

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 تخریب پذیر همانند پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) مناسب می باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی تولید حداکثری پلی هیدروکسی بوتیرات و تولید بیوماس سلولی در شرایط مختلف رشد از جمله فاکتور های دما، منبع کربن، دور شیکر و زمان انکوباسیون 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 پلی هیدروکسی بوتیرات 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 ایتیمما 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 نتیجه گیری: 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 به جای پلاستیک های سنتتیک مورد استفاده قرار داد تا از آلودگی محیط زیست جلوگیری شود.

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

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

Email: arostamzad381@yahoo.com

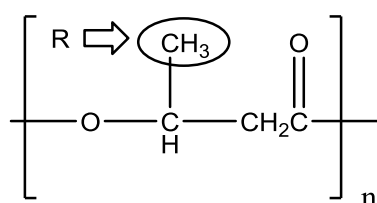
Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material,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

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، چالش های 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 می شود (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 زئوبیوتیک 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 ارگانیسم ها با محدودیت هایی مواجه است (۶).

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یکی از انواع پلی هیدروکسی آلکانوات ها می باشد 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 بیولوژیک پلی هیدروکسی بوتیرات در شرایط هوازی منجر به تولید آب و دی اکسید کربن می گردد، درحالی که 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 بیولوژیک آن ادامه می یابد. به این ترتیب در صورت جایگزینی این مواد به جای 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 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 ارگانیسم های مختلف تولید می شود و به همین دلیل مسیر های سنتز بسیار متفاوتی در سلول طی می نماید. اما به طور کلی 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).

ابتدا پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان لایه های بسته بندی کیسه ها و ظروف به کار برده می شد، سپس به عنوان براق کننده کاغذ مورد استفاده 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 این که 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 آنتی بیوتیک های بتا لاکتام و دارو های چشمی استفاده نموده است. به نظر می رسد 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 تولید کننده 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 ۱ ML 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 به صورت 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 (به صورت 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، $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۷ گرم در لیتر، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۲ گرم در لیتر، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۱ گرم در لیتر. سه نوع محیط کشت بذر با منبع کربن متفاوت درست کرده و در لوله های در پیچ دار ۱۰ ML ریخته و پس از کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۸).

$$PHB\% = \text{Absorbance in } 235 \text{ nm} / \text{CDW} \times 10 \text{ ml} \times 100$$

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 بنزویک به عنوان استاندارد داخلی) به بیوماس به دست 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، به صورت 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 ۰.۲۵ μm، طول ستون ۳۰ متر و قطر ستون ۰.۲۵ mm، ساخت شرکت اچیلنت 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

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 میلی لیتر 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 ۲۳۵ nm بررسی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۹).

گرماد 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 مرزی (PCR): استخراج DNA از باسیلوس سرئوس با استفاده از روش انجماد و جوش

انجام گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مرزی (PCR) و تعیین توالی جهت تأیید باکتری توسط پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس انجام پذیرفت. برای انجام PCR، پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس، ژن F *Bal* و *Bal R* با توالی های زیر به کار برده شد (۲۰، ۲۱).

جدول ۱. مشخصات پرایمر های مورد استفاده در PCR

Gene primer	Gene sequence	Length of product
Bal Forward	5'- TGCAACTGTATTAGCACAAAGC T -3'	533 bp
Bal Reverse	5'- TACCACGAAGTTTGTTCCTACTACT -3'	

DNA توسط پلیمرز 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.

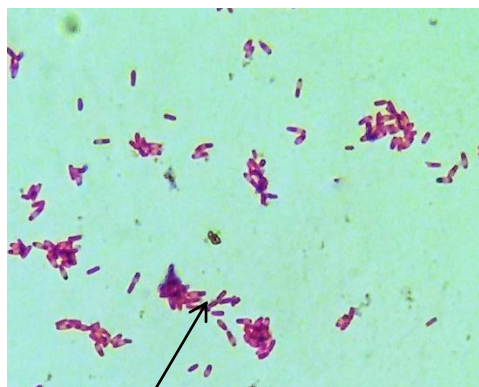
یافته های پژوهش

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).

