مجله تحقیقات آب و خاک ایران (۴۳) ۳، ۱۳۹۱ (۲۲۹-۲۲۱)

تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط ریز موجودات جدا شده از خاک مکان‌های دفن زباله

عاطفه اسماعیلی[۱]، احمدعلی پوربابایی[۲]* و حسینعلی علیخانی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد [۲] استادیار، [۳] دانشیار، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۱۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۷/۱۹)

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی همچون الیگواتیلن جزء مهمی از آلاینده‌های خاک و آب به شمار می‌روند. بعلت عدم کارایی و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از روش‌های حذف شیمیایی و فیزیکی، در این تحقیق با هدف دستیابی به جدایه‌های توانمند تجزیه کننده الیگواتیلن، یک جدایه باکتری، *Lysinibacillus xylanilyticus* و یک جدایه قارچ، *Aspergillus niger* از طریق روش غنی‌سازی از خاک‌های مکان‌های دفن زباله جداسازی شدند. توانایی تجزیه الیگواتیلن توسط این جدایه‌ها در محیط معدنی حاوی ۱٪ (V/V) الیگواتیلن مایع به عنوان تنها منبع کربن پس از ۳۰ روز گرماگذاری بر روی شیکر در دمای ۳۰°C سنجش شد. پس از گذشت زمان یاد شده، زیست‌توده قارچ برابر با ۰/۱۳۷۰ گرم به ازای ۱۰۰ml محیط کشت اندازه‌گیری شد و میزان رشد باکتری به ۳/۲ برابر مقدار اولیه خود ($۱/۵ \times ۱۰^{۸} CFU.ml^{-1}$) رسید که نشان دهنده مصرف الیگواتیلن بعنوان تنها منبع کربن بود. نتایج آنالیز FTIR نمونه‌ها، اکسایش ترکیب و تشکیل گروه‌های کربونیل طی فرآیندهای اکسیداسیون توسط هر دو جدایه را اثبات نمود.

واژه‌های کلیدی: الیگواتیلن، خاک، *Aspergillus* ، FTIR، *Lysinibacillus*

مقدمه[۱]

محصولات صنایع پتروشیمی منبع اصلی انرژی برای زندگی صنعتی و روزانه ما هستند. ورود هیدروکربن‌های نفتی به محیط زیست بصورت تصادفی و یا به دلیل فعالیت‌های بشر، علت اصلی آلودگی آب و خاک است. استفاده گسترده و سابقه طولانی کاربرد این ترکیبات، منجر به آلودگی تقریبا تمامی بخش‌های محیط‌زیست شده است (Chaillan et al., 2004). هیدروکربن‌ها ترکیباتی هستند که تنها از اتم‌های کربن و هیدروژن تشکیل شده اند. بدلیل فقدان گروه‌های عملکردی، این ترکیبات بسیار غیرقطبی بوده و واکنش‌گری پایینی را در دمای اتاق از خود نشان می‌دهند (Widdel and Rabus, 2001). آلودگی زیست‌بوم‌های خاک و آب به این گونه ترکیبات، از مشکلات جوامع امروز محسوب می‌گردد. بنابراین چگونگی پالایش و حذف آن‌ها از محیط از جمله اقدامات ضروری برای حفظ محیط زیست سالم است. روش‌های متعددی جهت پالایش آلاینده‌ها از محیط توسعه یافته که در میان آنها زیست‌پالایی بدلیل امکان استفاده مجدد از خاک، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است (Mancera-Lopez et al., 2008). تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها توسط ریز موجودات، مهمترین فرآیند فعال در محیط‌های آلوده به این ترکیبات است. تا کنون ریز موجودات متعددی از گروه قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها جهت استفاده از توانایی شان در تجزیه هیدروکربن‌ها شناسایی شده‌اند (Chaillan et al., 2004).

پلاستیک‌ها از پلیمرهای سنتزی صنایع پتروشیمی هستند که در مقیاس بالا، چرخه خود را با ورود به محیط زیست به پایان می‌رسانند. دوام و پایایی این ترکیبات، منجر به تجمع جهانی سالانه ۵۷ میلیون تن ضایعات پلاستیکی شده است (Kathiresan, 2003). پلی‌اتلین پلیمری متشکل از زنجیره‌های بلند مونومرهای اتیلن است که به عنوان ترکیب اصلی در ساخت انواع محصولات پلاستیکی بکار می‌رود. این پلیمرهای سنتزی، بویژه انواع نامحلول در آب همچون پلی‌اتیلن، نسبت به تجزیه میکروبی مقاوم اند اما می‌توان انتظار داشت که الیگومرهای این پلیمرهای نامحلول در آب، توسط ریز موجودات قابل تجزیه باشند. لذا این الیگومرها می‌توانند آنزیم‌های تجزیه کننده پلیمر متناظر خود را القا کنند (Hosaya et al., 1978). الیگواتیلن (اتیلن الیگومر) به فرم مایع، هیدروکربنی از گروه آلکن‌ها با ۴۰-۲۰ اتم کربن (C_{20-40} H_{40-80}) است. این ترکیب نیز همانند پارافین (پلی‌اتیلن با زنجیره کوتاه با ساختاری مشابه الیگواتیلن) و سایر هیدروکربن‌های آلیفاتیک، واکنش‌پذیری شیمیایی محدود و زیست دسترس‌پذیری بسیار پایینی را در برابر ریزموجودات نشان می‌دهد. با این وجود برخی از ریزموجودات قادر به استفاده از این ترکیبات بعنوان منبع کربن و انرژی برای رشد خود هستند (Volke-Sepulveda et al.,

* نویسنده مسئول: Pourbabaei@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

