جدا سازی باکتری های تولید کننده پلاستیک زیست تخریب پذیر از خاک های آلوده به پساب کارخانه شیر ایلام

آرمان رستم زاد *[۱]، حسن رضایی [۱]، رضا هوشمند فر[۲]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام ایران

۲) آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه ایلام، ایلام ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۲۸

چکیده

مقدمه: استفاده از پلاستیک های سنتتیک منجر به ایجاد مشکلاتی از قبیل دفن پسماند های جامد و همچنین گرم شدن کره زمین می شود. برای حل این مشکل استفاده از پلیمر های زیست تخریب‌پذیر همانند پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) مناسب می باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی تولید حداکثری پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و تولید بیوماس سلولی در شرایط مختلف رشد ازجمله فاکتور های دما، منبع کربن، دور شیکر و زمان انکوباسین بود.

مواد و روش ها: برای ارزیابی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) تعداد ۱۰ سویه باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به پساب کارخانه شیر واقع در شهرک صنعتی ایلام مورد آزمایش قرار گرفتند و وجود PHB در آن ها با استفاده از رنگ آمیزی سودان سیاه مورد ارزیابی قرار گرفت . در میان تمامی ایزوله ها، فقط یک سویه باسیلوس دارای PHB بود که این سویه با استفاده از تست های بیو شیمیایی و انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمر اختصاصی به عنوان باسیلوس سرئوس شناخته شد. برای ارزیابی PHB تولید شده از دستگاه GC-MASS و FTIR استفاده شد و برای بررسی تولید بیشتر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و تولید بیوماس سلولی، تاثیر فاکتور های مختلف محرک رشد از جمله دما، منبع کربن، دور شیکر (هوا دهی) و زمان انکوباسیون بررسی شدند.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که شرایط اپتیما برای تولید حداکثری PHB و بیوماس، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت، دور شیکر ۱۵۰ (دور در دقیقه) و استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن می باشد و میزان تولید بیوماس و PHB، ۰/۱۸۸ گرم و ۰/۰۵۸ گرم در لیتر به ترتیب بود. بر اساس نتایج حاصل از GC-Mass میانگین تولید PHB سی درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با استفاده از منابع کربن ارزان قیمت می توان تولید این بیو پلیمر را افزایش داد و در صورت تولید صنعتی می توان این بیو پلیمر را به‌جای پلاستیک های سنتتیک مورد استفاده قرار داد تا از آلودگی محیط زیست جلوگیری شود.

واژه های کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات، باسیلوس سرئوس، سودان سیاه، PCR، GC-Mass

* **نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام ایران

Email: arostamzad381@yahoo.com

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

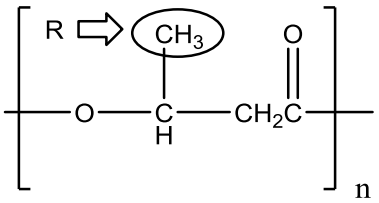
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

مقدمه

امروزه پلاستیک ها در تولید انواع فرآورده های صنعتی، از صنعت خودرو سازی گرفته تا دنیای پزشکی به کار گرفته می شوند. تنها در ایالات متحده آمریکا سالانه نزدیک به ۵۰ میلیون تن انواع پلاستیک تولید می شود. اما این مواد به عنوان زباله های مقاوم به تجزیه میکروبی، چالش‌های زیست محیطی پیچیده ای به وجود آورده اند (۱). استفاده از پلیمر های صنعتی باعث به وجود آمدن مشکلاتی از قبیل دفن پسماند های جامد و هم چنین گرم شدن کره زمین می‌شود (۲). این ترکیبات بسیار مفید بوده چون پلیمر های سنتزی با ساختار قابل انعطاف و محدوده وسیعی از ساختار و استحکام را دارند (۳). اما نکته نا مطلوب در کاربرد این ترکیبات سخت تجزیه پذیری آن هاست. پلاستیک ها جزء زنوبیوتیک ها بوده و نسبت به تجزیه میکروبی مقاوم هستند (۴). یکی از راه کارهای مهم برای حل مشکل تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت، استفاده از پلیمر های زیست تخریب پذیر است، که پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHAs) از آن جمله می باشند (۵). اما تولید در مقیاس صنعتی به دلیل هزینه های نسبتاً بالای سوبسترا، تولید کم پلیمر و هزینه های بالای جدا سازی و نگه داری میکرو ارگانیسم‌ها با محدودیت هایی مواجه است (۶).

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یکی از انواع پلی هیدروکسی آلکانوات ها می‌باشد که یک گرانول ذخیره ایی است که در بسیاری از میکرو ارگانیسم ها دیده می شود. این پلیمر باکتریایی در شرایط نا مساعد غذایی در این سلول ها تولید شده و در صورت تداوم شرایط و به منظور بقای باکتری ها، تجزیه شده و منابع کربن و انرژی مورد نیاز آن ها را فراهم می کند (۷،۸). این پلیمر ها در موارد بسیار به پلاستیک های مصنوعی (پترو شیمیایی) شباهت دارند و در واقع می توان گفت که نوع طبیعی آن ها هستند، فقط یک تفاوت بسیار عمده آن ها با پلاستیک های مصنوعی، تجزیه پذیری آن هاست که این بیو پلیمر ها را به عنوان پلاستیک های سبز و بی ضرر مطرح کرده است (۹،۱۰). تجزیه بیو لوژیک پلی هیدروکسی بوتیرات در شرایط هوازی منجر به تولید آب و دی اکسید کربن می گردد، درحالی‌که تجزیه غیر هوازی این ماده موجب تولید متان و دی اکسید کربن می شود. پلی هیدروکسی بوتیرات در دامنه وسیعی از درجه حرارت و رطوبت به کود بیولوژیک تبدیل می شود. برای مثال در دمای حدود ۶۰ درجه و رطوبت حدود ۵۵٪ نیز تجزیه بیو لوژیک آن ادامه می‌یابد. به‌این‌ترتیب در صورت جایگزینی این مواد به‌جای پلاستیک های امروزی هیچ گونه نگرانی در زمینه تجزیه این مواد در محیط های آبی و خاکی وجود ندارد (۱۱،۱۲). بیو سنتز PHB از طریق سه واکنش آنزیمی صورت می پذیرد. واکنش اول شامل ترکیب دو مولکول استیل کوانزیم A است که به وسیله آنزیم بتا کتواسیل کوانزیم A تیولاز انجام می گیرد. واکنش دوم احیای استو استیل کوانزیم A به R هیدروکسی بوتیریل کوانزیم A توسط آنزیم استو استیل کوانزیم A دهیدروژناز است. در پایان این مولکول توسط آنزیم PHB سنتتاز پلیمریزه می شود. پلی هیدروکسی بوتیرات فقط یکی از انواع پلی هیدروکسی آلکانوات هاست که به وسیله میکرو ارگانیسم‌های مختلف تولید می شود و به همین دلیل مسیر های سنتز بسیار متفاوتی در سلول طی می نماید. اما به طورکلی اکثر این تغییرات مربوط به زنجیره R می گردد و بنیان مولکول تقریباً دست نخورده باقی می ماند (۱۲،۱۳).



