در واکنش‌های زیستی و تجزیه‌ای ۲) بهبود روند تجزیه زیستی به دلیل انتقال بهتر اکسیژن به زیست توده قارچی و صرف انرژی کمتر در انجام هوادهی، حائز اهمیت باشد (۲۰). با توجه به این امر که قارچ‌های شاخه بازیدیومیست میکروارگانیسم‌هایی با توانایی بالا در تولید گستره وسیعی از آنزیم‌های تجزیه کننده غیراختصاصی لیگنولیتیک بوده و از طرفی فرآیند تثبیت زیست‌توده‌های میکروبی به عنوان روشی جهت دستیابی به حفظ طولانی مدت فعالیت قارچی مطرح می‌باشد (۲، ۳۷). هدف اصلی این مطالعه بر بهینه‌سازی شرایط و فاکتورهای رشدی قارچ بمنظور ایجاد و شکل‌گیری دو نوع پلت قارچی ساده و مرکب از گونه قارچی*Pleurotus ostreatus* بود. به این ترتیب که در پلت ساده، میسیلیوم‌های قارچ به خودی خود به دور هم جمع می‌شوند و تولید توده قارچی می‌کنند و

حال آن‌که در پلت نوع مرکب زیست توده قارچی بر روی بستره ای از ذرات کربنی جمع و تثبیت شده و پلت قارچی شکل می‌گیرد (۱۰). همچنین با توجه به مطالعات صورت گرفته قبلی در این زمینه از بین تمامی آنزیم‌های تجزیه کننده فعالیت دو آنزیم منگنز پراکسیداز و لاکاز جهت بررسی و مقایسه فعالیت آنزیمی دو نوع پلت قارچی انتخاب شدند (۳۴).

مواد و روشها

آماده‌سازی پلت‌های ساده و مرکب: گونه قارچی *P. ostreatus* از شرکت (Fungi Perfecti, USA) در قالب اسپان‌های قارچی خریداری شد. سپس جهت تهیه ماده تلقیحی قارچ، کشت گونه قارچی در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) (یک لیتر حاوی عصاره ۴ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار) انجام و به مدت پنج تا شش روز در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین جهت حفظ فعالیت قارچی هر ۳۰ روز کشت دوباره قارچ در محیط PDA مجددا تکرار شد. پلت ساده از میسیلیوم تثبیت شده (Self-immobilized) تهیه شد اما در پلت مرکب میسیلیوم تثبیت شده روی مخلوطی از ذرات خاک‌اره و پودر کربن فعال با نسبت ۱۵/۱۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت قارچ تهیه گردید.

روش تهیه ماده تلقیحی و تشکیل پلت‌های قارچی: بمنظور تهیه ماده تلقیحی از خارجی‌ترین قطر کلنی قارچ رشد یافته در محیط کشت PDA، ۶ قطعه با سایز ۱ سانتی‌متر مربع به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه کرک با ترکیب (هر لیتر حاوی ۱۰ گرم گلوکز، ۲ گرم $K_2H_2PO_4$، ۰/۵ گرم $MgSO_4$، ۰/۱ گرم $CaCl_2$ و ۰/۱ گرم NH_4Cl) منتقل شد. بعد از گذشت ۸ روز رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد زیست‌توده حاصل شده جهت مراحل بعدی با کاغذ صافی از محلول رویی جداسازی شد. بلافاصله بعد از جداسازی قارچ‌ها بمنظور تهیه ماده تلقیحی همگن از میسیلیوم‌های قارچی با افزودن کمی آب مقطر استریل و با استفاده از یک همزن استریل عمل هم زدن به مدت یک دقیقه انجام شد. بمنظور انجام مراحل بعدی ماده تلقیحی همگن و سترون در درجه ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بمنظور بهینه‌سازی شرایط تشکیل پلت‌های قارچی عواملی نظیر نوع محیط رشد قارچ، دما، pH و سرعت گردش محیط، نوع و سایز منابع کربنی و زمان افزودن منبع کربنی (صرفا جهت تشکیل پلت‌های مرکب)، روش تهیه ماده تلقیحی، میزان تلقیح قارچ به محیط رشد، حضور مواد افزاینده به محیط و برخی عناصر کمیاب و تاثیر آن‌ها بر شکل‌گیری پلت‌های قارچی *P. ostreatus* بررسی شدند.

جهت کشت قارچ دو نوع محیط کشت عصاره مالت و محیط کشت پایه کرک بمنظور غربال کردن عوامل موثر در نظر گرفته شدند. آزمایشات در هر مورد بصورت جدا و در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی جهت بهینه سازی محیط کشت برای تشکیل پلت‌های قارچی و سطوح انتخاب شده برای هر فاکتور بر اساس تلفیقی از مطالعات قبلی انجام شده در این زمینه صورت گرفت (۱۰، ۲۸). این فاکتورها عبارت بودند از: دما در سه سطح ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد، pH محیط کشت در سه سطح pH ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵، سرعت چرخش در سه سطح (۱۰۰، ۱۳۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه)، منابع کربنی جهت تشکیل پلت‌های قارچی مرکب شامل خاک‌اره در دو سایز (۰/۱۲۵ و ۰/۲۱۲ میلی‌متر) و زغال فعال کربن در اندازه ذرات ۲۰۰ میکرون، روش تهیه ماده تلقیحی به دو صورت (صاف شده و صاف نشده)، میزان افزودن ماده تلقیحی در سه سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌لیتر (معادل ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم وزن تر میسیلیوم قارچی) در نظر گرفته شد. همچنین نحوه شکل‌گیری پلت‌های قارچ در حضور و عدم حضور یکسری عوامل افزاینده از قبیل پپتون و کلرید کلسیم هریک در سطح غلظتی ۲ گرم در لیتر، سولفات آهن