2006). اخیرا قارچها بدلیل توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه کننده آلاینده‌های سرسخت و قابلیت نفوذ هیف‌هایشان جهت دسترسی به آلاینده‌های موجود در لایه‌های زیرین خاک، پتانسیل بالایی را در زیست‌پالایی کسب کرده‌اند (Husaini et al., 2008). از طرفی مطالعات بسیاری نیز بر تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از جدایه‌های توانمند باکتریایی متمرکز شده اند. *Pseudomonas putida* GPo1 بعنوان یکی از جدایه‌های توانمند در تجزیه آلکان‌ها در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. (Sood and Lal, 2008). همچنین سویه‌های متعددی از *Acinetobacte*r در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های پارافینی با ۴۴-۲۰ اتم کربن (C_{20}-C_{44}) شناسایی شده‌اند (Sood and Lal, 2008). در مطالعه حاضر، تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط ریز موجودات جداسازی شده از مکان‌های دفن زباله مورد ارزیابی قرار گرفت که می‌توان در مطالعات آتی، توانایی تجزیه پلی‌اتیلن توسط این ریز موجودات را مورد سنجش قرار داده و با بکارگیری انواع توانمند در تجزیه پلی‌اتیلن، طی فرآیند تجزیه زیستی، به کاهش حجم بالای ضایعات پلاستیکی در محیط زیست کمک نمود.

مواد و روش‌ها

مواد

اتیلن الیگومر(الیگو اتیلن) به فرم مایع از واحد تولید پلی‌اتیلن سبک خطی شرکت پتروشیمی اراک با فرمول $C_{20\text{-}40}$ $H_{40\text{-}80}$ تهیه شد و در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. پلی‌اتیلن گرانوله با دانسیته پایین (LF0200) از شرکت پتروشیمی اراک تهیه و برای تهیه صفحات پلی‌اتیلن مورد استفاده قرار گرفت. صفحات پلی اتیلن مورد استفاده در آزمایشات غنی‌سازی (با قطر یک میلیمتر) توسط پژوهشکده پلیمر و پتروشیمی ایران با استفاده از پلی‌اتیلن گرانوله با دانسیته پایین، از طریق دستگاه پرس داغ تهیه و برای انجام آزمایشات، در اختیار این پژوهش قرار گرفت.

نمونه‌برداری از خاک

به منظور جداسازی ریز موجودات توانمند تجزیه کننده ترکیبات اتیلنی، نمونه‌های خاک از مکان‌های دفن زباله واقع در کهریزک تهران، از اطراف مواد پلی‌اتیلنی دفن شده (ظروف یکبار مصرف و انواع کیسه‌های پلاستیکی) جمع‌آوری شد.

آزمایشات غنی‌سازی

آماده سازی و ضدعفونی کردن صفحات پلی‌اتیلن برای انجام آزمایشات غنی‌سازی

برای این منظور، صفحات پلی‌اتیلن به قطعات تقریبی ۳×۳ سانتیمتر بریده شدند و بصورت واحدهای ۳۰۰ میلی‌گرمی توزین و به مدت ۱۲ ساعت در دمای $60^{o}C$ در آون خشک شدند. پس از آن، واحدها بصورت جداگانه در محلول اتانول ۷۰٪ (حجمی به حجمی) به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در زیر لامینار هوا خشک شده و تا انجام آزمایشات در دمای $4^{o}C$ نگهداری شدند (Hadad et al., 2005).

غنی‌سازی با استفاده از فیلم پلی‌اتیلن سبک

در این روش، ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مکان‌های دفن زباله به لوله‌های آزمایش حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی SM (NH_4NO_3, 1 g., K_2HPO_4, 1 g., $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 g., $CaCl_2.2H_2O$, 0.1 g., KCl, 0.15 g., Yeast axtract, 0.1 g., و یک میلی‌گرم از $ZnSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$, $FeSO_4.6H_2O$بر حسب گرم در لیتر آب مقطر) که به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $120^{\circ}C$ استریل شده بود افزوده و به هر لوله ۳۰۰ میلی‌گرم صفحات پلی‌اتیلن سبک (که از قبل آماده و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد) اضافه شد. سپس لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ماه در گرمخانه گرماگذاری شدند (Gilan et al., 2004).

غنی‌سازی با استفاده از پودر پلی اتیلن سبک

در این مرحله، ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی-لیتر محیط نمکی SM به همراه ۱ گرم پودر پلی‌اتیلن و ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک، آماده و به مدت ۳ ماه در دمای $30^{o}C$ بر روی شیکر با شدت ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (Modified method of Gilan et al., 2004).

جداسازی ریز موجودات تیمار شده در مراحل غنی‌سازی

جداسازی اولیه ریز موجودات بر اساس کشت سطحی از محیط-های غنی‌سازی بر روی پلیت‌های حاوی محیط پایه نمکیSM ، ۱٪ پارافین خطی مایع به عنوان تنها منبع کربن (Albertsson et al., 1987)، ۰/۱٪ توئین۲۰ (Hadad et al., 2005) انجام شد. جدایه‌های رشد یافته، بر اساس مقایسه توانایی رشد انتخاب و پس از خالص‌سازی، جهت سنجش توانایی رشد، بر روی پلیت-های حاوی محیط پایه نمکی SM و ۲٪ الیگواتیلن مایع به عنوان تنها منبع کربن مایه‌زنی شدند. در این مرحله نیز همانند قبل، انتخاب جدایه‌های رشد یافته، بر اساس مقایسه توانایی رشد انجام شد. در گام بعدی، توانایی رشد جدایه‌های منتخب در محیط معدنی مایع (SM) حاوی درصدهای مختلف الیگواتیلن به عنوان تنها منبع کربن (۳، ۴ و ۵٪) مورد ارزیابی قرار گرفت و جدایه‌های برتر باکتریایی از طریق اندازه‌گیری میزان رشد در محیط مایع (اندازه‌گیری چگالی نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و سنجش تغییرات pH محیط (بر مبنای میزان کاهشpH محیط طبق مکانیسم تجزیه زیستی الیگواتیلن (Albertsson et al., 1987;

Archive of SID
www.SID.ir

Manzur et al., 2004; Arutchelvi et al., 2008) و جدایه‌های برتر قارچ از طریق مقایسه وزن زیست‌توده قارچی به همراه سنجش تغییرات pH محیط انتخاب شدند.

