تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۴۹، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۷ (ص ۱۱۸۸-۱۱۸۱) DOI: 10.22059/ijswr.2018.249878.667829

Isolation and identification of poly Vinyl Alcohol (PVA) bacteria from Municipal Solid Waste Compost

SHOBOO SALEHPOUR[1], MEHDI JONOOBI[2*], MAJID KHANALI[3]

1. Former Graduated Student, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Jan. 9, 2018- Revised: Jan. 27, 2018- Accepted: Feb. 14, 2018)

ABSTRACT

Environmental pollutions caused by petroleum polymers and the limitation of petroleum resources have led to the development of bio based polymers and progress in reducing dependence on fossil fuels. In recent years poly(vinyl alcohol) (PVA) has received much attention in paper coatings, films, packaging materials and biomedical fields because of water-solubility, nontoxicity, excellent chemical resistance, proper barrier and biodegradability properties. In spite of its growing use, information on its destruction, especially the role of Bactria in this process is relatively low. The aim of this study is isolation and identification of PVA degrading bacterium from the municipal solid wastes composted. Compost samples were collected from solid municipal wastes in Karaj Compost plant during the process of compost production. Poly (vinyl alcohol) films were prepared by using liquid nitrogen, freeze drying and hot press techniques. The specimens were buried in municipal solid waste for 150 days. Then, the number of bacteria was counted on the culture medium. Isolation of the bacterium was done by culturing the bacteria on poly (vinyl alcohol) films. New poly (vinyl alcohol) degrading bacteria were isolated from municipal solid waste composted by using enrichments on poly (vinyl alcohol) films. Then isolated bacterium was identified by PCR with 16S rDNA method. In this study, the maximum number of bacteria was 280±0.1 at a medium with poly (vinyl alcohol) films, and the minimum number of bacteria was 110±0.3 at control medium. Following molecular identification and sequencing of 16S rDNA gene, the BLAST showed high similarity sequence of the sample with *Pseudomonas geniculate.* This paper is the first report on polyvinyl alcohol degradation by *Pseudomonas geniculate*.

Keywords: Poly (vinyl alcohol), 16SrDNA ،PCR, *Pseudomonas gen*iculate

Archive of SID

*Corresponding author: mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

www.SID.ir

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری

شوبو صالح‌پور[۱]، مهدی جنوبی[۲*]، مجید خانعلی[۳]

۱. دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار، گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ ارسال: ۱۹/ ۱۰/ ۱۳۹۶- تاریخ بازنگری: ۷/ ۱۱/ ۱۳۹۶- تاریخ تصویب: ۲۵/ ۱۱/ ۱۳۹۶)

چکیده

آلودگی زیست محیطی ناشی از پلیمرهای نفتی و محدودیت منابع نفتی باعث توسعه پلیمرهای زیست‌پایه و حرکت به‌سوی کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی شده است. در سال‌های اخیر پلی‌وینیل الکل (PVA) به دلیل حلالیت در آب، غیر سمی بودن، مقاومت شیمیایی عالی، خواص بازدارندگی مناسب و زیست تخریب‌پذیری توجه زیادی را به خود جلب کرده است. علیرغم استفاده روزافزون آن، اطلاعات در مورد تخریب آن به‌ویژه نقش باکتری‌ها در این فرآیند، نسبتاً کم است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری است. نمونه‌برداری در طی فرآیند تولید کمپوست از زباله‌های جامد شهری در کارخانه کمپوست کرج انجام شد. فیلم‌های پلی‌وینیل الکل با استفاده از نیتروژن مایع، خشک‌کردن انجمادی و پرس داغ تهیه شدند. فیلم‌های پلی‌وینیل الکل به مدت ۱۵۰ روز در داخل کمپوست زباله‌های جامد شهری دفن شدند. سپس تعداد باکتری‌ها در محیط کشت شمارش گردید. یک سویه باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس با انجام PCR با روش 16S rDNA باکتری مورد نظر شناسایی شد. در این مطالعه، بیشترین تعداد باکتری در محیط کشت حاوی کمپوست و فیلم‌های پلی‌وینیل الکل ۰/۱±۲۸۰ و کمترین تعداد باکتری ۰/۳±۱۱۰ در محیط کشت کنترل به‌دست آمد. بعد از شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن 16S rDNA، بلاست توالی شباهت بالای نمونه با *Pseudomonas geniculate* را نشان داد. مطالعه حاضر، اولین گزارش تخریب پلی‌وینیل الکل توسط *Pseudomonas geniculate* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، تخریب پلی‌وینیل الکل، 16S rDNA، PCR، *Pseudomonas geniculate*