و تیامین بترتیب ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت پایه کرک بررسی شدند. اضافه کردن محلولی شامل عناصر کم مصرف (هر لیتر حاوی ۳ گرم $MgSO_4.H_2O$، ۱ گرم NaCl، ۰/۱ گرم $CoSO_4$، ۰/۰۱ گرم $Al_2(SO_4)$، ۰/۰۱ گرم H_3BO_3، ۰/۰۱ گرم $NaMoO_4$ و ۱/۵ گرم نیترو استیک اسید) نیز به عنوان یکی دیگر از عوامل مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری زیست‌توده قارچی و سایز پلت‌های تشکیل شده: طی آزمایشات مختلف در نتیجه اعمال پارامترهای مختلف موثر بر رشد و بعد از اطمینان از تشکیل پلت‌های قارچی و یا عدم تشکیل پلت (میسیلیوم‌های پراکنده قارچی)، زیست‌توده قارچی بعد از جداسازی در قالب وزن تر گزارش شد. وزن پلت‌های تشکیل شده قارچی در هر ارلن بعد از صاف کردن در صافی فلزی و وزن تر میسیلیوم‌های پراکنده قارچی با ریختن در لوله فالکون و انجام سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری سایز پلت‌های قارچی، با جداسازی پلت‌های قارچی تشکیل شده در هر ارلن، میانگین قطری پلت‌های قارچی جدا شده با استفاده از ورنیه تخمین زده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی (لاکاز و پراکسیداز) پلت‌های قارچی: نمونه‌برداری از محیط کشت جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی (لاکاز و پراکسیداز) پلت‌های قارچی ایجاد شده هر سه روز یکبار (روزهای سوم، ششم و نهم) و هر بار به میزان یک میلی‌لیتر از محیط کشت قارچ انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول‌های رویی در میکروتیوب‌های مربوطه جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش فعالیت لاکاز از طریق اکسیداسیون پیش ماده ABTS (2,2´-azino-biss3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار با pH معادل با ۴/۵ انجام شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه خوانش و ضریب خاموشی استفاده شده برای محاسبه واحد آنزیمی معادل $36\ mM^{-1}cm^{-1}$ در نظر گرفته شد (۶).

فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز نیز با استفاده از پیش ماده دی متوکسی فنول (DMP) (2,6-dimethoxyphenol) و تشکیل کمپلکس مالونات منگنز در بافر ۵۰ میلی مولار مالونات بهمراه سولفات منگنز یک میلی‌مولار صورت گرفت. واکنش آنزیمی به محض افزودن آب اکسیژنه با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به عنوان پذیرنده الکترون آغاز گردید. افزایش جذب در طول مدت یک دقیقه در زمان ۳۰ ثانیه از شروع واکنش و ۱/۵ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۶۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. تغییرات جذبی در دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی $49.6\ mM^{-1}cm^{-1}$ به واحد فعالیت آنزیمی در لیتر ($U.L^{-1}$) تبدیل شد. هر واحد آنزیمی به تعداد میکرومول‌های سوبستراهای اکسید شده در دقیقه در نظر گرفته شد (۴۳).

تمامی آزمایشات انجام شده در سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۹ درصد با استفاده از نرم‌افزار JMP13 صورت گرفت.

نتایج

نتایج کلی بررسی پارامترهای رشدی متفاوت در شکل‌گیری پلت‌های قارچی به تفکیک ایجاد پلت ساده و مرکب گونه قارچی *P. ostreatus* در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس شواهد به دست آمده به طور معمول شکل‌گیری موفقیت آمیز پلت‌های قارچی در نتیجه اعمال تیمارهای مختلف بعد از گذشت ۴۸ تا نهایت ۷۲ ساعت از زمان شروع انکوباسیون صورت گرفت و با ادامه فرآیند انکوباسیون تا مدت زمان ۱۰ روز هیچ‌گونه تغییر شکل

مورفولوژیکی خاصی در ساختار پلت‌های ایجاد شده قابل مشاهده نبود.

جدول ۱- شکل‌گیری پلت‌های قارچی *P. ostreatus* در شرایط رشدی متفاوت

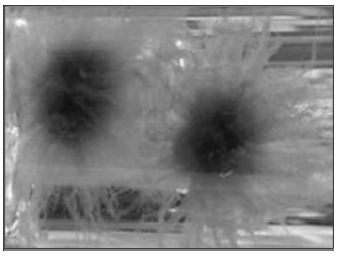
فاکتورهای رشدی	سطوح	مورفولوژی قارچ	
		پلت ساده	پلت مرکب
نوع محیط رشد قارچ	عصاره مالت	❊	×
	محیط کشت پایه کرک	❊	❊
دما(°C)	۲۵	❊	❊
	۲۸	❊	❊
	۳۲	❊	❊
pH	۴٫۵	×	×
	۵/۵	❊	❊
	۶/۵	†	×
سرعت گردش محیط (دور در دقیقه)	۱۰۰	❊	❊
	۱۳۰	†	❊
	۱۵۰	×	❊
نوع و سایز منابع کربنی	کربن فعال (۲۵۰ میکرون) +خاک‌اره (۰/۱۲۵ میلی‌متر)		×
	کربن فعال (۲۵۰ میکرون)+ خاک‌اره (۰/۲۱۲ میلی‌متر)		❊
زمان افزودن منبع کربنی	اتوکلاو شده همراه با محیط کشت		×
	بعد از زمان یک روز از شروع انکوباسیون		❊
روش تهیه ماده تلقیحی	صاف شده	×	❊
	صاف نشده	❊	×
میزان ماده تلقیحی (میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت)	۱	×	×
	۲	❊	❊
	۳	×	×
مواد افزوده به محیط رشدی پایه کرک	پپتون ۲ گرم در لیتر	❊	❊
	کلرید کلسیم ۲ گرم در لیتر	❊	×
	سولفات آهن ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر	×	×
	تیامین ۱ میلی‌گرم در لیتر	×	×
عناصر کم مصرف	۱ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت کرک	×	×

×: فرم رشته، †: فرم خوشه و ❊: فرم پلت

نتایج حاصل از تاثیر نوع محیط رشدی قارچ طبق جدول ۱ نشان داد که قارچ *P. ostreatus* قادر به ایجاد پلت ساده در هر دو محیط رشدی عصاره مالت و محیط کشت پایه کرک بوده است. هرچند در مورد ایجاد پلت‌های مرکب استفاده از محیط کشت پایه کرک احتمالا به لحاظ سیالیت و مواد غذایی موجود در ایجاد پلت‌های قارچی بهتر عمل نمود (جدول ۱).

دما به طور مستقیم شکل‌گیری و مورفولوژی پلت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به طوری که در بین سه دمای ۲۵،

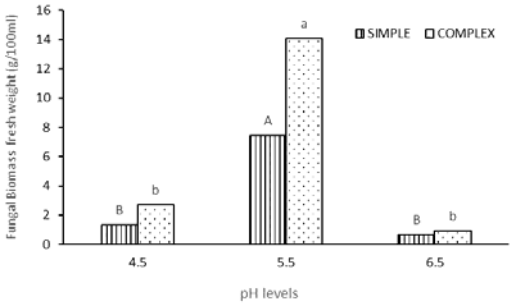
۲۸ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد شکل‌گیری هر دو نوع فرم پلت به صورت ساده و مرکب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد راحت‌تر اتفاق افتاد. در این آزمایش همچنین مشخص شد که با تغییر دما نوع مورفولوژی پلت قارچی ایجاد شده نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. به گونه‌ای که با بالا بردن دمای محیط از ۲۸ به ۳۲ درجه سانتی‌گراد هیف‌های زیست پذیر و ناحیه موئین بیشتری در اطراف پلت قارچی قابل مشاهده بود (شکل ۱).