شکل ۱. ساختار و گروه جانبی پلی هیدروکسی بوتیرات (۱۲).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

ابتدا پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان لایه های بسته بندی کیسه ها و ظروف به کاربرده می شد، سپس به عنوان براق کننده کاغذ مورداستفاده قرار گرفت. کاربرد های دیگر این مواد شامل پلاستیک، ظروف آشپزخانه، پارچه، ظروف لوازم آرایشی، بطری های پلاستیکی و غیره است (۱۴،۱۵). هم چنین این مواد به خاطر قابل تجزیه بودن می توانند به عنوان حامل های قابل تجزیه در طولانی مدت برای انتقال دارو ها به قسمت های خاصی از بدن در پزشکی مورد استفاده قرار بگیرند. این مواد به دلیل این‌که پس از تجزیه به طور خالص به هیدروکسی اسید ها تجزیه می شوند کاربرد های دیگری نیز یافته اند (۵،۱۶). برای مثال شرکت مرک آلمان از این ماده در ترکیب برخی دارو ها نظیر آنتی‌بیوتیک های بتا لاکتام و دارو های چشمی استفاده نموده است. به نظر می‌رسد این مواد به دلیل ساختمان ویژه خود کاربرد های بسیار وسیعی خواهند داشت و هم اکنون محدودیت اصلی قیمت این مواد است که تا حدی گران تر از مواد مشابه نفتی است (۱۴). امروزه با روش های مهندسی ژنتیک باکتری هایی ایجاد گردیده است که تا حدود ۷۰ درصد وزن خشک سلولی می تواند PHB تشکیل دهند (۱۴). هدف از این پژوهش جدا سازی باکتری های تولید کننده PHB از خاک آلوده به پساب کارخانه شیر و هم چنین بررسی تولید PHB در شرایط مختلف رشد سلولی بود.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری از خاک: این پژوهش که از تابستان سال ۱۳۹۳ تا تابستان ۱۳۹۴ به طول انجامید، به منظور یافتن باکتری بومی تولیدکننده ی PHB از خاک های آلوده به پساب کارخانه شیر واقع در شهرک صنعتی ایلام استفاده گردید. پس از انتقال نمونه های خاک در ظروف استریل به آزمایشگاه عصاره رقیق خاک تهیه گردید. سپس مقدار ML ۱ از عصاره خاک در پتری های حاوی محیط نوترینت آگار ریخته و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از رشد میکرو ارگانیسم های مختلف در پتری ها، کشت های مداوم از کلنی های مشخص برای خالص سازی کلنی ها صورت گرفت. جهت شناسایی باکتری ها از رنگ آمیزی گرم و تست های بیو شیمیایی کاتالاز، سیترات، نیترات، نشاسته (استارچ آگار)، ژلاتین، تخمیر قند ها، تست حرکت، اندول و H_2S استفاده شد. در این شناسایی انواع باکتری ها شامل آرترو باکتر، باسیل های اسپور زا و غیر اسپور زا و سودوموناس شناسایی شدند(۵،۱۰).

انتخاب گونه ی تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات: برای مشخص کردن گونه های تولید کننده PHB از روش رنگ آمیزی سودان سیاه استفاده شد. پس از انجام رنگ آمیزی، گونه ای که توانایی بیش تری در تولید PHB داشتند انتخاب شد. در این رنگ آمیزی یک گونه از باسیلوس که توانایی تولید PHB را داشت انتخاب گردید.

روش رنگ آمیزی سودان سیاه: یک قطره از سوسپانسیون باکتریایی بر روی لام قرار داده و پس از خشک شدن با عبور سریع لام از روی شعله تثبیت شد. سپس سطح اسمیر به محلول سودان سیاه (۳/. گرم سودان سیاه + ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪) آغشته شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه لام با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن اسمیر با زایلن شستشو داده شد. پس از این اسمیر به مدت ۱۵ ثانیه با محلول سافرانین آغشته شد. پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن لام با کاغذ صافی پلی هیدروکسی آلکانوات به‌صورت لکه های سیاه رنگ درون باکتری ها با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد (۱۷).