مقدمه

بر اساس برآوردهای صورت گرفته همه‌ساله نزدیک به ۱۴۰ میلیون تن پلاستیک‌های سنتزی از مشتقات نفتی در دنیا تولید می‌شوند که بخش مهمی از این مواد را بسته‌بندی‌های یک‌بار مصرف مورد استفاده در صنعت غذا تشکیل می‌دهند (Shah *et al.*, 2008; Phua *et al*, 2011). یکی از بزرگترین مشکلات این مواد، عدم زیست‌تخریب‌پذیری آنها و در نتیجه آلودگی محیط زیست می‌باشد. تأثیرات مخرب محیطی ناشی از تجمع مواد پلاستیکی و غیر تخریب‌پذیر یکی از مهمترین نگرانی‌ها در جهان امروز است (Hopewell *et al.*, 2009). یکی از راه‌کارهای مهم برای حل مشکل تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت، استفاده از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر است (Shah *et al.*, 2008). از آنجا که زیست پلیمرها از منابع تجدیدپذیر به‌دست آمده و زیست تخریب‌پذیرند، بنابراین استفاده از آنها در مقایسه با پلیمرهای بر پایه ترکیبات نفتی دارای حداقل آثار منفی زیست محیطی است (Silverio *et al.*, 2013; Marvast, *et al.*, 2013). پلی‌وینیل الکل یکی از پلیمرهای سازگار با طبیعت و محلول در آب بوده که دارای خواص بسیار عالی و امولسیون کننده در محیط هست (Silvério *et al.*, 2013). این پلیمر توانایی تشکیل فیلم‌های شفاف، زیست تخریب‌پذیر، انعطاف‌پذیر با پایداری حرارتی و مقاومت شیمیایی مطلوب دارد و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان لیف، فیلم، در صنعت کاغذ و صنعت پارچه‌سازی، همچنین به‌عنوان بهبوددهنده رزین ترموست و در ساخت چند لایه‌ها به کار می‌رود (Silvério *et al.*, 2013). پلی‌وینیل الکل، جزء معدود پلیمر وینیلی محلول در آب است که استعداد تخریب زیستی کامل در حضور میکروارگانیسم‌های را دارد (Campos *et al.*, 2011). درجه پلیمریزاسیون (DP) و درجه هیدرولیز (DS) عوامل مؤثر بر تجزیه بیولوژیکی پلی‌وینیل

* نویسنده مسئول: mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

الکل هستند (Campos *et al*., 2011). مکانیسم تخریب پلی-وینیل الکل شامل دو مرحله است: مرحله اول گسست پیوند کربن-کربن پلیمر پلی‌وینیل الکل توسط آنزیم‌های خارج سلولی است و مرحله دوم جذب سلولی قطعات پلی‌وینیل الکل با وزن مولکولی پایین‌تر که در داخل سلول رخ می‌دهد، است (Corti *et al*., 2002). اولین تخریب پلی‌وینیل الکل توسط قارچ *Fusarium lini* B گزارش شده است (Fusako and Hu, 2009). تخریب زیستی پلی‌وینیل الکل در شرایط مختلف مانند خاک (Chiellini *et al*., 2003)، کمپوست (Liu *et al*., 2009)، لجن (Porter and Snider, 1976; Chiellini *et al*., 2003) و زباله‌های جامد شهری (Salehpour *et al*., 2018) مورد بررسی قرار گرفته است. در چند سال گذشته، طیف وسیعی از میکروارگانسیم‌ها که می‌توانند پلی‌وینیل الکل را تجزیه کنند، شناسایی شده‌اند (Sakazawa *et al*., 1981; Corti *et al*., 2002; Du *et al*., 2007; Chen *et al*., 2007; Leja and Lewandowicz, 2010). بیشتر این گونه‌ها جدا شده باکتری-هایی، مانند *Pseudomonas sp* (Watanabe *et al*., 1976; Hatanaka *et al*., 1995; Mori *et al*., 1997; Semenov *et al*., 2003؛ Lodha, 2004) *Alcaligenes faecalis* (Matsumara *et al*., 1994; Corti *et al*., 2002), *Bacillus megaterium* (Mori *et al*., 1996; Corti *et al*., 2002), *Penicillium sp*, *Flammulina velatupes* (Chiellini *et al*. 1999; Tsujiyama *et al*., 2011), *Vibrio alginolyticus* and *Vib-rio parahemolyticus* (Raghul *et al*., 2014), *Stenotrophomonas sp* (Ullah *et al*., 2017) هستند. فقط تعداد محدودی از این باکتری‌ها می‌توانند پلی‌وینیل الکل را درمحیط کشت خالص تخریب کنند (Corti *et al*., 2002; Chen *et al*., 2007). یکی از باکترهای مهم در زمینه تخریب‌زیست پلی‌وینیل الکل‌گونه *Pseudomonas* است که تاکنون گـزارش-هـای متعددی درباره تجزیه پلی‌وینیل الکل توسط این باکتری در شـرایط مختلف ارائه شده است (Suzuki *et al*., 1973; Sakazawa *et al*., 1981; Shimao *et al*., 1982; Hatanaka *et al*., 1995; Premraj and Doble, 2005; Leja and Lewandowicz, 2010). اولین گزارش از تجزیه کامل پلی-وینیل الکل توسط باکتری *Pseudomonas* O-3 در سال ۱۹۸۱ ارائه شد که از پلی‌وینیل الکل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند (Sakazawa *et al*., 1981). تخریب زیستی پلی-وینیل الکل معمولاً به آسانی رخ نمی‌دهد در بسیاری از موارد، تجزیه پلی‌وینیل الکل نیاز به همکاری دو گونه دارد، همانطور که توسط چندین گروه تحقیقاتی اثبات شده است، ظرفیت بسیاری از گونه‌های تخریب کننده پلی‌وینیل الکل برای استفاده از پلی‌وینیل الکل اغلب متکی بر همکاری با باکتری‌های دیگر است، به عنوان مثال *Pseudomonas* sp. VM15C و *seudomonas* sp VM15A (Shimao *et al*., 1986)، *Bacillus megaterium* (Kim and Rhee, 2003) PN19 و *Sphingomonas* sp SA3 و SA2 (Chandra and Rustgi, 1998).