شناسایی جدایه‌های برتر تجزیه کننده الیگواتیلن

جدایه برتر باکتری (S7-10F) پس از خالص‌سازی در محیط نوترینت آگار (NA) و رنگ‌آمیزی به روش گرم مورد مشاهدات میکروسکوپی قرار گرفت. آزمایشت بیوشیمیایی شامل آزمایش کاتالاز بر اساس تشکیل حباب‌های اکسیژن، آزمایش اکسیداز با استفاده از معرف تترا متیل پارا فنیلین دی آمین دی هیدروکلراید، سنجش توان تولید اسید از قندها، تولید لیستیناز، سیتراتاز، آزمون سنجش نیاز به اکسیژن، رشد در غلظت‌های مختلف نمک و هیدرولیز نشاسته مطابق روش‌های پیشنهادی توسط Parry et al. (1988) انجام شد. استخراج و تکثیر ژن 16S rDNA در مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران انجام شد و تعیین توالی توسط شرکت ماکروژن در کره جنوبی صورت گرفت و نهایتا در بانک ژنی (GenBank) تحت شماره دسترس JF838304 ثبت گردید.

برای شناسایی جدایه برتر قارچی (F1)، خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی شامل مرفولوژی تک‌کلنی‌های قارچ، شکل اسپور و اندامک‌های قارچی شامل میسلیوم‌های هوایی، میسلیوم‌های فرعی، دیواره میسلیوم‌ها و کنیدی با استفاده از روش کشت بر روی اسلاید بررسی و نتایج با اطلس مرجع جهت شناسایی جنس و گونه مقایسه گردید (Watanabe, 2002).

بررسی تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط جدایه‌ها

تهیه زاد مایه

برای تهیه زاد مایه جدایه قارچی (F1) ، جدایه مذکور درون لوله‌های آزمایش حاوی محیط مالت اکسترکت آگار (MEA) که بصورت شیب دار بسته شده بود، کشت و به مدت ۷-۵ روز تا کامل شدن رشد و ظهور اسپور در دمای ۳۰°C گرماگذاری شد. پس از طی زمان یاد شده، اسپورهای قارچ با استفاده از سرم فیزیولوژیک استریل حاوی ۰/۱٪ توبین ۲۰ به درون لوله‌های آزمایشی که از قبل استریل شده بود شسته و تعداد اسپورها از طریق لام نئوبار شمارش و معادل 1×10^{6} spore.ml^{-1} تنظیم شد (Manzur et al., 2004).

برای تهیه زادمایه جدایه باکتری، ابتدا جدایه برتر (S7-10F) درون محیط کشت NB تا رسیدن به فاز لگاریتمی رشد (حدود ۱۶ ساعت) کشت داده شد. پس از آن میزان جذب محیط حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و جمعیت باکتری با استفاده از سرم فیزیولوژیک استریل مطابق با تیوپ ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^{8}$ CFU.ml^{-1}) تنظیم شد.

آزمایشات تجزیه زیستی الیگو اتیلن

برای مطالعه تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط جدایه باکتری (S7-10F)، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با جمعیت $1/5\times10^{8}$ CFU.ml^{-1} به ارلن های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت زیر (بر حسب گرم در لیتر آب مقطر): NH_4NO_3, 1 g., K_2HPO_4, 1 g., $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 g., $CaCl_2.2H_2O$, 0.1 g., KCl, 0.15 g., Yeast axtract, 0.1 g و یک میلی‌گرم از $ZnSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$, $FeSO_4.6H_2O$ با pH=۶/۸ و ۱٪ الیگواتیلن (که پس از استریل کردن محیط، به ارلن‌ها افزوده شده بود) تلقیح شد (Sivan et al., 2006). جهت مطالعه تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط جدایه قارچ (F1)، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری با جمعیت Spore.ml^{-1} 1×10^{6} به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت زیر (بر حسب گرم در لیتر آب مقطر): NH_4NO_3, 1.51 g., KH_2PO_4, 1.35 g., $MgSO_4.7H_2O$, 1.48 g., $MnSO_4.4H_2O$, 0.021 $ZnSO_4.7H_2O$, 0.007 g., $CuSO_4.5H_2O$, 0.006 g., $CoCl_2.6H_2O$, 0.006 g با pH=۵ حاوی ۱٪ الیگواتیلن تلقیح گردید. ارلن‌ها در دمای ۳۰°C بر روی شیکر با شدت ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از گرماگذاری، ارلن‌های مورد آزمایش برداشت و تغییرات pH محیط، میزان رشد جدایه باکتری (قرائت میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر) و میزان زیست‌توده جدایه قارچ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری زیست-توده خشک قارچی، ابتدا کاغذهای صافی (واتمن شماره یک) توزین، سپس محتویات ارلن‌های حاوی جدایه از کاغذهای صافی عبور و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. کاغذهای صافی به همراه میسلیوم‌های قارچی درون آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون با دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شدند. در نهایت از اختلاف وزن کاغذهای صافی حاوی زیست‌توده خشک قارچ و وزن اولیه کاغذ صافی، زیست‌توده خشک قارچی برحسب گرم برآورد شد (Lestan and Lamar, 1996 ;Boonchan et al., 2000). تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شد.

آنالیز الیگواتیلن باقیمانده

در انتهای دوره گرماگذاری، جهت حذف سلول‌های میکروبی از سانتریفیوژ کردن محیط‌های کشت با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و سپس برای تغلیظ متابولیت‌ها، نسبت‌های مساوی از محلول رویی با حلال آلی n هگزان مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه به خوبی توسط دستگاه ورتکس بهم زده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بخش آلی محیط جمع‌آوری و با استفاده از نمک سولفات سدیم بدون آب، آبگیری گردید و نهایتاً اجازه داده شد تا بخش حلال در دمای اتاق تبخیر شود سپس نمونه خشک شده در ۱ میلی لیتر n هگزان حل و توسط دستگاه اسپکتروسکوپی FTIR مدل WQF-510 با تفکیک‌پذیری ۴ و زمان ۲۰ دقیقه آنالیز شد (Elshafie et al., 2007; Husaini et al., 2008).