کشت میکرو ارگانیسم: میکرو ارگانیسم مورد نظر توسط لوپ استریل از پلیت به محیط کشت بذر با ترکیب ذیل تلقیح شد:گلوکز، فروکتوز و مالتوز (به‌صورت جدا گانه) ۹ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۲/۵ گرم بر لیتر، KH_2PO_4 ۲/۵ گرم در لیتر، K_2HPO_4 ۲/۵ گرم بر لیتر، NH_4NO_3 /۵ گرم در لیتر، $(NH_4)_2HPO_4$ ۱ گرم در لیتر، $MnSO_4.7H_2O$ /۰۰۷ گرم در لیتر، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲ گرم در لیتر، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۰۱ گرم در لیتر. سه نوع محیط کشت بذر با منبع کربن متفاوت درست کرده و در لوله های در پیچ دار ML ۱۰ ریخته و پس از کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۸).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

پس از گذشت ۴۸ ساعت از گرما گذاری مقدار ۱ میلی لیتر از محیط کشت بذر به ۹۹ میلی لیتر از محیط کشت تولید تلقیح و گرما گذاری شد. ترکیب محیط کشت تولید مشابه با ترکیب محیط کشت بذر بود با این تفاوت که غلظت گلوکز و عصاره مخمر در محیط کشت تولید به ترتیب ۳۰ و ۷/۵ گرم در لیتر بود. لازم به ذکر است که در هنگام تهیه محیط کشت به منظور جلوگیری از واکنش های نا مطلوب گلوکز و عصاره مخمر به صورت جدا گانه استریل شدند(۱۸).

بررسی میزان رشد و تولید PHB : جهت بهینه سازی و بررسی میزان رشد و تولید PHB از فاکتور های کربن (گلوکز، فروکتوز و مالتوز)، دما (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد) و دور هوا دهی (۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه) در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. جهت بررسی میزان رشد از محیط کشت تخمیر در فواصل مشخص ۲۴ ساعته نمونه گیری شد. ۱۰ میلی لیتر از نمونه های گرفته شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. جهت حذف مواد اضافی، بیوماس ته نشین شده با ۵ میلی لیتر آب مقطر به صورت سوسپانسیون در آورده شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بیوماس به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد تا تبخیر کامل آب و ثابت شدن وزن سلولی نگه داری شد و سپس وزن خشک سلولی اندازه گیری شد(۱۷).

سنجش درصد پلی هیدروکسی بوتیرات با اسپکتروفوتومتری: برای آنالیز کمی، سلول های خشک شده حاوی پلی بتا هیدروکسی بوتیرات درون سلولی با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ هیدرولیز شدند. برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، به بیوماس خشک شده در لوله های در پیچ دار افزوده شد و به مدت یک ساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد نگه داری گردید و حداکثر جذب نوری (λ_{max}) در nm ۲۳۵ بررسی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۹).

PHB% = Absorbance in 235 nm / CDW ×10ml × 100

بیوماس برحسب میلی گرم=CDW . حجم اسید سولفوریک در رقیق سازی = 10ml

آنالیز دانه های PHB با FTIR و کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی (GC-Mass): برای تأیید تولید دانه های PHB از ماده استاندارد تری هیدروکسی بوتیریک اسید که از شرکت سیگما آمریکا تهیه شده استفاده شد. مقدار ۲ میلی لیتر کلروفرم و ۱ میلی لیتر متانول اسیدی (شامل ۸۵ ٪ متانول حجمی- حجمی، ۱۵٪ اسید سولفوریک حجمی- حجمی و ۴۵ گرم در لیتر اسید بنزوییک به‌عنوان استاندارد داخلی) به بیوماس به‌دست آمده و نمونه استاندارد پلی هیدروکسی بوتیرات اضافه شد. نمونه ها و استاندارد به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد تا کامل شدن واکنش استری شدن نگه داری شدند. سپس به هر نمونه ۱ میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه و به مدت یک دقیقه به شدت تکان داده شد (۱۵). با تکان دادن شدید و آرام گرفتن، سه فاز مجزا تشکیل شد (فاز بالایی حاوی اسید سولفوریک، فاز میانی حاوی بقایای میکروبی و فاز پایینی حاوی متیل استر هیدروکسی آلکانوات) است، دو فاز بالایی را توسط پیپت دور ریخته و فاز زیرین توسط پیپت پاستور به لوله آزمایش تمیز منتقل و تا قبل از تزریق به دستگاه GC-Mass و FTIR درون یخچال نگه داری شد. مقدار دو میکرو لیتر از نمونه ها و نمونه استاندارد، به‌صورت جدا گانه به دستگاه FTIR و کروماتوگرافی گازی تزریق شدند.

مشخصات دستگاه GC-Mass به شرح زیر است: مدل GC 6890N، NS S973N و HPMSM، اندازه ذرات فاز ثابت 0.25 µm، طول ستون 30 متر و قطر ستون 0.25 mm، ساخت شرکت اجیلنت آمریکا، دمای تزریق کننده ۲۵۰ درجه سانتی گراد و دمای نمایانگر ۲۸۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. هلیوم به عنوان گاز حامل با دبی حجمی ۲ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. دستگاه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس با شدت ۵ درجه سانتی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

گراد در دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد و در نهایت با شدت ۳۵ درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای ۲۲۰ درجه سانتی گراد رسید.

شناسایی گونه جدا شده باسیلوس با واکنش زنجیره ای پلی مرازی (PCR): استخراج DNA از باسیلوس سرئوس با استفاده از روش انجماد و جوش انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) و تعیین توالی جهت تأیید باکتری توسط پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس انجام پذیرفت. برای انجام PCR، پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس، ژن *Bal* F و *Bal* R با توالی های زیر به کار برده شد (۲۰،۲۱).

جدول ۱. مشخصات پرایمر های مورد استفاده درPCR

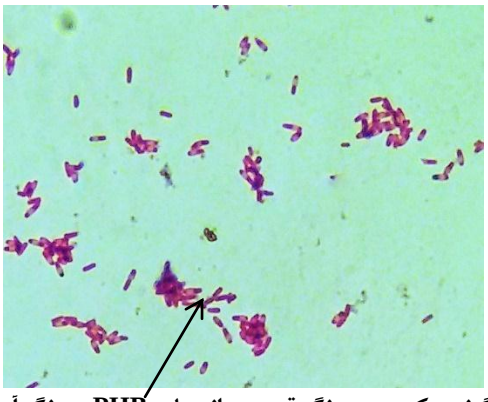
Gene primer	Gene sequence	Length of product
Bal Forward	5’- TGCAACTGTATTAGCACAAGC T -3’	533 bp
Bal Reverse	5 ’- TACCACGAAGTTTGTTCACTACT -3’	

برای انجام واکنش PCR پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس مخلوط واکنش شامل بافر PCR (۵ میلی مول KCl، PH۹ و ۱ میلی مول Tris-HCl)، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۲/۵ میلی مول dNTP، آغازگر رفت (۱۰ پیکو مول)، آغاز گر برگشت (۱۰ پیکومول)، آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد در میکرو لیتر) و DNA (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر تهیه شد (۲۰،۲۱).

برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته های الگو در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، امتداد رشته DNA توسط پلیمراز در ۷۲ سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار گردید و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ سانتی گراد برای ۲ دقیقه واکنش ها اتمام یافت (۲۰،۲۱). در ادامه محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

یافته های پژوهش

بررسی تولید دانه های PHB با رنگ آمیزی سودان سیاه: پس از رنگ آمیزی سودان سیاه و مشاهده به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰ دانه های PHB داخل باکتری به صورت آبی تیره قابل مشاهده بود (شکل ۲).



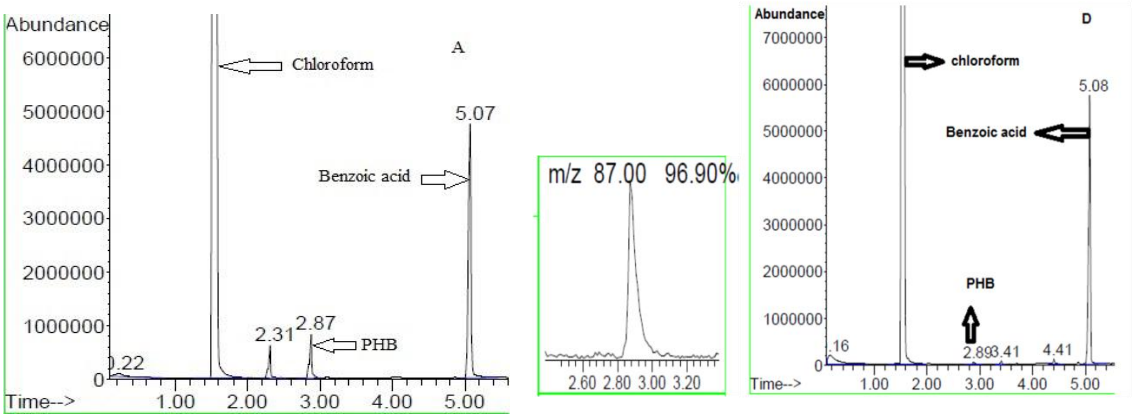
شکل ۲. گونه میکروبی به رنگ قرمز و دانه های PHB به رنگ آبی پر رنگ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

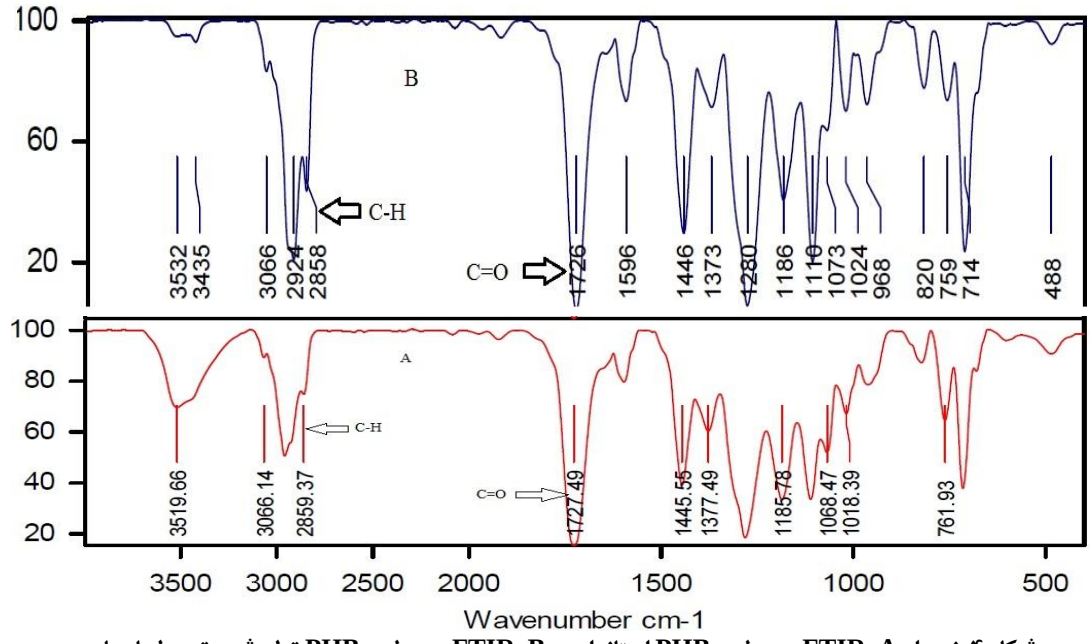
[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

نتایج حاصل از GC-Mass و FTIR

پلیمر به دست آمده از باکتری و هم چنین پلی ۳ هیدروکسی بوتیراتی که به عنوان شاهد تهیه شده بود، از فاز آلی (محلول کلروفرم) جدا و طیف آن توسط دستگاه GC-Mass گرفته شد. در نهایت نمودار های پلیمر به دست آمده از باکتری و مقایسه آن با نمودار حاصل از نمونه شاهد نشان دهنده و تأیید کننده وجود پلی هیدروکسی بوتیرات بود. به این ترتیب باند PHB استاندارد در دقیقه ۲/۸۷ و باند PHB تولید شده از باسیلوس سرئوس در دقیقه ۲/۸۹ ظاهر شد (شکل ۳). نمودار های به دست آمده واجد باند جذبی در $1726Cm^{-1}$ که مربوط به گروه کربونیل (C=O) بودند هم چنین واجد باند $2858Cm^{-1}$ که مربوط به گروه C-H است که این دو گروه کربنی منعکس کننده ساختار BHP است (شکل ۴). هم چنین طیف FTIR پلیمر به دست آمده و PHB استاندارد در حلال کلروفرم گرفته شد. در طیف های FT-IR پلیمر به دست آمده فرکانس کششی گروه کربونیل (C=O) در Cm^{-1} 1726، گروه اتری (C-O) در 1186و Cm^{-1} 1280و گروه C-H در Cm^{-1} 2858 دیده می شوند که با طیف FTIR، PHB مطابقت دارد (شکل ۴).