شکل ۱- ناحیه موئین میسیلیومی در اطراف پلت‌های قارچی مرکب گونه *Pleurotus ostreatus* در محیط کشت کرک در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد

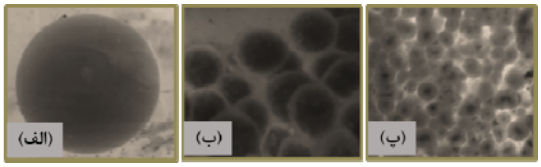
یکی دیگر از عوامل در شکل‌گیری پلت‌های قارچی pH می‌باشد. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که نوسانات تغییر pH در سه سطح (۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵) منجر به ایجاد حالت‌های متفاوتی از مورفولوژی قارچ (رشته، خوشه و پلت) شد (جدول ۱). در این آزمایش تنها در pH ۵/۵ تشکیل پلت‌های ساده و مرکب مشاهده شد و در دو سطح دیگر تشکیل پلت‌ها به صورتی بسیار اندک و بیشتر در قالب رشد رشته‌ای و یا خوشه قابل ملاحظه بود. علت رخداد تشکیل پلت قارچی در pH ۵/۵ می‌تواند به دو علت باشد. اولا گونه قارچی *P. ostreatus* به لحاظ رشدی در pH مورد نظر بیشترین سرعت رشدی را داشته و همین امر سبب انسجام سریع تر هیف‌های قارچی به یکدیگر و تشکیل شکل پلت را به دنبال داشته است. دوما از آنجایی که محیط کشت پایه کرک بعد از آماده سازی دارای pH معادل ۵/۵ می‌باشد، لذا تنظیم pH در سطوح ۴/۵ و ۶/۵ تعادل اسیدی محیط را تا حدودی برهم زده و مانع رشد بهینه قارچ شده است.

با بررسی زیست‌توده تر قارچی ایجاد شده در فرم پلت قارچی همچنین مشخص شد که بیشترین زیست‌توده حاصل شده قارچی در فرم پلت در pH معادل ۵/۵ اتفاق افتاد (نمودار ۱). در دو pH ۴/۵ و ۶/۵ به دلیل عدم تشکیل هیچ یک از انواع پلت ساده و مرکب؛ بعد از عمل سانتریفوژ و تخلیه محلول رویی زیست‌توده قارچ بر اساس وزن تر در هر ارلن گزارش شدند.



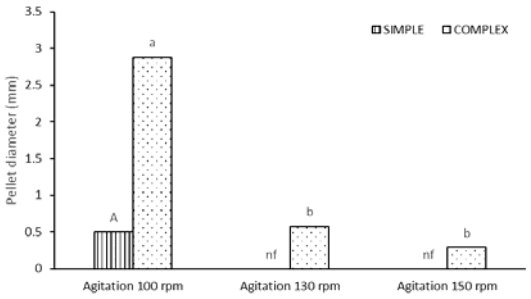
نمودار ۱- نتایج مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف pH بر زیست‌توده قارچی تولید شده (وزن تر بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) پلت ساده و مرکب. مقایسه میانگین‌های هر سه تکرار تیمارها توسط آزمون توکی و به صورت جداگانه انجام شده و در دو نوع حروف مورد استفاده، تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

نتایج به دست آمده از تاثیر سرعت چرخش محیط بر تشکیل پلت‌های مرکب قارچ در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس شکل ۲ با افزایش سرعت گردش میانگین اندازه پلت‌های ایجاد شده کوچک‌تر شده است. به طوریکه با افزودن ۲ میلی‌لیتر ماده تلقیحی قارچ به محیط کرک تنها یک عدد پلت قارچی مرکب رویت شد (شکل ۲ الف). با افزایش سرعت گردش توزیع و پراکندگی ذرات کربن و خاکاره در محیط بیشتر شده و رشد هیف‌های قارچ در قالب پلت با سایزهای کوچک‌تر اتفاق افتاده است (شکل ۲ ب و پ).



شکل ۲- تنوع در اندازه پلت‌های قارچی مرکب گونه *Pleurotus ostreatus* در دورهای متفاوت چرخاننده ۱۰۰ (شکل ۲ الف)، ۱۳۰ (شکل ۲ ب) و ۱۳۰ (شکل ۲ پ) دور در دقیقه در pH معادل ۵/۵ در محیط کشت کرک

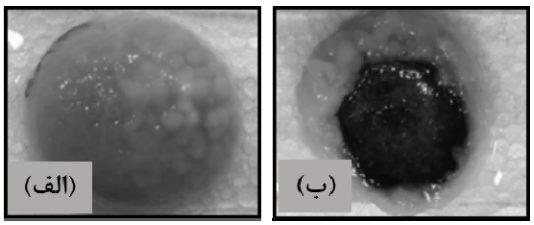
نتایج حاصل از نمودار ۲ نیز حاکی از عدم تشکیل پلت ساده قارچی در دو سرعت ۱۳۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه بوده، در حالی که در سرعتی معادل ۱۰۰ دور در دقیقه تشکیل پلت‌های ساده قارچی با میانگین قطری ۰/۵ میلی‌متر در هر ارلن قابل مشاهده بود.



نمودار ۲- نتایج مقایسه میانگین تاثیر دورهای مختلف چرخاننده بر قطر پلت‌های قارچی (ساده و مرکب) گونه *Pleurotus ostreatus* بر حسب سانتی‌متر. مقایسه میانگین‌های هر سه تکرار تیمارها توسط آزمون توکی و به صورت جداگانه انجام شده و در دو نوع حروف مورد استفاده، تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

افزودن منابع کربنی به محیط صرفا جهت ایجاد پلت‌های مرکب قارچ صورت گرفت (جدول ۱). طبق مشاهدات افزودن سایز درشت‌تر خاک‌اره (۰/۲۱۲ میلی‌متر) اثر مثبت معنی‌داری در شکل‌گیری پلت‌های قارچی مرکب داشت. از طرفی افزودن همزمان منابع کربن و خاک‌اره بهمراه ماده تلقیحی قارچ سبب ایجاد ته‌نشینی سریع ماده تلقیحی بهمراه منابع کربنی حتی در سرعت‌های گردش بالا در محیط می‌شد. این مشکل با افزودن منابع کربنی استریل شده بعد از گذشت یک روز از رشد قارچ به محیط کشت مرتفع گردید. در شکل ۳ (ب) شمایی از هسته کرینی ایجاد شده در پلت نوع مرکب در گونه قارچی *P. ostreatus* قابل مشاهده است.

