



Study on Biodegradation of Sun Treated Low-Density Polyethylene (Ld-PE) Films by Plastic Degrading Bacteria in Bioreactors

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Montazer Z.¹ *PhD*,
Habibi-Najafi M.B.*¹ *PhD*,
Mohebbi M.¹ *PhD*,
Oromiyeey A.R.² *PhD*

How to cite this article

Montazer Z, Habibi-Najafi M.B, Mohebbi M, Oromiyeey A.R. Study on Biodegradation of Sun Treated Low-Density Polyethylene (Ld-PE) Films by Plastic Degrading Bacteria in Bioreactors. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):231-240.

¹Food Science & Technology Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Iran Polymer and Petrochemical Institute (IPPI), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Food Science & Technology Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 9177948978
Phone: +98 (51) 38805772
Fax: +98 (51) 38787430
habibi@um.ac.ir

Article History

Received: February 18, 2018
Accepted: April 9, 2018
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Accumulation of polyethylene (PE) wastes has become a major environmental problem. The objective of this research was to assess the potential for microbial degradation of sun-treated low-density PE as a natural way to eliminate PE wastes in semi-industrial condition. Low-density polyethylene (LDPE) films were exposed to one month of sun radiation treatment and then cultured with two PE-degrading bacteria (*Sphingobacterium multivorum* IRN11 and *Delftia tsuruhatensis* IRN27) in aerobic bioreactors over 100 days. Weight loss percentage of the PE and the culture pH were measured. Also, Changes in the chemical structure of the LDPE were assessed by FT-IR and surface erosion and microbial layer formation by bacterial activity was observed by Scanning Electron Microscopy. Partial increases in the culture pH were recorded during the incubation period. The weight loss percentage for T-LDPE samples cultured with *Sphingobacterium multivorum* IRN11 and *Delftia tsuruhatensis* IRN27 was $3.31\% \pm 0.013$ and $3.98\% \pm 0.025$ in TLDPE samples, respectively, and functional carbonyl-groups in the TLDPE samples decreased significantly due to bacterial hydrolysis. SEM images showed the different microbial layer formation on sun-treated low-density polyethylene (T-LDPE) for both bacteria. Our results suggest that exposure of LDPE to sun radiation had a significant effect on biodegradation of Ld-PE films and that the two bacteria tested were able to enhance the biodegradation the T-LDPE.

Keywords Biodegradation; Low Density Polyethylene; Bioreactor; Sun Treatment

CITATION LINKS

[1] Plastics - the facts 2016, an analysis of ... [2] Biodegradation of bioplastics in ... [3] Marine anthropogenic ... [4] Global plastic production rises, recycling ... [5] Biological degradation of plastics: A ... [6] Abiotic and biotic degradation of ... [7] Process optimization for the production ... [8] Degradation of linear low density ... [9] Why we need to be clear about ... [10] Biodegradability of ... [11] The mechanism of biodegradation ... [12] Biodegradation of low-density polyethylene ... [13] Brazilian Cerrado soil reveals an untapped ... [14] Screening of polyethylene degrading ... [15] Biodegradation of photo-degraded mulching ... [16] Comparative effect of metal stearates as ... [17] An approach to low-density polyethylene ... [18] Biodegradation of low-density ... [19] Influence of cell surface hydrophobicity in ... [20] Marine microbe-mediated ... [21] Biodegradation of low-density polyethylene ... [22] Biodegradation of polyethylene microplastics ... [23] Biodegradation of polyethylene by a ... [24] Functional analysis of alkane hydroxylase ... [25] Biodegradation of disposable polyethylene ... [26] Evidence of polyethylene biodegradation ... [27] The influence of biotic and abiotic environments ... [28] Degradation of polyethylene by a ... [29] Degradation of polyethylene film ... [30] Synergistic effect of photo and chemical ... [31] Biodegradation of polyethylene and ... [32] Biodegradability of ... [33] Environmental biodegradation of ... [34] Biofilm formation and partial ... [35] Comparison of the biodegradability of ... [36] Biodegradation of low density ... [37] Biodegradation of Polyethylene using ... [38] Synergistic effects of pretreatment ... [39] Biodegradability of polyethylene ... [40] Biodegradation of polyethylene by ... [41] Enzymatic and microbial ... [42] The role of the copper-binding ... [43] Comparative study on biodegradability ... [44] Computational method for analysis of ... [45] Enhancement of biodegradation of ... [46] *Sphingobacterium* ... [47] *Sphingobacterium multivorum* ... [48] Application of biosurfactant from ... [49] Biodegradability of Scott-Gelead ... [50] *Delftia tsuruhatensis* ... [51] Soil bacterial strains able to ... [52] Isolation and characterization of ... [53] Potential biodegradation of low density ... [54] Identification of new rubber-degrading ... [55] Degradation of unpretreated and ... [56] R Core Team. R: A language and ... [57] Polythene and plastics-degrading ... [58] Biodegradability of polythene and ... [59] Microbial degradation and deterioration ...