برای انجام واکنش PCR پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس مخلوط واکنش شامل بافر PCR (۵ میلی مول KCl، ۹۰ PH 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 پلیمرز (۵ واحد در میکرو لیتر) و DNA (۲۰ نانوگرم در میکرو لیتر) 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

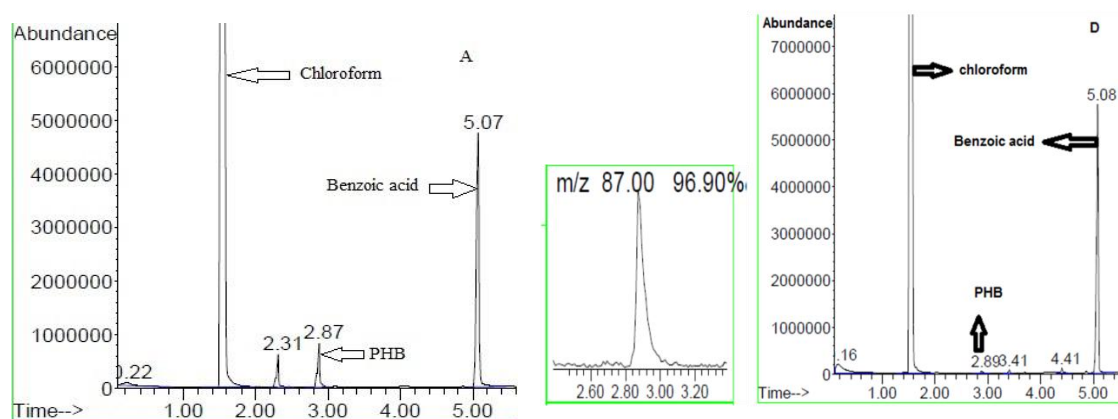


شکل ۲. گونه میکروبی به رنگ قرمز و دانه های PHB به رنگ آبی پر رنگ

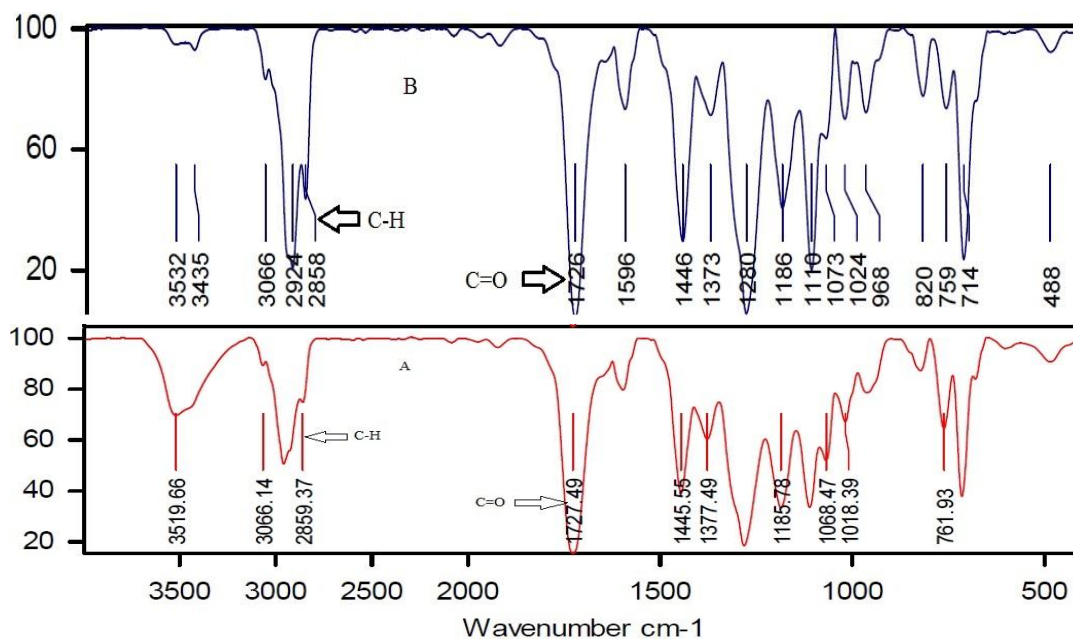
نتایج حاصل از GC-Mass و FTIR

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 1726cm^{-1} ، گروه اتیری (C-O) در 1186cm^{-1} و 1280cm^{-1} ، گروه C-H در 2858cm^{-1} دیده می شوند که با طیف PHB، FTIR، 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