Sakazawa *et al*. (1981) ۳۰ گونه باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل را از نمونه‌های لجن و خاک و زباله کارخانه‌ها جداسازی نمودند. همچنین Chandra and Rustgi (1998) تخریب میکروبی پلی‌وینیل الکل با استفاده از پراکسیدازهای ثانویه که از یک گونه سودوموناس جدا شده بود مورد بررسی قرار دادند. همچنین Jecu *et al* (2012) تخریب پوسیدگی قارچی را روی فیلم‌های پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌هیدروکسی بوتیرات را با قارچ *Aspergillus niger* مورد مطالعه قرار دادند. Mollasalehi (۲۰۱۳) طی پژوهشی به جداسازی و شناسایی قارچ‌های تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل در کمپوست و خاک پرداخت. در این بررسی گزارش شد، قارچ‌های تجزیه‌کننده پلی-وینیل الکل در خاک *Galactomyces geotrichum*, *Trichosporon laibachii*, *Fimetariella rabenhorsti*, *Fusarium oxysporum* بودند. همچنین قارچ تجزیه‌کننده پلی-وینیل الکل در کمپوست *Galactomyce geotrichum* بود. گزارش‌های زیادی در مورد جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از خاک آلوده، رسوبات، لجن ارائه شده است، اما تاکنون گزارشی در مورد جداسازی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل از محیط کمپوست زباله-های جامد شهری منتشر نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، محیط کشت آگار (TSB)[1]، نوترینت آگار و پلی‌وینیل الکل (PVA) با وزن مولکولی 14500 g.mol^{-1} به عنوان ماده زمینه پلیمری از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

تولید فیلم‌های پلی‌وینیل الکل

ابتدا ۱۰ گرم پلی‌وینیل الکل به ۱۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شده و با استفاده از یک همزن مغناطیسی با سرعت ۱۲۰۰rpm در دمای ۵۰ °C به مدت ۲ ساعت فرآیند حل شدن انجام گردید. سپس، مخلوط حاصل در داخل پتری دیش‌های پلاستیکی ریخته شد و با استفاده از نیتروژن مایع (۱۹۶- °C) منجمد شدند. بلافاصله نمونه‌ها در یک فریزر با دمای ۸۰- °C

1.Tryptic Soy Broth

Archive of SID

www.SID.ir

به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با استفاده از یک خشک‌کن انجمادی مدل lyotrap با دمای ۴۷- °C و مقدار خلاء ۰/۱ میلی‌متر جیوه به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. بعد از خشک شدن، نمونه‌ها به مدت دو دقیقه با دمای ۱۵۰ °C پیش پرس شدند و شکل‌گیری فیلم‌های پلی‌وینیل الکل توسط پرس داغ با دمای ۱۵۰ °C و فشار ۱۵۰ kPa به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. در نهایت با استفاده از پرس سرد با فشار ۱۰۰ kPa و دمای ۲۰ °C به مدت یک دقیقه خنک شدند (Salehpour *et al.*, 2018).