نتایج و بحث

جداسازی ریز موجودات توانمند و انتخاب جدایه‌های برتر:

در جداسازی اولیه در محیط جامد معدنی حاوی پارافین خطی بعنوان تنها منبع کربن، ۱۴۴ جدایه (شامل ۱۲۸ جدایه باکتری و ۱۶ جدایه قارچ) بر اساس توانایی رشد انتخاب و برای مراحل بعدی غربالگری خالص‌سازی شدند. در آزمون توانایی رشد جدایه‌های انتخابی در محیط جامد معدنی حاوی ۲٪ الیگواتیلن به عنوان تنها منبع کربن، تعداد ۵۳ جدایه بر مبنای رشد نسبی و قیاس با سایر جدایه‌ها و پلیت‌های شاهد انتخاب شدند. مایه‌زنی جدایه‌های مذکور در محیط معدنی مایع حاوی درصدهای مختلف الیگواتیلن به عنوان تنها منبع کربن با توجه به سنجش رشد جدایه‌های باکتری، زیست‌توده خشک جدایه‌های قارچ و اندازه‌گیری تغییرات pH محیط، نهایتا منجر به انتخاب یک جدایه باسیل گرم مثبت اسپوردار و یک جدایه قارچ به عنوان جدایه‌های برتر شد.

شناسایی جدایه‌های برتر

نتایج مشخصات میکروسکوپی و آزمایشات بیوشیمیایی جدایه باکتری (S7-10F)، به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. آزمایشات تعیین توالی 16S rDNA این جدایه نشان داد که ۹۹/۴۲۳٪ مشابه *Lysinibacillus xylanilyticus* YDB9 (T) بوده و تحت شماره JF838304 در بانک ژنی (GenBank) ثبت گردید.

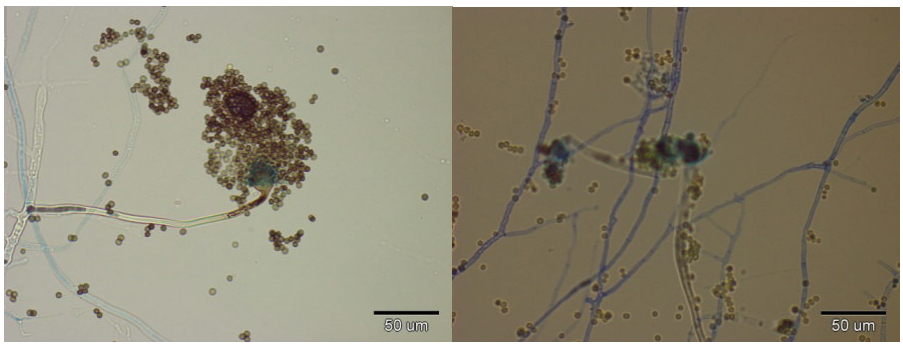
جدایه برتر قارچ (F1) نیز بر اساس خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی بعنوان *Aspergillus niger* شناسایی شد. تصاویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی این جدایه به ترتیب در اشکال (۱) و (۲) نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات مرفولوژیکی جدایه برتر باکتریایی

نام جدایه	مشخصات			
	رنگ‌آمیزی گرم	تشکیل اندوسپور	شکل اندوسپور	موقعیت اندوسپور
Lysinibacillus xylanilyticus YDB9 (T) strain S7-10F	+	+	کروی	انتهایی

جدول ۲- نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جدایه برتر باکتریایی

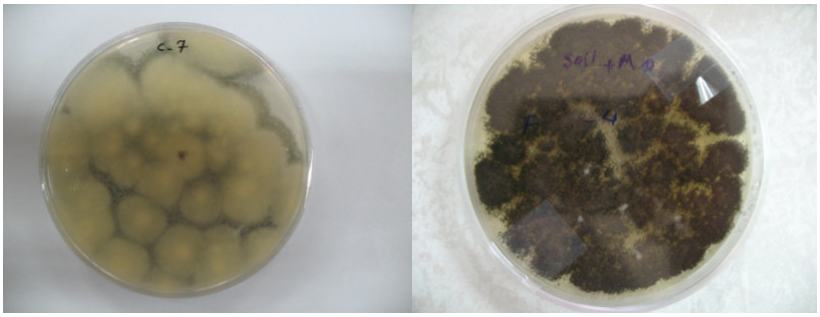
نام جدایه	لیستیناز	تخمیر مانیتول	سیتراتاز	آمیلاز	OF هوازی	OF بیهوازی	تیروزیناز	تست رشد در حضور نمک			تولید اسید از قند					اکسیداز	کاتالاز
								٪۲	٪۵	٪۷	٪۱۰	گلوکز	مالتوز	آرابینوز	زایلوز			
S7-10F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+		+	+



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی جدایه برتر قارچ (F1) (۵۰ میکرومتر ———)