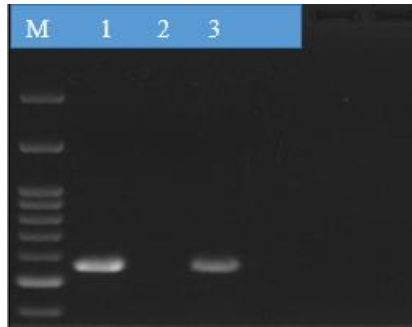


شکل ۴. نمودار A، FTIR مربوط به PHB استاندارد و B، FTIR مربوط به PHB تولید شده توسط باسیلوس

نتایج حاصل از PCR: پس از انجام آزمون های بیه

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 جدا شده 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 R و Bal F نشان می دهد. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه مربوط به باسیلوس سرئوس است که در آزمایشگاه جدا سازی و شناسایی شده است.



شکل ۵. الکتروفورز محصول PCR: DNA ladder 500bp و M= چاهک شماره ۱ = کنترل مثبت (*Bacillus cereus* ATCC14579) و ۲ = کنترل منفی و شماره ۳ = نمونه باسیلوس سرئوس جدا شده 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 بیه ماس و PHB باکتری مورد تحقیق در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) معنی دار بود. در تولید بیه 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) از لحاظ تولید PHB در باکتری مورد تحقیق در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۲).

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

میانگین مربعات صفات		df	منبع تغییر
PHB	بیوماس		
۰/۰۰۳**	۰/۰۳۴**	۲	دما
۰/۰۰۰۹۳۸**	۰/۰۰۹۳**	۲	دور
۰/۰۰۳**	۰/۰۲۱**	۲	کربن
۰/۰۰۱۶۷**	۰/۰۰۸۷**	۲	زمان
۰/۰۰۰۱۴۴**	۰/۰۰۰۴**	۴	دما * دور
۰/۰۰۰۵۲۸**	۰/۰۰۰۹۶**	۴	دما * کربن
۰/۰۰۰۲۱**	۰/۰۰۰۰۲۱ ^{ns}	۴	دما * زمان
۰/۰۰۰۰۹۳**	۰/۰۰۰۰۸۷ ^{ns}	۴	دور * کربن
۰/۰۰۰۰۳۴**	۰/۰۰۰۰۳۳ ^{ns}	۴	دور * زمان
۰/۰۰۰۱۵۹**	۰/۰۰۰۰۱ ^{ns}	۴	کربن * زمان
۰/۰۰۰۰۳**	۰/۰۰۰۰۸۸ ^{ns}	۸	دما * دور * کربن
۰/۰۰۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۳۹ ^{ns}	۸	دما * دور * زمان
۰/۰۰۰۰۰۵**	۰/۰۰۰۰۲۹ ^{ns}	۸	دور * کربن * زمان
۰/۰۰۰۰۲۱**	۰/۰۰۰۰۱۹ ^{ns}	۲۴	دما * دور * کربن * زمان
۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱۰۳	۱۶۲	خطای آزمایشی

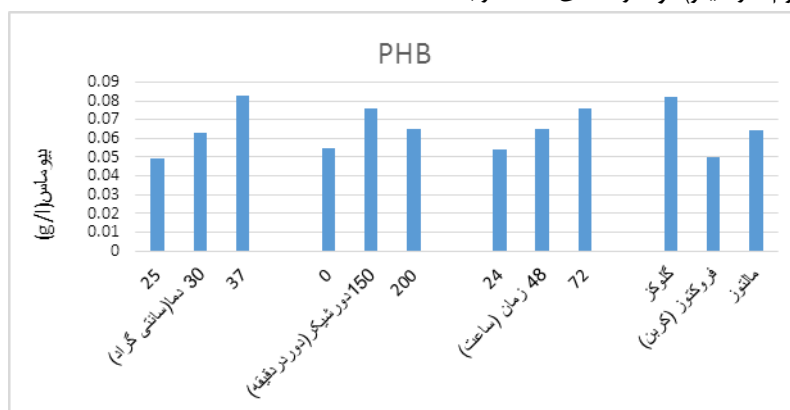
df - درجه آزادی، علامت * و ** به ترتیب بیانگر وجود تفاوت آماری معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است. علامت ns بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها است.