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل

جهت جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل، نمونه برداری از فرایند تولید کمپوست (زباله جامد شهری) در کارخانه تولید کمپوست کرج صورت گرفت. برای نمونه‌برداری ابتدا طول توده سطحی به‌صورت مقاطع عرضی در نواحی مشخص تا عمق توده برش داده شده و از هر مکان سه ناحیه در فواصل یک‌سوم سطح، وسط و یک‌سوم از کف انتخاب شد. پس از عملیات نمونه‌برداری، نمونه‌ها به آزمایشگاه حفاظت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی تهران منتقل شد. نمونه‌ها در یک سطل پلاستیکی تمیز با هم مخلوط شدند تا نمونه کاملاً همگن به‌دست آید. نمونه‌های فیلم پلی‌وینیل الکل مطابق با استاندارد در ابعاد ۰/۳ × ۳ × ۵ میلی‌متر (ضخامت × عرض × طول) تهیه شدند و در داخل شیشه‌های پیرکس حاوی ۱۵۰ گرم کمپوست دفن شدند. شیشه‌های حاوی کمپوست و فیلم پلی‌وینیل الکل و نمونه شاهد (کمپوست بدون فیلم) در دمای ۵۰ °C در انکوباتور به مدت ۱۵۰ روز (از ۱۵ دی تا ۱۵ خرداد) نگهداری شدند (Gomez *et al.*, 2013). بررسی میکروبی بعد از تخریب زیستی نمونه‌های فیلم در زباله‌های جامد شهری انجام گردید.

خواص شیمیایی کمپوست

قبل و بعد از آزمون زیست تخریب‌پذیری، خصوصیات شیمیایی کمپوست (درصد کربن، نیتروژن و میزان شوری) تعیین گردید. ابتدا ۳۰ گرم کمپوست در آون با دمای ۱۰۳ °C به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس نمونه خشک شده را از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. جهت تعیین میزان شوری (EC)، دوغ آب ۱ به ۱۰ از نمونه کمپوست تهیه شده و سپس با استفاده از دستگاه هدایت سنج (EC215, HANNA instruments) بررسی شد. همچنین جهت تعیین نسبت کربن به نیتروژن ابتدا مقدار نیتروژن از روش نیتروژن کل (روش کجلدال) اندازه‌گیری شد (Fourti *et al.*, 2008). برای تعیین مقدار کربن، ۱۰ گرم نمونه کمپوست به مدت چهار ساعت در داخل کوره با دمای ۶۰۰ °C قرار گرفتند در انتها خاکستر باقی‌مانده توزین شد. سپس از طریق معادله ۱، درصد کربن محاسبه شد(Phillip, 2010).

درصد کربن (٪) = (خاکستر-۱)/۱/۸ (رابطه ۱)

شمارش جمعیت باکتری‌ها

پس از تخریب زیستی فیلم‌ها، شمارش باکتری‌ها با استفاده از روش تهیه سری رقت صورت گرفت (*Schadd et al., 2001*). در این روش، ابتدا دو گرم از نمونه‌های زباله‌های جامد شهری حاوی نمونه‌های فیلم پلی‌وینیل الکل تخریب شده و نمونه شاهد (بدون فیلم) به ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل شده اضافه شد. سپس مخلوط به‌دست آمده طی چند مرحله به شدت با دستگاه شیکر تکان داده شد. در پایان دو دقیقه اجازه داده شد تا عمل ته‌نشینی انجام شود. به این ترتیب اولین رقت 10^{-1} تهیه گردید. سایر رقت‌ها (10^{-2} تا 10^{-9}) با استفاده از بافر فسفات استریل تهیه شدند. سپس از لوله‌های حاوی رقت‌های 10^{-7}، 10^{-8} و 10^{-9} تهیه شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت غنی‌سازی جامد شده به‌وسیله آگار اضافه گردید و با پیپت پاستور به طور کامل پخش شد. سپس پلیت‌های کشت داده و در دمای ۳۰ °C در انکوباتور به مدت دو روز نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت کلونی‌های رشد کرد (cfu/g) در هر پلیت شمارش شدند.

خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل

برای شناسایی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-9} (حاوی انواع باکتری‌ها) روی پلیت که حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل (به عنوان تنها منبع کربن و انرژی) ریخته شد با پیپت پاستور به‌طور کامل پخش شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۳ °C انکوبه شدند. سپس از کلونی‌های رشد یافته روی سطح فیلم‌ها بر روی پلیت‌های جدید شامل محیط نوترنیت آگار بودند کشت داده شدند. به منظور تعیین باکتری‌های رشدیافته در قسمت‌های داخلی فیلم‌ها، سطح فیلم‌ها کاملاً استریل شدند و به داخل پلیت‌های استریل منتقل شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۳ °C انکوبه شدند. سپس از کلونی‌های رشدیافته روی فیلم‌ها بر روی محیط نوترنیت آگار کشت داده شدند. در نهایت بعد از رشد کلونی‌های خالص‌سازی‌شده، کشت نهایی به‌منظور دست‌یابی به تک کلونی جدایه‌های باکتری‌ها در همین محیط انجام گرفت.