Archive of SID

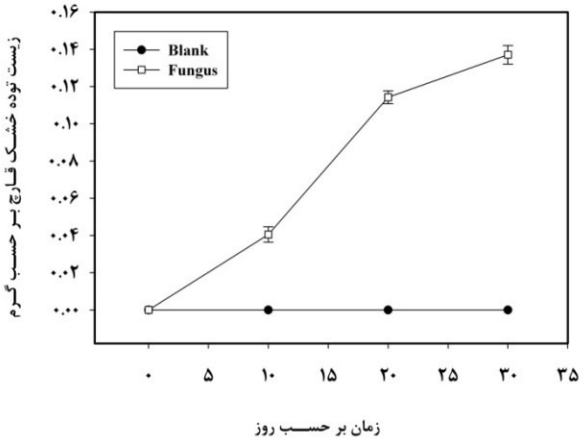
www.SID.ir



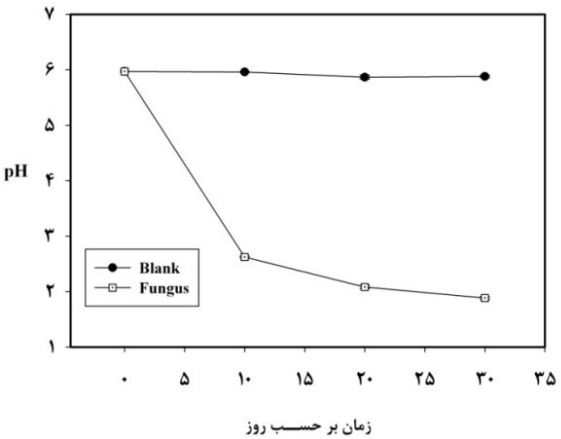
شکل ۲- تصاویری از جدایه (F1) در محیط MEA: پشت و روی پلیت به ترتیب در سمت راست و چپ تصویر

تغییرات pH، زیست توده قارچی و میزان رشد جدایه باکتری

همانطور که ذکر شد، طی زمان‌های مذکور، ارلن‌های مورد آزمایش برداشت شده و وزن زیست‌توده جدایه قارچ تعیین می‌شد. مطابق شکل(۳)، میزان زیست‌توده جدایه F1 با گذشت زمان افزایش یافته است که این افزایش، نشان دهنده مصرف الیگواتیلن توسط این جدایه بعنوان تنها منبع کربن است.



شکل ۳- تغییرات زیست‌توده خشک جدایه قارچ (F1) در حضور الیگواتیلن طی ۳۰ روز گرماگذاری



شکل ۴- تغییرات pH محیط توسط جدایه قارچ (F1) در حضور الیگواتیلن طی ۳۰ روز گرماگذاری

بر اساس مکانیسم تجزیه زیستی ترکیبات پلی‌اتیلن و الیگواتیلن، مصرف الیگواتیلن به عنوان منبع کربن توسط جدایه مذکور منجر به تشکیل گروه‌های کربونیل طی اکسیداسیون ترکیب و متعاقبا آزاد شدن ترکیبات اسیدی همچون کربوکسیلیک اسید و کاهش تدریجی pH محیط پس از گذشت ۳۰ روز شده است (Albertsson et al., 1987; Manzur et al., 2004). مقایسه شکل‌های (۳) و (۴) نشان می‌دهد که جدایه مذکور طی زمان گرماگذاری، بتدریج الیگواتیلن را به عنوان تنها منبع کربن خود مورد استفاده قرار داده و همزمان با اکسایش ترکیب، جهت رشد و افزایش زیست‌توده، منجر به کاهش pH محیط شده است.

اکثر قارچها می‌توانند از ترکیبات نفتی همچون نفت خام و n-آلکان‌ها بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و طی اکسیداسیون این ترکیبات، تولید CO_2 و زیست‌توده نمایند (Elshafie et al., 2007) که از میان قارچهای فیلامنتوس، جنس‌های *Aspergillus* و *Penicillium* از متداول‌ترین قارچهای گزارش شده اند (Chaillan et al., 2004).

گام اول در تجزیه هوازی هیدروکربن‌های نفتی توسط ریزموجودات، اکسایش ترکیب توسط اکسیژنازها و پروکسیدازهاست و مراحل بعدی تجزیه از طریق مسیرهای فرعی چون مسیر اسید سیتریک پیش می‌رود (Das and Chandran, 2011).

Husaini et al. (2008)، هجده جدایه قارچی بومی را از نمونه‌های خاک و آب آلوده به روغن موتور استفاده شده جداسازی کردند و جداسازی اولیه را توسط ارزیابی میزان رشد هر جدایه در محیط حداقل حاوی ۱٪ (حجمی/حجمی) روغن موتور انجام دادند. جنس *Penicillium* بطور معنی داری نسبت به سایر جدایه‌ها در تجزیه تقریبا تمامی n آلکان‌های موجود در روغن موتور ظاهر شد و بالاترین پتانسیل را در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک روغن موتور نشان داد.

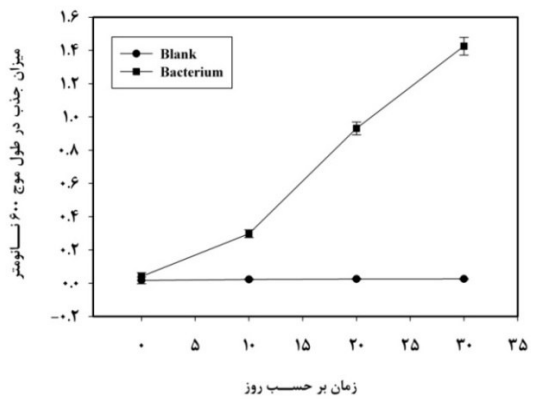
Elshafie et al. (2007) نیز ۱۰ جدایه قارچ را از سواحل عمان به منظور تجزیه n آلکان‌ها و نفت خام جداسازی کردند. در میان جدایه‌ها، *Aspergillus niger*، *Aspergillus terreus* و *Penicillium chrysogenum* نسبت به سایرین در تجزیه فعالتر

Archive of SID
www.SID.ir

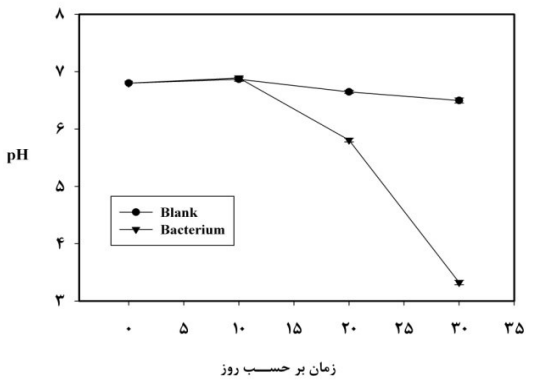
یافت شدند. *Aspergillus terreus* تفاوت معنی داری در مصرف کلیه هیدروکربن‌ها بجز C_{14} و C_{15} و *Aspergillus niger* روند مشابهی در مصرف کلیه هیدروکربن‌ها بجز C_{15} و C_{16} از خود نشان داد. *Penicillium chrysogenum* نیز بیشترین میزان زیست‌توده تولیدی را برای نفت خام و تمامی هیدروکربن‌ها در مقایسه با دو جدایه دیگر نشان داد.