با توجه به این امر که شکل رشدی گونه قارچی انتخاب شده در این آزمایش از طریق رشد انشعابات هیفی متراکم در محیط صورت می‌گرفت؛ بنابراین جهت تهیه ماده تلقیحی از چنین میسیلیوم‌های قارچی متراکم نیاز به همگن سازی ماده تلقیحی بود؛ در غیر این صورت امکان انحلال اسپوری قارچ و به دست آوردن ماده تلقیحی ممکن نبود. هرچند که با وجود همگن شدن ماده تلقیحی با کمک همزن برای تهیه پلت‌های قارچی مرکب نیاز به حضور قطعات ریزتر میسیلیومی بود که این کار با عبور ماده تلقیحی همگن شده از منافذ پارچه کتانی (ماده تلقیحی صاف شده) میسر شد (در جدول ۱ بخش روش تهیه ماده تلقیحی به آن اشاره شده است).

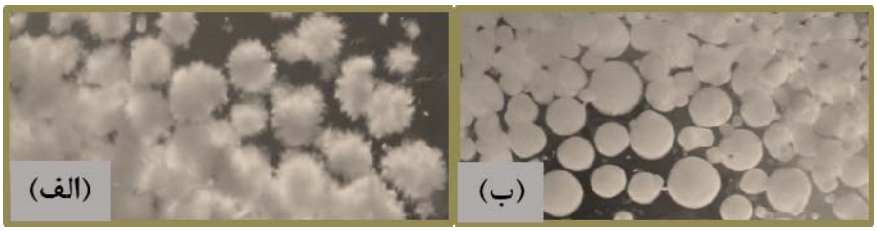


شکل ۳- پلت قارچی مرکب تشکیل شده از گونه *Pleurotus ostreatus* در محیط کشت کرک (شکل ۳ الف) و برش مقطعی همان پلت (شکل ۳ ب) که نمایانگر هسته کربنی و حضور میسلیوم-های قارچی در اطراف آن است.

در این آزمایش مقدار بهینه ماده تلقیحی اضافه شده به محیط که منجر به ایجاد پلت‌های ساده و مرکب شد، معادل ۲ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت کرک در نظر گرفته شد (جدول ۱).

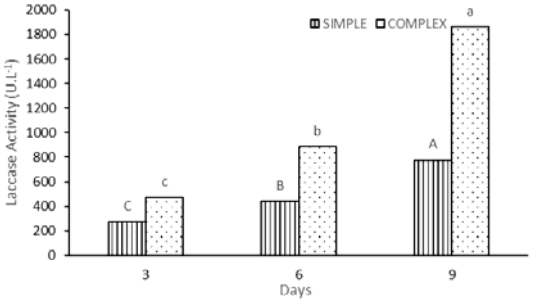
نتایج این مطالعه در مورد افزودن پپتون به محیط کشت به عنوان منبع پروتئینی نشان داد که اضافه نمودن پپتون به محیط کشت پایه کرک اثر مثبتی بر شکل‌گیری پلت‌های ساده و مرکب بهمراه داشت (جدول ۱). در این آزمایش همچنین افزودن کلرید کلسیم (۲ گرم در لیتر) به محیط

کشت پایه کرک سبب تغییر شکل مورفولوژی پلت‌های ساده از حالتی با ناحیه موئین محیطی به حالتی متراکم و منسجم گردید (شکل ۴). در آزمایش حاضر همچنین مشخص شد که افزودن سولفات آهن و تیامین در غلظت‌های بسیار کم به محیط کشت پایه کرک نه تنها اثر مثبت نداشته بلکه تا حدودی سبب بازدارندگی تولید پلت‌های قارچی شده است. در رابطه با افزودن عناصر میکرو نیز به همین ترتیب هیچ‌گونه اثر محرکی در نتیجه حضور این مواد در محیط کشت دیده نشد (جدول ۱).

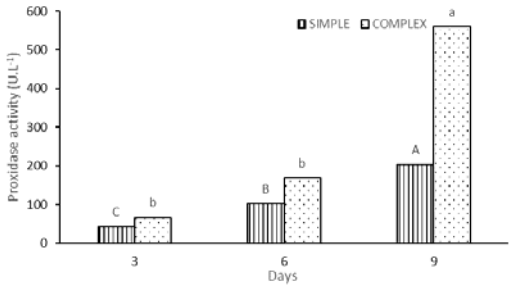


شکل ۴- مقایسه شکل‌گیری و مورفولوژی پلت‌های قارچی ساده تشکیل شده از گونه ***Pleurotus ostreatus*** در محیط کشت کرک بدون کلرید کلسیم (شکل ۴ الف) و در نتیجه افزودن کلرید کلسیم در محیط کشت (شکل ۴ ب)

نتایج این پژوهش در رابطه با فعالیت برخی آنزیم‌های خارج سلولی موثر در تجزیه آلاینده‌ها نظیر لاکاز و پراکسیداز در طی سه زمان ۳، ۶ و ۹ روز بعد از شکل‌گیری پلت‌های قارچی در نمودارهای ۳ و ۴ آمده است. از آنجایی که محیط کشت کرک در تولید هر دو نوع پلت قارچی ساده و مرکب نتایج مثبتی نشان داد، اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز ترشح شده از پلت در محیط کشت کرک صورت گرفت. نتایج حاکی از آن است که پلت‌های مرکب در هر سه زمان مورد مطالعه نسبت به پلت‌های ساده سطوح فعالیت آنزیمی بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. به طوریکه در مورد فعالیت آنزیم لاکاز میزان فعالیت آنزیمی پلت‌های مرکب در سه زمان ۳، ۶ و ۹ روز بترتیب ۱/۷، ۲ و ۲/۴ برابر بیشتر از فعالیت آنزیمی در محیط کشت حاوی پلت‌های ساده بوده است (نمودار ۳). در بررسی فعالیت آنزیمی پراکسیداز نیز روند مشابهی در هر سه روز نمونه‌برداری مشاهده شد. هرچند که میزان فعالیت آنزیمی پراکسیداز نسبت به فعالیت لاکاز به طور معنی‌داری کمتر بوده است. با بررسی روند افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش ۱,۶ برابری در دو زمان ۳ و ۶ روز و افزایش ۲/۸ برابری فعالیت آنزیمی پلت‌های مرکب در مقایسه با پلت‌های ساده قابل مشاهده است (نمودار ۴). از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که تثبیت قارچ بر روی ذرات کربنی با فراهم آوری مواد غذایی مورد نیاز قارچ در محیط کشت علاوه بر ایجاد دوام و پایداری بیشتر پلت‌ها سبب راندمان بیشتر پلت‌های قارچی در تولید آنزیم‌های تجزیه کننده لاکاز و پراکسیداز در محیط خواهد شد.