شناسایی مولکولی باکتری

شناسایی باکتری به روش مولکولی، استخراج DNA به روش عمومی صورت گرفت. ابتدا باکتری کشت‌شده روی محیط نوترنیت آگار به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع‌آوری به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده منتقل شدند. لوله‌ها پس از یخ زدن در ازت مایع، در حمام آب

Archive of SID

www.SID.ir

با دمای C° ۶۵ قرار داده شدند. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به لوله‌ها، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی حذف و محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (نسبت ۱:۲۴) اضافه گردید به مدت ۱۰ دقیقه و دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. به منظور رسوب دادن DNA، محتوی لوله‌ها به مدت دو ساعت در C° ۲۰- قرار داده شد و پس از سانتریفیوژ در rpm ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه با اتانل ۷۰ درصد شسته شده و مجدداً به همان ترتیب سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب حاصل خشک و در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. شناسایی با استفاده از روش 16S rDNA انجام شد. واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای:

PAF (5‘-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3
' PAR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3

انجام شد (Zakaria *et al*., 2010). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر طبق مراحل زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه در دمای C° ۹۴ برای سه دقیقه، یک سیکل شامل واسرشت سازی در دمای C° ۹۴ برای ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای C° ۵۶ برای ۴۰ ثانیه، توسعه در دمای C° ۷۲ برای یک دقیقه و یک مرحله توسعه نهایی[1] برای ۱۰دقیقه. پس از انجام PCR، DNAتکثیریافته باکتری‌ها روی ژل آگاروز قرار داده شد. پس از گرفتن باند مناسب، نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی فرستاده شد. توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Blast در بانک ژن با دیگر توالی‌های موجود در این پایگاه اطلاعاتی مقایسه شدند. درختچه فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 به روش neighbour joining ترسیم شدند. بر اساس حداقل خطا از درخت توپولوژی Boot strap ۱۰۰ تکرار بود (Tamura *et al*., 2007).

1. Final Extention

روش آماری

نتایج، با آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد و تیمارها با آزمون میانگین با روش دانکن در سطح اعتماد ۹۹٪ مقایسه شدند. برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS 11.5 استفاده شد.

نتایج و بحث

خواص شیمیایی کمپوست

نتایج خواص شیمیایی کمپوست (شاهد) و کمپوست حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل قبل و بعد از تخریب زیستی در جدول (۱) ارائه شده است. همانطور که از جدول (۱) مشاهده می‌شود، نسبت C//N کمپوست قبل از تخریب زیستی ۳۰ بود. در حالیکه بعد از تخریب زیستی نسبت C//N کاهش یافت. میزان شوری کمپوست (شاهد) بعد از ۱۵۰ روز µS/cm ۰/۱۸ بود. در حالیکه در نمونه‌های کمپوست حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل خالص و نانو چندسازه‌ای میزان شوری کاهش یافت.

جدول ۱. خواص شیمیایی کمپوست (شاهد) و کمپوست حاوی فیلم‌های پلی وینیل الکل قبل و بعد از تخریب زیستی

نمونه	قبل از تخریب			بعد از تخریب		
	Ec	C/N	محتوای کربن ($mg\ g^{-1}$)	Ec	C/N	محتوای کربن ($mg\ g^{-1}$)
کمپوست (شاهد)	۰/۲۲±۰/۱	۳۰±۰/۱	۲۶±۰/۲	۰/۱۸±۰/۱	۱۹±۰/۲	۲۵±۰/۱
کمپوست+PVA	۰/۲۲±۰/۱	۳۰±۰/۱	۲۶±۰/۲	۰/۱۶±۰/۲	۲۲±۰/۱	۲۹±۰/۱