در این مطالعه نیز، جدایه *Aspergillus niger* (F1) در مراحل غربالگری بالاترین نرخ رشد را در محیط حداقل حاوی ۰/۵٪ الیگواتیلن نسبت به سایر جدایه‌ها از خود نشان داد و بعنوان جدایه برتر انتخاب شد.

میزان رشد جدایه باکتری در محیط حاوی الیگواتیلن از طریق قرائت میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مطابق شکل (۵) میزان رشد این جدایه نیز همانند جدایه قارچ، با مصرف الیگواتیلن به عنوان تنها منبع کربن افزایش یافته است.



شکل ۵- تغییرات میزان رشد جدایه باکتری (S7-10F) در حضور الیگواتیلن طی ۳۰ روز گرماگذاری



شکل ۶- تغییرات pH محیط توسط جدایه باکتری (S7-10F) در حضور الیگواتیلن طی ۳۰ روز گرماگذاری

روند تغییرات pH محیط توسط جدایه باکتری نیز بصورت کاهشی بوده است. ما این کاهش در جدایه قارچ احتمالا بدلیل پتانسیل بالاتر استفاده از الیگواتیلن و توان اکسایشی بیشتر آنها به سبب آنزیم‌های ویژه اکسیدازی، بیشتر بوده است.

www.SID.ir

Mohanty and Mukherji (2008) در بررسی تجزیه زیستی روغن دیزل توسط دو باکتری *Burkholderia cepacia* و *Exiguobacterium aurantiacum* در محیط معدنی حاوی ۱٪ روغن دیزل با قرائت میزان چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر، به ترتیب افزایش ۳ و ۴ برابری کدورت محیط نسبت به غلظت اولیه ($۱/۵\times۱۰^{۶}CFU.ml^{-1}$) را برای دو باکتری طی ۱۵روز گرماگذاری مشاهده کردند.

میزان افزایش کدورت محیط در مطالعه حاضر نیز ۳/۲ برابر میزان اولیه ($۱/۵\times۱۰^{۸}CFU.ml^{-1}$) برای جدایه S7-10F بدست آمد.

Sood and Lal (2008)، باکتری تجزیه کننده پارافین واکس (*Geobacillus TERI NSM*) را از طریق روش غنی سازی از خاک‌های آلوده به نفت خام پارافینی جداسازی کردند. این جدایه می‌تواند ۶۰۰ میلی‌گرم پارافین واکس موجود در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط نمکی را به عنوان تنها منبع کربن در مدت ۷ روز در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد تجزیه کند. پارافین هیدروکربنی از گروه آلکان‌ها با وزن ملکولی بالاست. پارافین واکس معمولا به ترکیبی از آلکان‌های زنجیره کربنی با طول C_{16} (هگزادکان) یا C_{18} (اکتادکان) یا بالاتر اطلاق می‌شود. پارافین را می‌توان به صورت یک پلی‌اتیلن کوتاه زنجیره طبقه‌بندی نمود (Albertsson et al., 1987). پارافین معمولی متشکل از ۱۰-۲۰ اتم کربن است و واکس پارافین در برخی از مطالعات به عنوان الیگومر اتیلن مورد مطالعه قرار گرفته است (Hosoya et al., 1978).

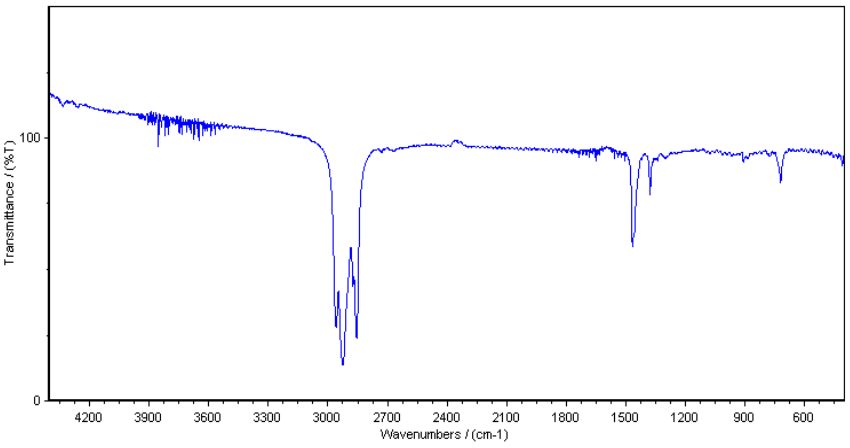
در این مطالعه جداسازی اولیه بر اساس مقایسه میزان رشد جدایه‌ها در محیط معدنی جامد حاوی پارافین به عنوان تنها منبع کربن صورت گرفت و در نهایت طی مراحل مختلف غربالگری، جدایه‌های *Lysinibacillus xylanilyticus* YDB9 (T) strain S7-10F و *Aspergillus niger* (F1) به عنوان جدایه‌های برتر جهت استفاده از الیگواتیلن بعنوان تنها منبع کربن و تجزیه آن انتخاب شدند.