نمودار ۳- نتایج مقایسه میانگین تغییرات فعالیت آنزیم لاکاز ترشح شده از دو نوع پلت قارچی (ساده و مرکب) قارچ ***P. ostreatus*** در سه زمان (۳، ۶ و ۹ روز). مقایسه میانگین‌های هر سه تکرار تیمارها توسط آزمون توکی و به صورت جداگانه انجام شده و در دو نوع حروف مورد استفاده، تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



نمودار ۴- نتایج مقایسه میانگین تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز ترشح شده از دو نوع پلت قارچی (ساده و مرکب) قارچ *P. ostreatus* در سه زمان (۳، ۶ و ۹ روز). مقایسه میانگین‌های هر سه تکرار تیمارها توسط آزمون توکی و به صورت جداگانه انجام شده و در دو نوع حروف مورد استفاده، تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

بحث

مطالعات مختلف انجام شده در مورد شکل‌گیری پلت‌های قارچی حاکی از بهینه سازی شرایط رشدی مختلف در ایجاد چنین ساختارهایی دارد. همان‌طور که در آزمایش حاضر نیز مشخص شد با تغییر پارامترهای رشدی تغییرات معنی‌داری در ایجاد پلت‌های قارچی مشاهده شد. در میان تمامی عوامل دما، pH، سرعت چرخش محیط، نحوه تهیه ماده تلقیحی قارچ و میزان ماده تلقیحی اضافه شده به محیط، همچنین زمان افزودن منبع کربن در ایجاد پلت‌های قارچی موثرترین فاکتورها شناخته شدند. جهت تشکیل پلت‌های قارچی بایستی توجه نمود که تشکیل چنین ساختارهایی برای هریک از گونه‌های قارچی متفاوت است و در نتیجه قابلیت تعمیم کلی وجود نخواهد داشت. در این راستا مطالعه شکل‌گیری پلت‌های قارچی برای هریک از گونه‌ها بایستی به صورت جداگانه صورت گیرد.

در رابطه با تاثیر دما در مطالعه‌ای مشابه Liu و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد سبب شکل‌گیری سریع پلت‌های قارچی *Rhizopus oryzae* می‌شود (۲۲). این محققان همچنین بیان کردند که دمای ۳۸ درجه نسبت به دمای ۲۲ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد تولید زیست‌توده قارچی را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای دیگر اثر دو دمای ۲۳ و ۱۹ درجه سانتی‌گراد بر مورفولوژی پلت‌های *Rhizopus oryzae* بررسی شد (۴۸). طبق نتایج دمای ۱۹ درجه منجر به ایجاد پلت‌های متراکم با قطر کوچک‌تر (۱/۱ میلی‌متر) و ناحیه مویینه کم شده در حالی که در دمای ۲۳ درجه، قطر پلت‌ها افزایش یافته (۱/۳ میلی‌متر) و ناحیه مویینه بزرگ‌تر و هیف‌های زیست پذیر بیشتری تولید شده است. در مطالعه حاضر نیز مشخص شد با افزایش دما منطقه مویینه بیشتری در اطراف پلت‌های قارچی قابل مشاهده بود.

میزان pH محیط دیگر پارامتر رشدی بوده که به طرز معنی-داری تجمع هیف‌ها و اسپورهای قارچی را متاثر می‌نماید. همانند دیگر متغیرها اثر pH تابعی از نوع گونه قارچ است به طوریکه در بعضی موارد تنها تغییر ناچیزی در pH منجر به شکل‌گیری پلت‌های قارچی می‌شود. همچنان که در این آزمایش بهترین pH جهت شکل‌گیری پلت‌های قارچی pH معادل ۵/۵ بود. محققان دیگر نیز به تاثیر pH در شکل‌گیری پلت‌های قارچی اتفاق نظر داشته، به عنوان مثال شکل‌گیری پلت‌های قارچی *Penicillium chrysogenum* نیاز به pH قلیایی محیط داشته و پلت‌های قارچی *Rhizopus oryzae* در محیط‌های اسیدی شکل می‌گیرند (۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Tao و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد پلت‌های قارچ *A. niger* در pH ۵/۵ تشکیل شدند (۳۹).

با بررسی سرعت گردش محیط کشت، رابطه معکوسی بین اندازه قطر پلت‌ها با میزان چرخش در دقیقه چرخاننده حاصل شد. طبق مطالعات صورت گرفته نیز فاکتور سرعت گردش مهم‌ترین فاکتور در تعیین اندازه و یکنواختی قطر و سطح پلت‌های قارچی می‌باشد (۱۷). به طوریکه برخی قارچ‌ها نیاز به تنظیم یک رژیم گردش خاصی با تغییر تعداد دور در دقیقه شیکر در طول دوره رشدی قارچ بمنظور ایجاد پلت قارچی هستند. به طور کلی هر چه تعداد دور در دقیقه پایین‌تر (۱۰۰ دور در دقیقه) باشد

انتظار تشکیل پلت‌ها با اندازه بزرگ‌تر و فعالیت آنزیمی بیشتر، محتمل‌تر می‌باشد (۱۷). برای مثال گونه *Rhizopus* نیاز به رژیم چرخشی نسبتا شدیدی جهت شکل‌گیری پلت‌های قارچی دارد (۲۲).

نوع ماده تلقیحی یکی دیگر از عوامل کلیدی در شکل‌گیری پلت‌های قارچی می‌باشد. عوامل وابسته به ماده تلقیحی عبارت‌اند از نوع گونه قارچ به کار رفته، کیفیت و فرآیند تولید ماده تلقیحی و میزان ماده تلقیحی (۱۱). قبلا بیان شد که هیچ یک از گونه‌های قارچی قادر به ایجاد پلت در شرایط یکنواخت نیستند. به طور کلی سه مکانیسم شکل‌گیری به لحاظ مورفولوژیکی برای پلت‌های قارچی گزارش شده است (۴۷). در نوع اول پلت از یک تک اسپور تولید می‌شود (پلت غیر انعقادی)، در مکانیسم دوم پلت‌ها از نوع انعقادی بوده به این ترتیب که اسپورهای قارچ در یک جا متراکم شده و شروع به جوانه زدن می‌کنند. همانند فرآیندی که در قارچ *A. niger* انجام می‌شود (۱۶، ۴۷). در برخی موارد نیز پلت‌های قارچی حاصل ماده تلقیحی هیفی قارچ بوده و بدون حضور اسپورهای قارچی شکل می‌گیرند. همان‌طور که Priegnitz و همکاران (۲۰۱۲) در مورد یکی از جهش‌های قارچ *A. niger* مشاهده کردند که شکل‌گیری پلت‌های قارچی از طریق تراکم اسپورها مقدور نبوده و مکانیسم شکل‌گیری پلت فقط به واسطه حضور و تراکم هیف‌های قارچی می‌باشد (۳۵). در اغلب موارد تولید پلت‌های قارچی به صورت مرسوم توسط محلول اسپوری قارچ تهیه می‌شود. هرچند تولید این پلت‌ها در شرایطی اختصاصی از طریق قطعات میسیلیومی نیز گزارش شده است (۴۵). همان‌طور که در مورد گونه قارچی *P. ostreatus* تشکیل پلت‌های قارچی از طریق رشد میسیلیومی در محیط اتفاق افتاد. طبق شواهد پلت‌های قارچی گونه *P. ostreatus* عمدتا در نتیجه تراکم میسیلیومی شکل می‌گیرند و تجمع اسپورها لزوما تنها مرحله مهم در ایجاد پلت‌های قارچی نیست.