شمارش جمعیت باکتری‌ها

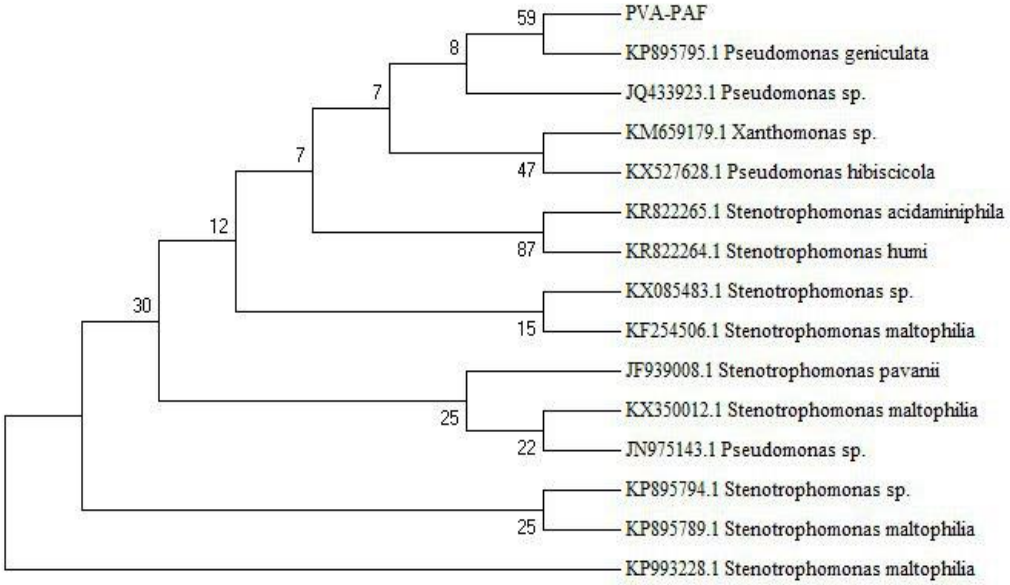
میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل در رقت‌های (10^{-8} و 10^{-9}) به ترتیب ۲۰۵ و ۱۱۰ (cfu/g) بود. با افزودن فیلم‌های پلی‌وینیل الکل تعداد باکتری‌ها افزایش یافت. میانگین تعداد باکتری‌ها در کمپوست حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل در رقت‌های (10^{-8} و 10^{-9}) ۲۸۰ و ۱۹۰ (cfu/g) بود (جدول ۱). در مقایسه رقت‌ها ازنظر میانگین تعداد باکتری‌ها، بیشترین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی کمپوست و فیلم‌های پلی‌وینیل الکل در رقت 10^{-7} و کمترین تعداد باکتری‌های در محیط کشت کنترل در رقت 10^{-9} مشاهده شد. این افزایش در تعداد باکتری‌ها را می‌توان به کاهش شوری و افزایش مواد آلی در کمپوست حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل اشاره کرد. از عوامل مؤثر بر جمعیت باکتری‌ها، شوری کمپوست است (Teimouri *et al*., 2005). هر چه میزان شوری کمپوست کمتر باشد باکتری‌های بیشتری قادر به ساکن شدن در آن خواهند بود. عامل دیگری که می‌تواند محدودکننده تعداد کل باکتری‌ها باشد میزان مواد آلی کمپوست است. زیرا باکتری تجزیه‌کننده از نوع هتروتروف بوده و برای رشد به مواد آلی به عنوان منبع کربن نیاز دارند (Teimouri *et al*., 2005). وجود میزان بالاتری از کربن در کمپوست حاوی فیلم‌های پلی‌وینیل الکل نشان دهنده فروانی بیشتر باکتری‌ها در این محیط است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. میانگین تعداد باکتری‌های موجود در محیط کشت حاوی کمپوست کنترل (شاهد) و محیط کشت حاوی کمپوست و فیلم‌های پلی‌وینیل الکل در رقت‌های 10^{-9}، 10^{-8} و 10^{-7}

نمونه	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-7} (cfu/g)	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-8} (cfu/g)	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-8} (cfu/g)
کمپوست	غیرقابل شمارش	۲۸۰±۰/۱[a]	۲۰۵±۰/۲[a]
کمپوست+PVA	غیرقابل شمارش	۱۹۰±۰/۲[b]	۱۱۰±۰/۳[b]

*حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی وجود اختلاف در سطح اعتماد ۹۹٪ است



شکل ۱. درخت فیلوژنی رابطه بین توالی 16S rDNA به دست آمده در این مطالعه و توالی به دست آمده از بانک جهانی ژن را نشان میدهد. درخت با استفاده از نرم افزار MEGA 5 ترسیم شده است