شکل ۳. نمودار A، GC-Mass مربوط به PHB استاندارد و نمودار B، GC-Mass مربوط به PHB تولیدی باسیلوس سرئوس

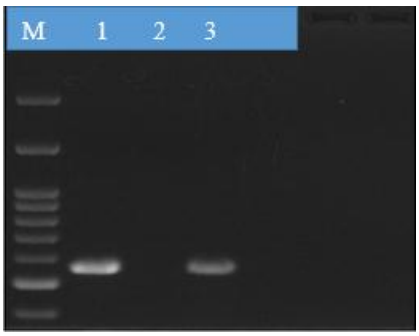


شکل ۴. نمودار A، FTIR مربوط به PHB استاندارد و B، FTIR مربوط به PHB تولیدشده توسط باسیلوس

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

نتایج حاصل از PCR: پس از انجام آزمون های بیو شیمیایی و مشخص شدن کلنی های باسیلوس سرئوس، برای تأیید کلنی این باکتری روی DNA استخراج شده PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی متعلق به ژن Bal باکتریایی با سه بار تکرار انجام گرفت. سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد مطالعه شد. باسیلوس سرئوس جداشده در PCR با آغازگر های اختصاصی قطعه ۵۳۳ جفت بازی را در مقابل DNA Ladder 100bp (Fermentas) نشان داد. شکل(۵) الکتروفورز باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک آلوده به پساب کارخانه شیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Bal F و Bal R نشان می دهد. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه مربوط به باسیلوس سرئوس است که در آزمایشگاه جدا سازی و شناسایی شده است.



شکل۵. الکتروفورز محصول PCR : M= DNA ladder 500bp و چاهک شماره ۱ = کنترل مثبت (*Bacillus cereus* ATCC14579) و ۲= کنترل منفی و شماره ۳= نمونه باسیلوس سرئوس جداشده از پساب کارخانه شیر

تجزیه واریانس صفات آزمایشی باکتری ها در تولید بیوماس و PHB: طبق نتایج تجزیه واریانس، تأثیر دما، دور شیکر، زمان انکوباسیون و منبع کربن مورد نیاز باکتری بر مقدار بیو ماس و PHB باکتری مورد تحقیق در سطح احتمال یک درصد ($p\leq0.01$) معنی دار بود. در تولید بیو ماس، اثرات متقابل بین دما و منبع کربن و هم چنین اثرات متقابل بین دما و دور شیکر در باکتری مورد تحقیق معنی دار بود. در تولید PHB، اثرات متقابل بین عوامل تحقیق (دما، دور شیکر، منبع کربن و مدت زمان انکوباسیون) ازلحاظ تولید PHB در باکتری مورد تحقیق در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود(جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس مقدار بیو ماس در باکتری مورد تحقیق

منبع تغییر	df	میانگین مربعات صفات	
		بیوماس	PHB
دما	۲	۰/۰۲۴**	۰/۰۰۲**
دور	۲	۰/۰۰۹۳**	۰/۰۰۰۹۳۸**
کربن	۲	۰/۰۲۱**	۰/۰۰۳**
زمان	۲	۰/۰۰۸۷**	۰/۰۰۱۶۷**
دما * دور	۴	۰/۰۰۰۴**	۰/۰۰۰۱۴۴**
دما * کربن	۴	۰/۰۰۰۹۶**	۰/۰۰۰۵۲۸**
دما * زمان	۴	۰/۰۰۰۰۲۱^{ns}	۰/۰۰۰۲۱**
دور * کربن	۴	۰/۰۰۰۰۸۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۹۳**
دور * زمان	۴	۰/۰۰۰۰۳۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۳۴**
کربن * زمان	۴	۰/۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۱۵۹**
دما * دور * کربن	۸	۰/۰۰۰۰۸۸^{ns}	۰/۰۰۰۰۳**
دما * دور * زمان	۸	۰/۰۰۰۰۳۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۹**
دور * کربن * زمان	۸	۰/۰۰۰۰۲۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۵**
دما * دور * کربن * زمان	۲۴	۰/۰۰۰۰۱۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۲۱**
خطای آزمایشی	۱۶۲	۰/۰۰۰۱۰۳	۰/۰۰۰۰۰۲

df - درجه آزادی ، علامت * و ** به ترتیب بیانگر وجود تفاوت آماری معنی دار بین تیمار ها در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.
علامت ns بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین تیمار ها است.

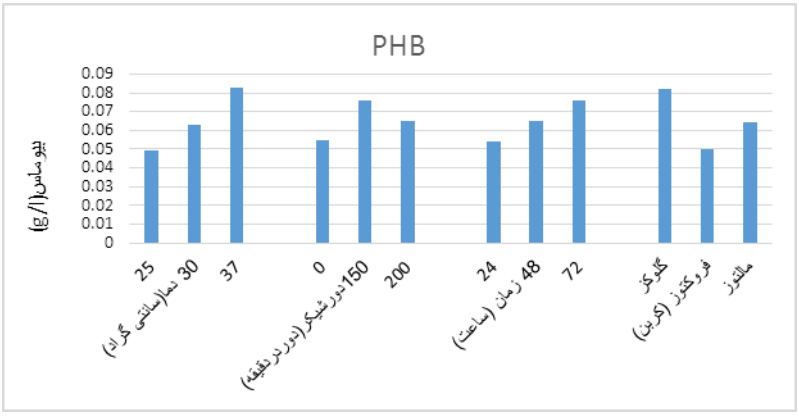
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