نکته مهم دیگر، مقدار ماده تلقیحی به کار رفته در محیط کشت بوده که در واقع رشد و مورفولوژی پلت‌های قارچی را دیکته می‌کند (۷). به طوریکه در مطالعات نشان داده شده استفاده از غلظت‌های بالای اسپورهای قارچی ممکن است منجر به شکل‌گیری میسیلیوم‌های پراکنده شود در حالی که سطوح کم ماده تلقیحی (معمولا کمتر از 10^8 اسپور در میلی‌لیتر) تشکیل پلت‌های قارچی را افزایش می‌دهد (۳۰). در مطالعه حاضر میزان بهینه تلقیح ماده تلقیحی معادل ۲ میلی‌لیتر (۳۰۰ میلی‌گرم وزن تر میسیلیوم قارچی) در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه کرک در نظر گرفته شد.

تاکنون مطالعات صورت گرفته بیشتر در رابطه با نحوه شکل‌گیری پلت‌های ساده بوده است در نتیجه در مورد زمان افزودن منبع کربنی و نوع منبع کربنی اطلاعات اندکی وجود دارد؛ اما با انجام این آزمایش مشخص شد که زمان افزودن منبع کربنی جهت تشکیل پلت‌های قارچی مرکب عاملی بسیار تعیین کننده در تشکیل چنین ساختارهایی می‌باشد. احتمالا با توجه به این‌که تجمع هیف‌های قارچی بمنظور شکل‌گیری پلت قارچی بسیار زیر تاثیر گرانروی محیط کشت می‌باشد، لذا با افزودن همزمان ماده تلقیحی و کربن فعال گرانروی محیط کشت در لحظه بالا رفته و قبل از مجتمع شدن هیف‌ها به دور هم و شکل‌گیری خوشه-های قارچی، میسیلیوم‌ها و اسپورهای آزاد قارچ بهمراه ذرات کربنی در محیط کشت ته نشست می‌کنند (۱۴، ۲۲، ۳۶).

در مطالعات بهینه‌سازی شکل‌گیری پلت‌های قارچی به نقش کلیدی برخی مواد افزاینده نظیر پروتئین‌ها و ویتامین‌ها، منابع مختلف کربنی و نمک‌های معدنی نیز اشاره شده است. در این مطالعه مشخص شد که افزودن پپتون سبب تحریک شکل‌گیری پلت‌های قارچی و کلرید کلسیم سبب انسجام و ایجاد شکل متراکم در ساختار پلت قارچی گردید. در مطالعه‌ای مشابه تاثیر افزایش گلیسرول و

کلرید کلسیم بر مورفولوژی پلت‌های قارچی *Neurospora* نشان داده شد. افزودن این ترکیبات به محیط کشت منجر به ایجاد توده‌های کوچک و هسته‌های متراکم و ناحیه مویین کمی شد (۹، ۲۸). هرچند که زیست‌توده قارچی و تولید اتانول افزایش یافت (۲۸). در تحقیقی دیگر غلظت بالای کلرید سدیم ($4.2\ osmol\ kg^{-1}$) مانعی جهت شکل‌گیری خوشه و پلت قارچی تشخیص داده شد (۴۴). در آزمایشات دیگر تاثیر منابع کربن مختلف نظیر ساکارز، گلوکز و فروکتوز و زایلوز جهت شکل‌گیری پلت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. Espinosa-Ortiz و همکاران (۲۰۱۶) بمنظور شکل‌گیری پلت‌های قارچی *A. niger* از منبع کربنی لاکتوز استفاده کردند (۱۱). در مقابل در تحقیقی دیگر با ارزیابی منابع کربنی مختلف (گلوکز، آرابینوز، ساکاروز و گالاکتوز با غلظت ۲۰ گرم در لیتر) تاثیر معنی‌دار خاصی در مورفولوژی پلت‌های قارچی *Neurospora* مشاهده نشد (۲۷). طبق نتایج به دست آمده افزودن عناصر کم مصرف به محیط رشد قارچ تاثیری در شکل‌گیری پلت‌های قارچی نداشت. هرچند نتایجی مبنی بر شکل‌گیری پلت‌های قارچی در حضور مواد معدنی کمیاب وجود دارد (۴۷). با توجه به برخی تفاوت‌های موجود و مطالعات اندک در این زمینه لزوم بررسی‌های جامع پیرامون تاثیر ترکیب محیط کشت بر شکل‌گیری پلت‌های قارچی بایستی مورد توجه قرار گیرد.