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل

شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل با تکثیر قسمتی از ناحیه 16S rDNA با پرایمرهای ویژه این ژن انجام شد. سپس محصول حاصل از ژل استخراج، خالص‌سازی و جهت تعیین توالی فرستاده شد. توالی حاصل‌شده در بانک جهانی ژنی ثبت شد. Accession umber اختصاص داده‌شده به توالی ثبت شده KP895795.۱ است. بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR و اطلاعات به‌دست آمده از بانک جهانی ژن درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم شد (شکل ۱). بر اساس نتایج به دست آمده از ترسیم درختچه فیلوژنتیکی، باکتری شناسایی شده به جنس *Pseudomonas geniculate* تعلق داشت. توالی به‌دست آمده در این تحقیق درپایگاه اطلاعاتی داده NCBI ثبت شد. شماره دستیابی به این جدایه در بانک ژنی NCBI به صورت جدایه sh212 با شماره MF578929 می‌باشد. گزارشات مختلفی نشان داده است که انواع مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه پلی‌وینیل الکل هستند (Leja and Lewandowicz, 2010). از این میان باکتری‌های *Pseudomonas sp* (Watanabe *et al*., 1976; Hatanaka *et al*., 1995; Mori *et al*., 1997; Semenov *et al*., 2003; Lodha, 2004)، *Alcaligenes faecalis* (Matsumara *et al*., 1994; Corti *et al*., 2002)، *Bacillus megaterium* (Mori) *Penicillium sp*, (Watanabe *et al*., 1976)، *Flammulina velatupes* (Chiellini *et al*. 1999; Tsujiyama) *Flavobacterium sp* (Chandra and Rustgi)، *Acinetiobactor* sp. (Betty *et al*., 1998)، *Phanerochaete chrysosporium* (Watanabe *et al*., 1999)، *Pseudomonas vesicularis* PD (Shimao *et al*, 1982)، *Pseudomonas putida* (Lee and Kim 2003). *Achromobacter cholinophagum* (Ullah *et al*., 2014)، *Vibrio alginolyticus* and *Vib- rio parahemolyticus* (Raghul *et al*., 2017) گزارش شده است. باکتری‌های سودوموناس در ردیف جنس‌های باکتریایی معروف بوده و بسیاری از مطالعات قبلی نیز منجر به جداسازی گونه‌هایی از جنس این باکتری شده است (Suzuki *et al*., 1973; Sakazawa *et al*., 1981; Shimao *et al*., 1982; Premraj and Mukesh, (2005); Leja and Lewandowicz, 2010). همچنین Hashimoto and Fujita (1985) نشان دادند، فیلم‌های پلی‌وینیل الکل توسط

Archive
www.SID.ir

Pseudomonas vesicularis var بعد از ۵ روز در حدود ۹۹٪ تخریب شدند. بنابراین، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد باکتری‌های سودوموناس دارای مکانیسم‌های قوی برای تخریب پلی وینیل الکل می‌باشد. از آنجایی که باکتری‌های متعلق به جنس سودوموناس، دارای تنوع ژنتیکی و فیزیولوژیکی زیادی هستند، توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی متنوعی را دارند. به همین دلیل آنها از فعالیت آنزیمی بالایی در اکثر مطالعات برخوردار می‌باشند. یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج این محققین (Suzuki *et al*., 1973; Sakazawa *et al*., 1981; Shimao *et al*., 1982; Hatanaka *et al*., 1995 Hashimoto and Fujita, 1985; Premraj and Mukesh, 2005); Leja and Lewandowicz, 2010) مطابقت دارد با این تفاوت جنس این نوع باکتری متفاوت بود.

نتیجه‌گیری

پژوهش اخیر با هدف مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده پلی وینیل الکل را از کمپوست زباله‌های جامد شهری بود. در این مطالعه باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی-وینیل الکل در زباله‌های جامد شهری از طریق آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی و جداسازی شد. بر اساس اطلاعات به دست آمده از این پایگاه اطلاعاتی مشخص شد، باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل *Pseudomonas geniculate* بود. این مطالعه نخستین گزارش در مورد توانایی این جنس از باکتری در زمینه تجزیه زیستی پلی‌وینیل الکل است.

REFERENCES

Campos, A.D., Marconato J. C., and Martins-Franchetti S. M. (2011). Biodegradation of blend films PVA/PVC, PVA/PCL in Soil and Soil with Landfill Leachate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (6), 1367-1378.

Chiellini, E., Corti, A., and Solaro R. (1999). Biodegradation of polyvinyl alcoholbased blown films under different environmental conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 64, 305-312.

Chiellini, E., Corti, A., Antone, S. D., and Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly(vinyl alcohol)based materials. *Progress in Polymer Scnience*, 28, 963-1014.

Chandra, R., and Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23, 1273-1335

Chen, J., Zhang, Y., Du, G. C., Hua , Z. Z., and Zhu, Y. (2007). Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1686- 1691.

Corti, A., Solaro, R., and Chiellini, E. (2002). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) in selected mixed
microbial culture and relevant culture filtrate. *Polymer Degradation and Stability2002*; 75 ,447-45.

Gomez, E. F., F, C., and Michel, J. r. (2013). Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 98, 2583-2591.

Fourti, O., Jedidi, N., and Hassen, A. (2008). Behavior of main microbiological parameters and of enteric microorganisms during the composting of municipal solid wastes and sewage sludge in a semi Industrial composting plant. *American Journal of Environmental Sciences*, 4(8): 103-10.

Fusakok, K., and HU, X. (2009). Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbial and Biotechnology*,. 84, 220-227.

Jecu, L., Grosu, E., Raut, I., Ghiurea, M., Constantin, M., Stoica, A., Stroescu, M., and Vasilescu, G. (2012). Fungal degradation of polymeric materials. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 65, 97-104.

Hopewell, J., Dvorak, R., and Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B*, 364, 2115-2126.

Hatanaka, T., Asahi, N., and Tsuji, M. (1995). Purification and characterization of poly vinyl alcohol dehydrogenase from Pseudomonas sp. 113P3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1813-1816.