بررسی تولید بیوماس سلولی و PHB در شرایط مختلف رشد سلولی

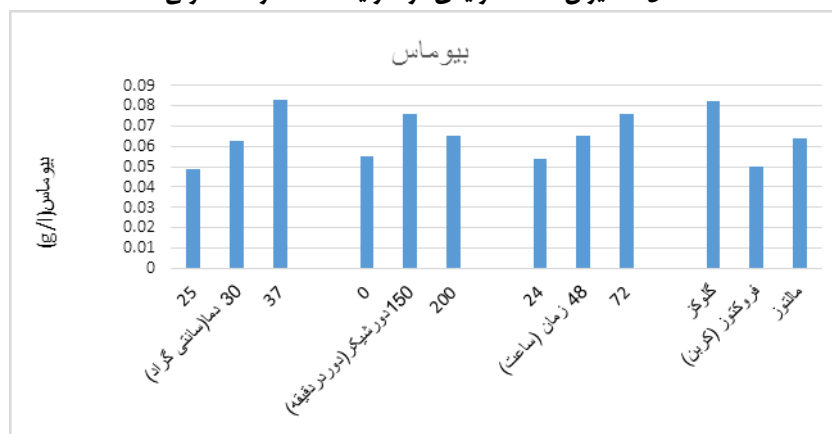
بیوماس سلولی: طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان بیوماس باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۸۳ گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداقل (۰/۰۴۹ گرم در لیتر) بود، در دور شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه حداکثر (۰/۰۷۶ گرم در لیتر) و در بدون شیکر حداقل (۰/۰۵۵ گرم در لیتر) بود، در زمان انکوباسیون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

PHB: طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۱۸ گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه

سلسیوس حداقل (۰/۰۰۵ گرم در لیتر) بود، طبق نتایج مقایسه میانگین، میزان PHB باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداکثر (۰/۰۱۸ گرم در لیتر) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداقل (۰/۰۰۵ گرم در لیتر) بود، در زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت حداکثر (۰/۰۱۶ گرم در لیتر) و در ۲۴ ساعت حداقل (۰/۰۰۷ گرم در لیتر) بود و در استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن باکتری حداکثر (۰/۰۱۸ گرم در لیتر) و در استفاده از فروکتوز حداقل (۰/۰۰۶ گرم در لیتر) بود. بین فاکتور های مختلف رشد از لحاظ 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

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
۳۰	۰	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
	۲۰۰	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
۳۰	۱۵۰	۲۴	فروکتوز	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵
			گلوکز	۰/۰۷۷	۰/۰۱۳
			مالتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۸
		۴۸	فروکتوز	۰/۰۵۷	۰/۰۰۰
			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

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

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 از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیو شیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی ها نشان داد گونه ی باسیلوس باکتری هتروتروف، هوازی، گرم مثبت بوده و دارای خصوصیات از قبیل داشتن اسپور، واکنش کاتالاز، نیترات، ژلاتین و سیترات بود.

گونه ی باسیلوس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، 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 گونه ی باسیلوس ۳۰ درصد محاسبه شد.

PHB در میان بیش از بیست جدایه باکتریایی آلکالی ژنز، باسیلوس، از تو باکتر، رودو سپریلوم، 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

دسته از بيو پليمرها پيشنهاده شده است كه مي توان به توليد بيو تكنو لوژيك و نانو، کاربرد هاي پزشكي، کاربرد هاي قلبي -عروقي، کاربرد هاي دندان، بازسازي هدايت شده استخوان، قرص ها، حاملين ذره اي، پيش دارو، تعمير اعصاب، استفاده در تغذيه انسان و حيوانات، ارتوپدي، نخ بخيه، ذرات پودري، زخم بندي و ترميم بافت نرم اشاره كرد (۲۳).