همچنین در بررسی فعالیت آنزیمی در محیط رشد پلت-های قارچی نتایج به دست آمده حاکی از فعالیت نسبتا بالای آنزیم‌های لاکاز و منگنز پراکسیداز در محیط کشت داشت. دلیل انتخاب آنزیم‌های لاکاز و منگنز پراکسیداز از بین تمامی آنزیم‌های تجزیه کننده غیراختصاصی توانایی بالای این آنزیم‌ها در اکسیداسیون انواع متعدد سوبستراها (آلی، غیرفنلی و غیرآلی)، تحمل گرمایی بالا، داشتن pH ایزوالکتریک اسیدی است (۲، ۲۶، ۳۷). پیش از این محققان دیگر نیز نقش و تاثیر این دو آنزیم چه به صورت خالص شده از محیط و یا همراه زیست توده قارچی در تجزیه آلاینده‌ها اشاره کرده‌اند (۱، ۲۴، ۲۶). همانطور که نتایج این آزمایش نشان داد فعالیت آنزیمی در پلت‌های قارچی مرکب به طور معنی داری بالاتر از پلت‌های ساده قارچی بوده است. بررسی‌های متعدد نشان داده است که استفاده از مواد آلی و غیرآلی به عنوان بستره در شکل‌گیری پلت‌های قارچی سبب بهبود عملکرد ساختاری و تغذیه ای قارچ شده و متعاقبا پایداری رشدی قارچ و فعالیت آنزیمی بالاتر را به دنبال خواهد داشت (۱۰). Elgueta و همکاران (۲۰۱۲) با اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های لیگنولیتیک ترشح شده از پلت‌های قارچی ساده و مرکب به فعالیت بسیار معنی دار آنزیم منگنز پراکسیداز در مقایسه با سایر آنزیم‌ها اشاره کردند (۱۰). همچنین مشخص شد که فعالیت آنزیم-های منگنز پراکسیداز و لاکاز در پلت قارچی مرکب به طور معنی داری بیشتر از پلت قارچی از نوع ساده می‌باشد. محققان دیگر نیز نتایج مشابهی گرفتند و نشان دادند میانگین فعالیت دو آنزیم منگنز پراکسیداز و لاکاز ۳۰ درصد بیشتر از فعالیت این آنزیم‌ها در پلت‌های ساده قارچی می‌باشد (۳۴). با توجه به این نتایج ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده لاکاز و پراکسیداز توسط چنین پلت‌های قارچی می‌تواند نوید بخش کاربرد چنین ساختارهای قارچی در مباحث زیست‌محیطی و بیوتکنولوژی باشد.

جمع‌بندی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شکل‌گیری پلت‌های قارچی *P. ostreatus* در شرایط کنترل شده رشدی در مقیاس آزمایشگاهی قابل انجام بود. در میان تمامی فاکتورهای موثر در تشکیل پلت‌های قارچی *P. ostreatus*، سه عامل pH محیط کشت، سرعت گردش چرخاننده و نحوه تهیه ماده تلقیحی مهم‌ترین عوامل در ایجاد پلت‌های ساده و مرکب بودند. بر اساس نتایج همچنین مشخص شد که تشکیل ساختارهای قارچی در قالب پلت به طرز معنی-داری سبب افزایش ترشح آنزیم‌های خارج سلولی لاکاز و پراکسیداز در طول زمان انکوباسیون خواهد شد.

منابع

۱- شهابی نژاد م.، زمانی م.ر.، خیدریان ف.، منصوریان ع.ر. (۱۳۹۸). بررسی تجزیه زیستی سیانید توسط آنزیم نیتریلاز ترشحی از قارچ پنی سیلیوم. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۳۲ شماره ۳

۲- شیخی ف.، رعایایی اردکانی م.، عنایتی ضمیر ن.، قزلباش غ. (۱۳۹۳). جداسازی و شناسایی دو قارچ تولید کننده آنزیم لاکاز از باگاس و ریزوسفر نیشکر. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷ شماره ۳

3- Anuradha K., Naga Padma P., Venkateshwar S., Reddy G. (2014). Effect of physical factors on pellet morphology of Aspergillus awamori MTCC 9166 and polygalacturonase production. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 3: 271-274.

4- Arica Y.M., Bayramoglu G., Yilmaz M., Bektas S., Genc O. (2004). Biosorption of Hg^{2+}, Cd^{2+}, and Zn^{2+} by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus Funalia trogii. Journal of Hazardous Materials. 109: 191-199.

5- Bayramoglu G., Gursel I., Tunali Y., Arica M.Y. (2009). Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by Funalia trogii pellets. Bioresource Technology. 100: 2685-2691.

6- Bourbonnais R., Paice M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267: 99-102.

7- Cai M., Zhang Y., Hu W., Shen,W., Yu Z., Zhou W., Jiang T., Zhou X., Zhang Y. (2014). Genetically shaping morphology of the filamentous fungus Aspergillus glaucus for production of antitumor polyketide aspergiolide A. Microbial Cell Factories. 13: 73-83.

8- Choi Y., Cho H.U., Utomo J.C. (2016). Ecient harvesting of Synechocystis sp. PCC 6803 with filamentous fungal pellets. Journal of Applied Phycology. 28: 2225-2231.

9- Dittmann J., Tesche S., Krull R., Böl M. (2019). The influence of salt-enhanced cultivation on the micromechanical behaviour of filamentous pellets. Biochemical Engineering Journal. 148: 65-76.

10- Elgueta S., Rubilar O., Lima N., Diez M.C. (2012). Selection of white-rot fungi to formulate complex and coated pellets for Reactive Orange 165 decolourization. Electronic Journal of Biotechnology. 15: 8-8.

11- Espinosa-Ortiz E.J., Rene E.R., Pakshiraja K., Hullebusch E.D., van Lens P.N.L. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. Chemical Engineering Journal. 283: 553-571.

12- Fazeli Nejad S., Ferreira J.A., Brandberg T., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J. (2016). Fungal protein and ethanol from lignocelluloses using Rhizopus pellets under simultaneous saccharification, filtration, and fermentation (SSFF). Biofuel Research Journal. 3: 372-378.

13- Filipovic-Kovacevic Z., Sipos L., Briski F. (2000). Biosorption of Chromium, Copper, Nickel, and Zinc Ions onto Fungal Pellets of Aspergillus niger 405 from Aqueous Solutions. Food Technology and Biotechnology. 38: 211-216.

14- García-Reyes M., Beltrán-Hernández R.I., Vázquez-Rodríguez G.A., Coronel-Olivares C., Medina-Moreno S.A., Juárez-Santillán L.F., Lucho-Constantino C.A. (2017). Formation, morphology and biotechnological applications of filamentous fungal pellets: a review. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 16: 703-720.

15- Gibbs P.A., Seviour R.J., Schmid F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. Critical Reviews in Biotechnology. 20: 17-48.

16- Grimm L.H., Kelly S., Volkerding I.I., Krull R., Hempel D.C. (2005). Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of Aspergillus nigerconidia. Biotechnology and Bioengineering banner. 92: 879-888.

17- Kim Y.M., Song H.G. (2009). Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation..The journal of Microbiology. 47: 420-424.

18- Krull R., Wucherpfennig T., Esfandabadi M.E., Walisko R., Melzer G., Hempel D.C., Kampen I., Kwade A., Wittmann C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. Journal of Biotechnology. 163: 112-123.

19- Legorreta-Castañeda, A.J., Lucho-Constantino C.A., Beltrán-Hernández R.I., Coronel-Olivares C.,Vázquez-Rodríguez G.A. (2020). Biosorption of Water Pollutants by Fungal Pellets. Water. 12:1155.

20- Liao W., Lui Y., Frear C., Chen S. (2007). A new approach of pellet formation of a filamentous fungus. Rhizopus oryzae. Bioresource Technology. 98: 3415-3423.