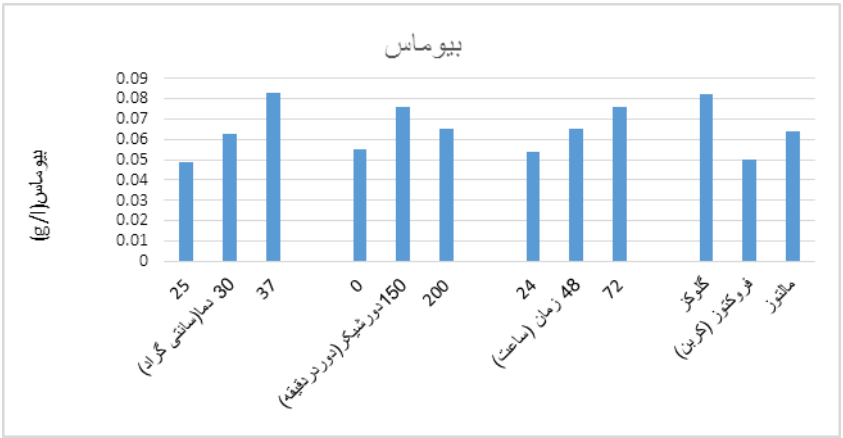
بررسی تولید بیوماس سلولی و PHB در شرایط مختلف رشد سلولی

بیوماس سلولی: طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان بیوماس باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۸۳ گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداقل (۰/۰۴۹گرم در لیتر) بود، در دور شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه حداکثر (۰/۰۷۶ گرم در لیتر) و در بدون شیکر حداقل (۰/۰۵۵گرم در لیتر) بود، در زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت حداکثر (۰/۰۷۶گرم در لیتر) و در ۲۴ ساعت حداقل (۰/۰۵۴گرم در لیتر) بود و در استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن باکتری حداکثر (۰/۰۸۲ گرم در لیتر) و در استفاده از فروکتوز حداقل (۰/۰۵گرم در لیتر) بود. بین فاکتور های مختلف رشد ازلحاظ بیوماس باکتری تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

PHB: طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان PHB باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۱۸گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداقل (۰/۰۰۵گرم در لیتر) بود، طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان PHB باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۱۸گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداقل (۰/۰۰۵گرم در لیتر) بود، در زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت حداکثر (۰/۰۱۶گرم در لیتر) و در ۲۴ ساعت حداقل (۰/۰۰۷گرم در لیتر) بود و در استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن باکتری حداکثر (۰/۰۱۸گرم در لیتر) و در استفاده از فروکتوز حداقل (۰/۰۰۶گرم در لیتر) بود. بین فاکتور های مختلف رشد ازلحاظ PHB باکتری تفاوت معنی داری وجود داشت. هم چنین شرایط بهینه برای تولید بیوماس و PHB، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، دور شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه، زمان ۷۲ ساعت و منبع کربن گلوکز در نظر گرفته شد(جدول ۳).



شکل ۶. میزان PHB تولیدی در شرایط مختلف رشد سلولی



شکل ۷. میزان بیوماس تولیدی در شرایط مختلف رشد سلولی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

جدول ۳: تأثیر عوامل مختلف آزمایشی بر مقدار بیوماس و PHB تولیدی باکتری

دمای انکوباتور (C^0)	دور شیکر (rpm)	زمان انکوباسیون (ساعت)	منبع کربن باکتری	بیوماس (گرم در لیتر)	PHB(گرم در لیتر)
۲۵	۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۲۰	۰/۰۰۱
			گلوکز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۴
			مالتوز	۰/۰۳۰	۰/۰۰۳
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۳۰	۰/۰۰۳
			گلوکز	۰/۰۵۰	۰/۰۰۶
			مالتوز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۴
		۷۲	فروکتوز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۴
			گلوکز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۸
			مالتوز	۰/۰۵۰	۰/۰۰۶
	۱۵۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۳۷	۰/۰۰۳
			گلوکز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۸
			مالتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۴
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵
			گلوکز	۰/۰۶۷	۰/۰۱۰
			مالتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۷
		۷۲	فروکتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۷
			گلوکز	۰/۰۷۷	۰/۰۱۴
			مالتوز	۰/۰۶۷	۰/۰۰۹
	۲۰۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۲۷	۰/۰۰۲
			گلوکز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۶
			مالتوز	۰/۰۳۷	۰/۰۰۳
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۳۷	۰/۰۰۴
			گلوکز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۸
			مالتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵
		۷۲	فروکتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵
			گلوکز	۰/۰۶۷	۰/۰۱۰
			مالتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۷
۳۰	۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۳۰	۰/۰۰۳
			گلوکز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۷
			مالتوز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۴
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۵
			گلوکز	۰/۰۷۳	۰/۰۱۳
			مالتوز	۰/۰۵۳	۰/۰۰۸
		۷۲	فروکتوز	۰/۰۵۰	۰/۰۰۷
			گلوکز	۰/۰۸۳	۰/۰۱۸
			مالتوز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۳
	۱۵۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵
			گلوکز	۰/۰۷۷	۰/۰۱۳
			مالتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۸
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰
			گلوکز	۰/۰۹۰	۰/۰۱۹
			مالتوز	۰/۰۶۷	۰/۰۱۱
		۷۲	فروکتوز	۰/۰۶۷	۰/۰۱۲
			گلوکز	۰/۱۱۰	۰/۰۲۹
			مالتوز	۰/۰۷۷	۰/۰۱۸
	۲۰۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۳۷	۰/۰۰۴
			گلوکز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۱
			مالتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۶
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۶