تجزیه الیگواتیلن توسط جدایه‌های برتر

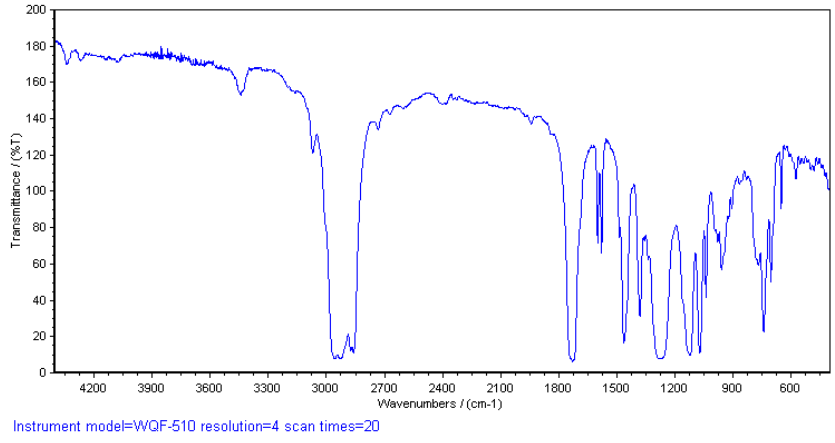
به منظور بررسی تجزیه الیگواتیلن، آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز بر روی نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروسکوپی FTIR مدل WQF-510 انجام شد. استفاده از دستگاه FTIR روشی سودمند برای شناسایی ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی آن‌ها می‌باشد. در روش یاد شده ارتعاش پیوندها که در اثر تغییر طول پیوند و یا زاویه پیوند در مولکول‌ها صورت می‌گیرد، بررسی می‌شود. تقریبا تمامی ترکیباتی که پیوند کوالانسی دارند، اعم از آلی یا معدنی، فرکانس‌های متفاوتی از اشعه الکترومغناطیس را در ناحیه مادون قرمز جذب می‌کنند. مشابه دیگر انواع جذب انرژی، هنگامی که مولکول‌ها اشعه مادون قرمز را جذب می‌کنند، به

Archive of SID

حالت انرژی بالاتر برانگیخته می‌شوند. جذب تابش مادون قرمز همانند دیگر فرایندهای جذب، فرایندی کوانتومی است. به این صورت که فقط فرکانس‌های خاصی از تابش مادون قرمز توسط مولکول جذب و باعث ارتعاش کششی و خمشی پیوندهای کوالانسی می‌شود. انرژی جذب شده از نور مادون قرمز توسط پیوندهای شیمیایی یا گروه‌های عاملی خاص در طول موج مشخص، منجر به کاهش شدت عبور نور شده و معمولاً به عنوان تابعی از عدد موجی رسم می‌شود. نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز الیگواتیلن تیمار شده با جدایه‌های مذکور در اشکال (۷) تا (۹) نشان داده شده است. جذب در ناحیه $1650\text{-}1860\ cm^{-1}$ بدلیل تنوعی از ترکیبات کربونیل شامل استرها، آلدهیدها و اسیدهای کربوکسیلیک است (Albertsson et al., 1987). این امر نشان دهنده انواع متفاوت ترکیبات اکسایشی تشکیل شده در طول فرآیند تجزیه زیستی است. جذب در ناحیه $1740\ cm^{-1}$ و ۱۷۱۵ به ترتیب مربوط به گروه‌های استرکربونیل (-COO-) و کتون کربونیل (-C=O-) است در حالی که جذب در ناحیه cm^{-1} ۱۶۴۰ و ۹۱۵-۹۰۵ به ترتیب مربوط به پیوند دوگانه میانی و انتهایی کربن به صورت (-C=C-) و ($-C=H_2C-$) می‌باشد (Albertsson et al., 1987). جذب در عدد موجی cm^{-1} ۱۴۶۵ مربوط به گروه متیلن ($-CH_2-$)، در ناحیه $2915\text{-}2940\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند کششی نا متقارن C-H در CH_2 و در ناحیه cm^{-1} ۲۸۴۷ مربوط به پیوند کششی متقارن C-H در CH_2 می‌باشد. همچنین جذب در عدد موجی $718\text{-}722\ cm^{-1}$ و نیز در ناحیه $2151\ cm^{-1}$ به نوسان CH_2 (CH_2 roching) بر می‌گردد (Corti et al., 2010). همانطور که در اشکال ۸ و ۹ مشاهده می‌شود، ایجاد جذب در محدوده $1000\text{-}1700\ cm^{-1}$ در طیف مادون قرمز الیگواتیلن تیمار شده با هر یک از ۲ جدایه مشاهده می‌شود که بدلیل ایجاد ترکیبات اکسید شده مانند نیمه‌ها و قسمت‌های مساوی حاوی گروه OH ناشی از تجزیه زیستی می‌باشد (Corti et al., 2010). جذب ایجاد شده در ناحیه cm^{-1} ۱۱۷۳ نیز به گروه‌های کربونیل اطلاق می‌شود (Manzure et al., 2004). جذب کوچک ایجاد شده در الیگواتیلن تیمار شده با جدایه‌ها در عدد موجی $3400\ cm^{-1}$ نیز مربوط به گروه‌های هیدروکسی تولید شده طی اکسایش ترکیب می‌باشد. مطابق اشکال مذکور، هر دو جدایه قارچ و باکتری پتانسیل نسبتا یکسانی در تجزیه الیگواتیلن داشته اند.