Hashimoto, S., and Fujita, M. (1985). Isolation of bacterium requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation. *Journal of Fermentation Technology*, 63,471–474.

Kim, D. Y., and Rhee Y. H. (2003). Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 300-308.

Lodha, P. (2004). Fundamental approaches to improving performance of soy protein isolate based green' plastics and composites. Ph.D. dissertation, Cornell University..

Liu, X., Sheng, X., Lee, J. K., and Kessler, M. R. (2009). The biodegradation of polymers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294, 21-35.

Leja, K., and Lewandowicz, G., (2010). Polymer biodegradation and biodegradable polymers–a review. Polish Journal of Environmental Studies, 19, 255-266.

Matsumara, S., Kurita, H., and Shimokobe, H (1994). Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters*, 15, 749-754.

Mori,T., Sakimoto, M., Kagi, T., and Sakai, T. (1996). Isolation and characterization of a strain of Bacillus megaterium that degrades polyvinyl alcohol.Bioscience. *Biotechnology and*

Archive of SID

www.SID.ir

Biochemistry, 60, 330-332.

Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T. and Sakai, T. (1997). Enzymatic desizing of polyvinyl alcohol from cotton fabrics. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, 151-156.

Mollasalehi, S. (2013). Fungal biodegradation of poly (vinyl alcohol) in soil and compost environments. Ph. D. dissertation, University of Manchester.

Premraj, P., and Doble, M. (2005). Biodegradation of polymers . *Indian journal of Biotechnology*, 4, 186-193.

Phua, Y.J., Chow, W. S., and Mohd Ishak, Z. A. (2011). Mechanical properties and structure development in poly(butylenesuccinate)/organo-montmorillonite nanocomposites under uniaxial cold rolling. *eXPRESS Polymer Letters*, 5, 93–103.

Phillip, E.A. (2010). The design and construction of a pilot-scale compost reactor for the study of gas emissions from compost under different physical conditions. Ph. D. dissertation, University OF Montreal.

Suzuki, T., Ichihara, Y., Yamada, M. and Tonomura, K. (1973). Some characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 747-756.

Sakazawa C., Shimao, M., Taniguchi, Y., and Kato, N. (1981). Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. Applied and Environmental Microbiology., 41, 261-267.

Shimao, M., Ninomiy, K., Kuno, O., Kato, N., and Sakazawa, C. (1982). Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinonedependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, Pseudomonas sp. strain VM15C. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 268-275.

Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 242 -247.

Schadd, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. (pp. 76-336).

Salehpour, Sh., Jonoobi, M., Ahmadzadeh, M., Siracusa, V., Rafieian, F., and Oksman, K. (2018). Biodegradation and ecotoxicological impact of celluose nanocomposites in municipal solid waste composting. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 264-270.

Semenov, S. A., Gumargalieva. K. Z., and Zaikov, G. E. (2003). Biodegrdation and durability of materials under the effect of microorganisms. *Boston, MA:* VSP BV.

Shah, A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26, 246-265

Silvério, H. A., Flauzino Neto ,W. P. and Pasquini, D. (2013) Effect of incorporating cellulose nanocrystals from corncob on the tensile, thermal and barrier properties of poly(Vinyl Alcohol) nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 1-9 .

Raghul, S. S., Bhat, S. G., Chandrasekaran, M., Francis, V., and Thachil, E. T. (2014). Biodegradation of polyvinyl alcohol-low linear density polyethylene-blended plastic film by consortium of marine benthic vibrios. International Journal of *Environmental Science and Technology*, 11, 1827–1834.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007). Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 199–211.

Tsujiyama, S.I., Nitta, T. and Maoka, T. (2011). Biodegradation of polyvinylalcohol by Flammulina velutipes in an unsubmerged culture. *Journal of Bioscienceand Bioengineering*, 122, 58-62.

Teimouri, M., Korori, S.A.A., Matinizadeh, M., and Khoshnevis, M. (2005). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Vaz forest soil. *Pajouhesh ad Sazandegi*, 65, 57-64. (In Farsi)

Ullah, M., Weng, C., Li, H., Sun, Sh., Zhang, H., Song, A. H., and Zhu. H. (2017). Degradation of polyvinyl alcohol by a novel bacterial strain Stenotrophomonas sp SA21. *Environmental Technology*, 65, 1-6

Watanabe, Y., Hamada, N., Morita, M. and Tsujisaka, Y. (1976). Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of Pseudomonas. *Biochemistry and Biophysics*, 174, 575-58.

Zakaria, M. R., Tabatabaei, M., Ghazali, F. M., Abd-Aziz, S., Shirai, Y., Hassan, M. A (2010). Polyhydroxy alkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain Comamonas sp. EB172. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 767–774.

Archive of SID

www.SID.ir