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

			گلوکز	۰/۰۸۰	۰/۰۱۵
			مالتوز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۹
			فروکتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۱۰
		۷۲	گلوکز	۰/۰۹۰	۰/۰۲۲
			مالتوز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۶
۳۷	۰		فروکتوز	۰/۰۴۰	۰/۰۰۴
		۲۴	گلوکز	۰/۰۸۰	۰/۰۱۳
			مالتوز	۰/۰۵۳	۰/۰۰۷
			فروکتوز	۰/۰۵۰	۰/۰۰۶
		۴۸	گلوکز	۰/۰۹۰	۰/۰۱۷
			مالتوز	۰/۰۶۳	۰/۰۱۰
			فروکتوز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۹
		۷۲	گلوکز	۰/۱۳۳	۰/۰۳۱
			مالتوز	۰/۰۷۳	۰/۰۱۶
	۱۵۰		فروکتوز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۸
		۲۴	گلوکز	۰/۱۲۳	۰/۰۲۵
			مالتوز	۰/۰۸۰	۰/۰۱۳
			فروکتوز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۱
		۴۸	گلوکز	۰/۱۵۷	۰/۰۴۰
			مالتوز	۰/۱۰۰	۰/۰۲۱
			فروکتوز	۰/۰۸۷	۰/۰۱۶
		۷۲	گلوکز	۰/۱۸۸	۰/۰۵۸
			مالتوز	۰/۱۲۰	۰/۰۳۰
	۲۰۰		فروکتوز	۰/۰۵۰	۰/۰۰۶
		۲۴	گلوکز	۰/۰۹۰	۰/۰۱۶
			مالتوز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۱
			فروکتوز	۰/۰۶۰	۰/۰۰۹
		۴۸	گلوکز	۰/۱۲۷	۰/۰۲۹
			مالتوز	۰/۰۸۷	۰/۰۱۷
			فروکتوز	۰/۰۷۰	۰/۰۱۲
		۷۲	گلوکز	۰/۱۶۰	۰/۰۴۴
			مالتوز	۰/۰۸۸	۰/۰۲۰

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش از باسیلوس سرئوس که توسط واکنش PCR شناسایی شده بود، برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده شد و اثر عوامل مختلف رشد بر روی تولید PHB و بیوماس بررسی شد. باکتری فوق ازنظر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیو شیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی ها نشان داد گونه‌ی باسیلوس باکتری هتروتروف، هوازی، گرم مثبت بوده و دارای خصوصیاتی از قبیل داشتن اسپور، واکنش کاتالاز، نیترات، ژلاتین و سیترات بود.

گونه‌ی باسیلوس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دور شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه، زمان ۷۲ ساعت و با مصرف منبع کربن گلوکز بیشترین تولید بیوماس و PHB را داشت. گونه باسیلوس در همین شرایط تولید ۰/۱۸۸ گرم در لیتر بیوماس و ۰/۰۵۸ گرم در لیتر PHB را داشت. طبق نتایج حاصل از GC-Mass درصد تولید PHB در گونه‌ی باسیلوس ۳۰ درصد محاسبه شد.

PHB در میان بیش از بیست جدایه باکتریایی آلکالی ژنز، باسیلوس، ازتو باکتر، رودو سپیریلوم، ریزوبیوم و سودوموناس دیده شده است. در میان جدایه های باسیلوس بیشترین میزان PHB در باسیلوس مگاتریوم y6 به میزان ۴۸/۱۳ ٪ مشاهده شده است (۲۲). در طی بررسی انجام شده بر روی سویه های گوناگون سیانو باکتر در محیط BG11 بین ۱۰/۸۰–۶۵ ٪ و در محیط آلن ۱۱/۸۹–۸۵/۴۵٪ PHB مشاهده شده است. در بررسی دیگر بر روی تولید PHB در لاکتو باسیلوس، استرپتوکوکوس و لاکتو کوکوس، نشان داد که میزان تولید PHB در جدایه های لاکتو

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

باسیلوس ۰/۹۳-۹ ٪، لاکتو کوکوس ۷/۰۹- ۱۶ و استرپتو کوکوس ۵/۴۷-۲۱/۱۵ ٪ است و بیش ترین میزان تولید PHB در استرپتو کوکس ترمو فیلوس ۲۱/۱۵ ٪ گزارش شده است (۲۳). قاتنکار و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که می توان میزان PHB را در متیلو باکتریوم *V49* با تغییر محیط کشت به میزان ۹۸ ٪ افزایش داد(۲۴). خنافری و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که می توان با کشت باکتری ازتو باکتر در محیط Whey broth در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۲۲ rpm میزان PHB را به ml/lit ۴ رساند (۱۰). اسلیم و همکاران در سال ۲۰۰۲ با جایگزین کردن ۱ ٪ گلوکز در محیط کشت جدایه باسیلوس میزان PHB را ۱/۵۶-۲/۶۴ میکرو گرم تخمین زد(۸).

این مواد زیستی می توانند برای تولید مواد بسته بندی تجزیه پذیر زیستی مثل بطری و فویل به کار روند. هم چنین کاربرد های بسیار زیادی برای این دسته از بیو پلیمر ها پیشنهاد شده است که می توان به تولید بیو تکنو لوژیک و نانو، کاربرد های پزشکی، کاربرد های قلبی -عروقی، کاربرد های دندانی، بازسازی هدایت شده استخوان، قرص ها، حاملین ذره ای، پیش دارو، تعمیر اعصاب، استفاده در تغذیه انسان و حیوانات، ارتوپدی، نخ بخیه، ذرات پودری، زخم بندی و ترمیم بافت نرم اشاره کرد (۲۳).

هم اکنون بیش از ۱۶۰ پلی استر بیو لوژیک متفاوت با خواص پلاستیکی وجود دارد و این تعداد هر روزه در حال افزایش است. برای جایگزینی بیو پلاستیک ها به‌جای پلاستیک های غیر قابل تجزیه، امروزه کوشش های زیادی لازم است و بنا بر این آینده بیو پلاستیک ها به ادامه تلاش ها در زمینه کاهش قیمت تولید بستگی خواهد داشت. در هر صورت می توان بیو پلاستیک ها را به دلیل ویژگی های خاص و کاربرد های بیو تکنو لوژیک وسیع، ترکیباتی با آینده بسیار اطمینان بخش قلمداد نمود.