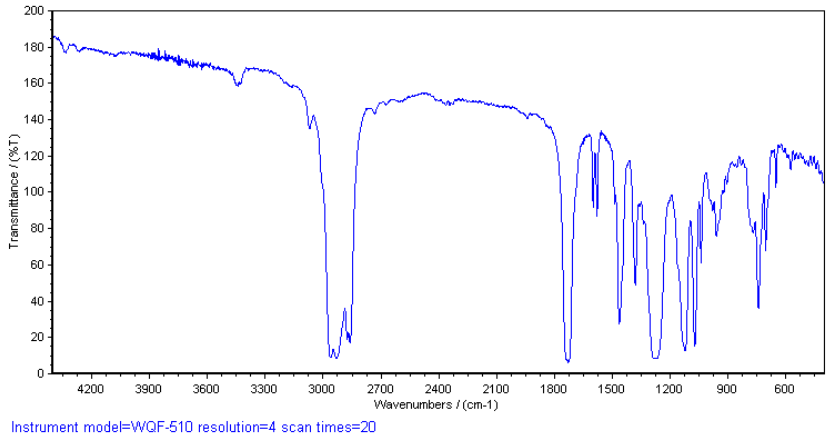


شکل ۷- طیف مادون قرمز نمونه شاهد حاوی الیگواتیلن پس از ۳۰ روز گرماگذاری در محیط معدنی مایع



شکل ۸- طیف مادون قرمز الیگواتیلن تیمار شده با جدایه قارچ (F1) پس از ۳۰ روز گرماگذاری در محیط معدنی مایع

www.SID.ir



شکل ۹- طیف مادون قرمز الیگواتیلن تیمار شده با جدایه باکتری (S7-10F) پس از ۳۰ روز گرماگذاری در محیط معدنی مایع

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تجزیه زیستی الیگواتیلن به عنوان الیگومر پلی-اتیلن توسط ***Aspergillus niger*** و ***Lysinibacillus xylanilyticus*** YDB9 (T) جدایه S7-10F که طی روش غنی-سازی و مراحل مختلف غربالگری از خاک‌های مکان‌های دفن زباله جداسازی شدند در محیط معدنی حاوی الیگواتیلن بعنوان تنها منبع کربن به مدت ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. طی زمان گرماگذاری، میزان زیست‌توده جدایه قارچ و رشد جدایه باکتری افزایش و pH محیط کاهش یافت که نشان دهنده اکسایش الیگواتیلن و مصرف آن توسط جدایه‌ها بعنوان تنها منبع کربن بود. نتایج آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز نیز تغییرات ساختاری و ایجاد ترکیبات اکسیدی همچون گروه‌های کربونیلی حاوی گروه عاملی OH را طی فرآیند اکسیداسیون ترکیب به اثبات رسانید. این یافته‌ها با مکانیسم تجزیه زیستی الیگواتیلن همخوانی دارد. بر اساس آن، اکسایش ترکیب و تشکیل گروه‌های کربونیل نخستین مرحله تجزیه است. سپس با پیشرفت فعالیت زیستی و مصرف گروه‌های کربونیل توسط ریزموجودات، ترکیبات اسیدی بویژه کربوکسیلیلک اسید تشکیل می‌شود. اسید حاصله تحت β اکسیداسیون قرار گرفته و از طریق چرخه اسید سیتریک نهایتا به آب و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌گردد. این چرخه‌ها نیز توسط ریزموجودات متابولیزه می‌شوند. بنابراین با توجه به جداسازی ریزموجودات مورد استفاده در این پژوهش از مکان‌های دفن زباله و استفاده از صفحات پلی‌اتیلن در مراحل غنی‌سازی، الیگواتیلن در مراحل غربالگری و اثبات توانایی این ریزموجودات در تجزیه زیستی الیگواتیلن، می‌توان پتانسیل آن‌ها را در فرآیند تجزیه زیستی پلی‌اتیلن مورد بررسی قرار داد و به کاهش حجم بالای این ضایعات در محیط زیست کمک نمود.

REFERENCES

Albertsson, A. C., Andersson, S. O. and Karlsson, S. (1987). The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 18, 73-87.

Arutehelvi, J., Sudhakar, M., Arkathar, A., Doble, M., Bhaduri, S. and Veera Uppara, P. (2008). Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 9-22.

Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal–bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology,* 66, 1007–1019.

Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155, 587–595.

Corti, A., Muniyasami, S., Vitali, M., Imam, S. H. and Chiellini, E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects ofsunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 1106-1114.

Das, N. and Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International,* 2011, 941810.

Elshafie, A., AlKindi, A. Y. Al-Busaidi, S., Bakheit, C. and Albahry, S. N. (2007). Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 1692–1696.

Gilan, I., Hadar, Y. and Sivan, A. (2004). Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus rubber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 97-104.

Hadad, D., Geresh, S. and Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1093-1100.

Hosoyan, H., Miyazakyi, O., Sugisak, U., Takanashi,

Archive of SID
www.SID.ir

I., Tsurufujim, M., Yamasaki, A. and Tamura, G. (1978). Bacterial degradation of synthetic polymers and oligomers with the special references to the case of polyethylene glycol. *Agricultural and biological chemistry*, 42 (8), 1545-1552.

Husaini, A., Roslan, H. A., Hii, K. S. Y. and Ang, C. H. (2008). Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2789–2797.

Kathiresan, K. (2003). Polythene and plastic-degrading microbes from the mangrove soil. *Revista de Biologia Tropical*, 51 (3), 629-634.

Lestan, D. and Lamar, R. T. (1996). Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2045–2052.

Mancera-Lopez, M. E., Esparza-Garcı, F., Chavez-Gomez, B., Rodrıguez-Vazquez, R., Saucedo-Castanedac, G. and Barrera-Cortes, J. (2008.). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 151–160.

Manzur, A., Limon-Gonzalez, M. and Favela-Torres, E. (2004). Biodegradation of physiochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 265-271.

Mohanty, G. and Mukherji, S. (2008). Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(3), 240-250.

Parry, M., Tarnball, P.C. and Gibson, J.R. (1988). *A color atlas of Bacillus species*, Wolf Medical Publication. Ltd, London.

Sivan, A., Szanto, M. and Pavlov, V. (2006). Biofilm development of the polyethylene degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 346-352.

Sood, N. and Lal, B. (2008). Isolation and characterization of a potential paraffin-wax degrading thermophilic bacterial strain *Geobacillus kaustophilus* TERI NSM for application in oil wells with paraffin deposition problems. *Chemosphere*, 70, 1445–1451.

Volke-Sepulveda, T., Gutierrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*, 97, 1583–1591.

Watanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*. (2th ed). CRC PRESS.

Widdel, F. and Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 259–276.

Archive of SID

www.SID.ir