21- Lin L., Sun Z., Li J., Chen Y., Liu Q., Sun W., Tian C., (2018). Disruption of gul-1 decreased the culture viscosity and improved protein secretion in the filamentous fungus Neurospora crassa. Microbial cell factories. 17: 96

22- Liu Y., Liao W., Chen S. (2008). Study of pellet formation of filamentous fungi Rhizopus oryzae using a multiple logistic regression model. Biotechnology and Bioengineering. 99: 117-128.

23- Liu Y., Liao W., Frear, C., Chen S. (2013). .Pelletization process of control filamentous fungi morphology for enhanced reactor rheology bioproduct formation. Patent US. 8: 343-741.

24- Lucas D., Castellet-Rovira F., Villagrasa M., Badia-Fabregat M., Barceló D., Vicent T. (2018). The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. Science of the Total Environment. 610:1147-1153.

25- Meyer V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. Biotechnology Advances. 26: 177-185.

26- Mir-Tutusaus J.A., Baccar R., Caminal G., Sarrà M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. Water research. 138:137-151.

27- Moreira M.T., Feijoo G., Lema J. M. (2003). Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2: 247-259.

28- Nair R.B., Lennartsson P. R., Taherzadeh M.J. (2016). Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, Neurospora intermedia. AMB Express. 6: 31-40.

29- Nyman J., Lacintra M.G., Westman J. O., Berglin M., Lundin M., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J. (2013). Pellet formation of zygomycetes and immobilization of yeast. New Biotechnology. 30: 516-522.

30- Papagianni M., Moo-Young M. (2002). Protease secretion in glucoamylase produces Aspergillus niger cultures: fungal morphology and inoculum effects. Process Biochemistry. 37: 1271-1278.

31- Piepenbring M., Hofmann T.A., Miranda E., C´aceres O., Unterseher M. (2015). Leaf shedding and weather in tropical dryseasonal forest shape the phenology of fungi- Lessons from two years of monthly surveys in southwestern Panama. Fungal Ecology. 18: 83-92.

32- Preechasuth K., Anderson J., Peck S., Brown A., Gow N. (2015). Cell Wall protection by the Candida albicans class I chitin synthases. Fungal Genetics and Biology. 82: 264-276.

33- Priegnitz B.E., Wargenau A., Brandt U., Rohde M., Dietrich S., Kwade A., Krull R., Fleissner A. (2012). The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in Aspergillus niger. Fungal genetics and biology. 49: 30-38.

34- Rubilar O., Elgueta S., Tortella G., Gianfreda L., Diez M.C. (2009). Pelletization of Anthracophyllum discolor for water and soil treatment contaminated with organic pollutants. Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal. 9: 161-175.

35- Serrano-Carreon L., Galindo E., RochaValadez J., Holguın-Salas A., Cordiki G. (2015). Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. In: Filaments in Bioprocesses. Series Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 149: 55-90.

36- Schmideder S., Barthel L., Müller H., Meyer V., Briesen H. 2019. From three-dimensional morphology to effective diffusivity in filamentous fungal pellets. Biotechnology and bioengineering. 116: 3360-3371.

37- Singh J., Kumar P., Saharan V., Kapoor R.K. (2019). Simultaneous laccase production and transformation of bisphenol-A and triclosan using Trametes versicolor. 3 Biotech. 9:129.

38- Steinberg G. (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. Eukaryotic Cell. 6: 351-360.

39- Tao L., Zhang Q.L., Yao S.J. (2015.) Mycelial pellet formation of marine-derived fungus: new formation pathway directly from hyphae. Journal of Microbiology and Biotechnology. 4:18-25.

40- Veiter L., Rajamanickam V., Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. Applied microbiology and biotechnology. 102: 2997-3006.

41- Ward O.P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. Biotechnology Advances. 30: 1119-1139.

42- Wariishi H., Valli K., Gold M.H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Kinetic mechanism and role of chelators. The journal of biological chemistry. 267, 23688-23695.

43- Wucherpfennig T., Hestler T., Krull R. (2011). Morphology engineering - Osmolality and its effect on Aspergillus niger morphology and productivity. Microbial Cell Factories. 10: 58-73.

44- Xin B., Xia Y., Zhang Y., Aslam H., Liu C., Chen S. (2012). A feasible method for growing fungal pellets in a column reactor inoculated with mycelium fragments and their application for dye bioaccumulation from aqueous solution. Bioresource Technology. 105: 100-105.

45- Yang P., Shi W., Wang H., Liu H. (2016). Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. Brazilian Journal of Microbiology. 47: 828-834.

46- Zhang J., Zhang J. (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. Critical Reviews in Biotechnology. 36: 1066-1077.

47- Znidarsic P., Pavko A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. Food Technology and Biotechnology. 39: 237-25

Optimization of cultural and nutritional parameters for pellet formation by *Pleurotus ostreatus*

Maadani Mallak A.,[1] Lakzian A.,[1] Khodaverdi E.[2] and Haghnia Gh.H.[1]

[1] Soil Science Dept., Faculty of Agriculture University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

[2] Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R. of Iran.

Abstract

Different morphological forms and growth patterns of filamentous fungi as (mycelia, clumps, and pellets) have been observed in industrial processes. The aim of this study was to optimize and investigate the growth and morphology of *Pleurotus ostreatus* for fungal pellets formation by modifying various cultivation conditions. Factors such as types of fungal culture media (Kirk's and Malt extract mediums), temperature (25, 28, 32°C), pH (4.5, 5.5, 6.5), cultivation agitation rate (100–130-150rpm), type of carbon sources, levels of fungal inoculum, the presence of additive agents and trace metals were screened for their effect to formulate two types of pellets (simple and complex (hybrid)). Also activity of two ligninolytic enzymes (laccase, manganese peroxidase) was evaluated in both the simple and complex pellets in modified Kirk's medium. Among all various factors, pH, agitation rate, preparation of fungal inoculum and appropriate time for adding the carbon sources were detected as the most influential factors. According to the results uniform pellets were formed only at pH 5.5 for both types of pellets. Fungal pellets size showed an inverse correlation with the agitation rate of culture. Moreover the formation of pellets remained unaffected by additive agents except with peptone. Measuring the enzymatic activity (laccase and manganese peroxidase) of fungal pellets also revealed that complex pellets have more capability to secrete remarkable amounts of such lignin-degrading enzymes in compared to simple pellets. Based on evidences, fungal pellets of *P. ostreatus* almost can be formed directly from hyphae and spore aggregation may not be an essential step.

Key words: Agitation rate, fungal inoculum, fungal pellets, pH, *Pleurotus ostreatus*