هم اكنون بيش از ۱۶۰ پلي استر بيو لوژيك متفاوت با خواص پلاستيكي وجود دارد و اين تعداد هر روزه در حال افزايش است. براي جاگزيني بيو پلاستيك ها به جاي پلاستيك هاي غير قابل تجزيه، امروزه كوشش هاي زيادي لازم است و بنا بر اين آينده بيو پلاستيك ها به ادامه تلاش ها در زمينه کاهش قيمت توليد بستگي خواهد داشت. در هر صورت مي توان بيو پلاستيك ها را به دليل ويژگي هاي خاص و کاربرد هاي بيو تكنو لوژيك وسيع، تركيباتي با آينده بسيار اطمينان بخش قلمداد نمود.

باسيلوس ۹-۰/۹۳٪، لاکتو كوكوس ۷/۰۹-۱۶ و استرپتو كوكوس ۲۱/۱۵-۵/۴۷٪ است و بيش ترين ميزان توليد PHB در استرپتو كوكس ترمو فيلوس ۲۱/۱۵٪ گزارش شده است (۲۳). قاتنكار و همكاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند كه مي توان ميزان PHB را در متيلو باكتريوم V49 با تغيير محيط كشت به ميزان ۹۸٪ افزايش داد(۲۴). خنافري و همكاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند كه مي توان با كشت باكتري ازتو باكتري در محيط Whey broth در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتي گراد و دور شيكر ۱۲۲ rpm ميزان PHB را به ۴ ml/lit رساند (۱۰). اسليم و همكاران در سال ۲۰۰۲ با جاگزين كردن ۱٪ گلوکز در محيط كشت جدايه باسيلوس ميزان PHB را ۲/۶۴-۱/۵۶ ميكرو گرم تخمين زد(۸).

اين مواد زبستي مي توانند براي توليد مواد بسته بندي تجزيه پذير زبستي مثل بطري و فويل به كار روند. هم چنين کاربرد هاي بسيار زيادي براي اين

References

1. Mokhtarani N, Ganjidoste H, Vashaghanifarhahani E, Khalegisarnami M. [Isolation of PHA producing bacteria from a date syrup waste]. Ir J Pol Technol 2008; 21: 80-93. (Persian)
2. Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K. Biosynthesis of poly hydroxy alkanate 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 alkanate. 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, Yuksekdog Z, Beyatli Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Turk Elec J Biotech 2003; 5: 24-30.
9. Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azetobacter* from soil samples. Soil Biol Biotech 2004; 36: 1475-83.
10. Khanafari A, Akhavan Sepahei A, Mogharab M. Production and Recovery of poly-α-hydroxybutyrate from whey degradation by *Azetobacter*. Ir J Environ Health Sci Eng 2006; 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 alkanates. 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-

- alkanoates by *Pseudomonas* sp. Int J Biol Macromol 1994; 16: 115-21.
14. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence metabolism metabolic role and industrial uses of bacterial poly hydroxyl alkanoates. Rev Microbiol 1998; 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 Sym 2008; 269: 11-6.
18. Mohseni A, Ataei SA, Fazelipour MH. [Isolation of a strain of *Bacillus subtilis* from Kerman Pegah milk factory to produce Poly hydroxyl butyrate]. J Sep Sci Eng 2011; 3: 35-42. (Persian)
19. Choi J, Lee SY. Process analysis and economic evaluation for poly-3-hydroxybutyrate production by fermentation. Bioproc 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 Res 2009; 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 Microbiol 2009; 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 Biotech 2002; 77: 4.

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

Rostamzad A^{*}, Rezaee H¹, Hoshmndfar R²

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

Abstract

Introduction: The use of synthetic plastics has led to solid waste management problem and secondary problems such as global warming. In response to these issues, use of biodegradable polymers 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 manufactory were tested for existence of BHP using sudan 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 apparatuses, 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 biomass was incubation at 37°C for 72h and shaking in 150rpm/min, uses of glucose as carbon source, and the rates of PHB and biomass production were 0.188g/lit, 0.058g/lit respectively. 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 industrial scale for replacement of synthetic plastic to prevent bioenvironmental contamination.

Keywords: Polyhydroxy butyrate, *Bacillus cereus*, Sudan 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