References

1.Mokhtarani N, Ganjidoste H, Vashaghanifarahani E, Khalegisarnami M. [Isolation of PHA producing bacteria from a date syrup waste]. Ir J Pol Technol2008; 21: 80-93. (Persian)

2.Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K. Biosynthesis of poly hydroxy alkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. J Biores Tech 2008; 99: 6844.

3.Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly 3-hydroxyalkanoates from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 21-53.

4.Flecher A. Plastics from bacteria and for bacteria PHA as natural biodegradable polyesters. Springer Verlag New York 1993; 6: 77-93.

5.Anderson AJ, Haywood GW, Dawes EA. Biosynthesis and composition of bacterial poly hydroxyalkanoates. Int J Biol Macromol 1990; 12: 102-5.

6.Hrabak O. Industrial production of polyhydroxy alkanoate. FEMS J Microbiol Rev 1992; 103: 251- 6.

7.Aslim B, Caliskan F, Beyaeli Y. Poly-β –hydroxy butyrate production by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Let 2008; 2: 293-7.

8.Aslim B, Yuksekdag Z, Beyatli Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Turk Elec J Biotech2003; 5: 24-30.

9.Aquilanti L. Favilli F, Clementi F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azetobacte*r from soil samples. Soil Biol Biotech 2004; 36:1475-83.

10.Khanafari A, Akhavan Sepahei A, Mogharab M. Production and Recovery of poly-â-hydroxybutyrate from whey degradation by *Azetobacter*. Ir J Environ Health Sci Eng2006;3: 193-8.

11.Bialy H. Biotechnology bioremediation and blue genes. Nat Biotechnol 1997; 15: 110.

12.Brandl H, Bachofen R, Mayer J, Wintermantel E. Degradation and applications of poly hydroxy alkanoates. Can J Microbiol 1995; 41: 143-53.

13.Abe H, Doi T, Fukushima Eya H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium chain length 3-hydroxy-

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

alkanoates by *Pseudomonas* sp. Int J Biol Macrom1994; 16: 115-21.
14.Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence metabolism metabolic role and industrial uses of bacterial poly hydroxyl alkanoates. Rev Microbiol1998; 54: 450- 72.
15.Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly betahydroxyalkanoates for potential applications as biodegradable polyesters. Appl Environ Microbiol 1998; 54: 1977-82.
16.Luengo JM, Garcia B, Sandoval A, Nahorro G, Olivera ER. Bioplastics from microorganisms current. Opin Microbiol 2003; 6: 251-60.
17.Ataei SA, Vashaghani Farahani E, Shojaosadat SA, Abdul Tehrani H. Isolation of PHA producing bacteria from a date syrup waste. Macrom Sym2008;269:11-6.
18.Mohseni A, Ataei SA, Fazaelipoor MH.[Isolation of a strain of *Bacillus subtilis* from Kerman Pegah milk factory to produce Poly hydroxyl butyrate]. J Sep Sci Eng2011; 3:35-42. (Persian)
19.Choi J, Lee SY. Process analysis and economic evaluation for poly-3-hydroxybutyrate production by fermentation. Bioproce Eng 1997; 17: 335-42.
20.Das S, Surendran PK, Thampuran NK. PCR based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Ind J Med Res2009; 129: 20.
21.Ankolekar C, Rahmati T, Labbe RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. Rice. Int J Food Microbiol2009;128:6.
22.Aslim B, Caliskan F, Beyatli Y, Gunduz U. Poly-β-hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Let 1998; 159: 293-7.
23.Yuksekdag Z, Beyatli Y. Production of poly-beta-hydroxybutyrate in different media by *Streptococcus thermophilus* Ba21S strain. J App Biol Sci 2007; 74: 981.
24.Ghatnekar MS, Pai JS, Ganesh M. Production and recovery of Poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. J Chem Technol Biotech2002;77:4.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]

Isolation of Biodegradable Plastic Producing Bacteria from Soil Contaminated Sewage in Ilam Milk Manufactory

Rostamzad A [1], Rezaee H [1] , Hoshmndfar R [2]*

(Received: December 27, 2016 Accepted: July 19, 2017)

Abstract

Introduction: The use of synthetic plstics has led to solid waste management problem and secondary problems such as global warming. In response to these issues, use of biodegradable polimers such as polyhydroxy butyrate (BHP) is suitable. The aim of this research was to evaluate maximum production of BHP and cell biomass in different growth condition as temperature, carbon source, incubation time and shaker speed.

Materials & methods: To evaluate BHP production, a total of 10 bacteria species isolated from soil contaminated to sewage in Ilam milk maufactory were tested for exictance of BHP using soudan black staining. Among all isolates, only one bacillus species had BHP. This species was diagnosed as *bacillus cereus* using biochemical tests and PCR reaction by using universal primer. The evaluation of BHP production has been carried out using GC-Mass and FTIR apparatues, and for maximum production of BHP and cell biomass, the effects of differences growth inducer factors such as temperature, carbon sources, shaking(aeration) and incubation time were tested.

Findings: In this survey we found that, the optimum condition for maximum production of PHB and biomas was incubation at 37˚C for 72h and shaking in 150rpm/min, uses of glucose as carbon source, and the ratres of PHB and biomass production were 0.188g/lit, 0.058g/lit respectivlly. Regarding GC-Mass results, the average of PHB production was 30%.

Discussion & Conclusions: Using cheap sources of carbon, one can enhance production of this biopolymer in the industerial scale for replacement of synthetic plastic to prvent bioenvironmental contamination.

Keywords: Polyhydroxy butyrate, Bacillus cereus, Soudan black, PCR, GC-Mass

1.Dept of Biology, Faculty of Sciences, Ilam University, Ilam, Iran
2.Central Laboratory, Ilam University, Ilam, Iran
** Correspondin author Email: arostamzad381@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.125]