مطالعه زیست‌تخریب‌پذیری فیلم‌های پلی‌اتیلن با دانسته پایین تیمار شده با تابش خورشید توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده پلاستیک در رآکتورهای زیستی

زهرا منتظر PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

محمدباقر حبیبی‌نجفی* PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

محبت محبی PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

عبدالرسول ارومیه‌ای PhD

پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران

چکیده

انباشتگی ضایعات پلی‌اتیلنی یکی از مشکلات زیست‌محیطی عمده است. هدف از این پژوهش بررسی تخریب‌پذیری میکروبی فیلم‌های پلی‌اتیلنی پرداخت شده با تابش آفتاب در شرایط نیمه‌صنعتی به‌عنوان روش طبیعی برای حذف ضایعات پلی‌اتیلنی است. فیلم‌های پلی‌اتیلنی به‌مدت یک ماه در معرض تابش خورشید و سپس به‌مدت صد روز در واکنش‌گاه‌های زیستی هوای تحت تاثیر دو گونه میکروبی *اسفنگوباکتریوم مولتیپوروم* IRN11 و *دلفتیا تسوروها تنزیس* IRN27 قرار گرفتند. درصد افت وزن پلی‌اتیلن و تغییرات pH در محیط بررسی شدند. همچنین فیلم از نظر تغییر در ساختار شیمیایی توسط روش FT-IR بررسی شد و برای بررسی تشکیل لایه میکروبی روی سطح و تغییرات سطح پلیمر در مجاورت باکتری‌ها تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM) به کار رفت. افزایش جزئی pH طی دوره انکوباسیون ثبت شد. درصد کاهش وزن نمونه‌های پلی‌اتیلن پرداخت شده خورشیدی تحت تاثیر دو باکتری به ترتیب ۳/۳۱±۰/۰۱۳٪ و ۳/۹۸±۰/۰۲۵٪ بودند و گروه‌های عاملی کربونیلی در این نمونه‌ها در اثر هیدرولیز باکتریایی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافتند. تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی تشکیل لایه‌های میکروبی متفاوت را روی سطح پلیمر پرداخت شده با تابش خورشید به‌وسیله هر دو باکتری نشان دادند. نتایج نشان دادند تابش نورخورشید اثر معنی‌داری در افزایش قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی فیلم‌های پلی‌اتیلنی داشت و دو باکتری مورد آزمون قادر بودند زیست‌تخریب‌پذیری فیلم‌های پرداخت شده با تابش خورشید را بهبود بخشند.

کلیدواژه‌ها: زیست‌تخریب‌پذیری، پلی‌اتیلن کم‌چگال، واکنش‌گاه زیستی، تیمار خورشیدی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰

* نویسنده مسئول: habibi@um.ac.ir

مقدمه

پلاستیک‌های سنتزی، به‌دلیل استحکام بی‌نظیر و قیمت کم در صنعت بسته‌بندی کاربرد فراوانی دارند به‌طوری‌که حدود ۳۰ تا ۴۰٪ کل پلاستیک تولیدی در دنیا در صنعت بسته‌بندی استفاده می‌شود و در این میان سهم عمده‌ای به پلی‌اتیلن اختصاص دارد [1, 2]. مصرف روزافزون پلاستیک، کمبود فضای مناسب برای دفن ضایعات پلاستیکی در کنار عدم کفایت روش‌های نوین مدیریت پسماند، نظیر بازیابی انرژی و بازیافت، منجر به ورود مقادیر بالای ضایعات پلاستیکی به اقیانوس‌ها (۲۰-۱۰ میلیون تن در سال) [3] و زمین (۴۳-۲۲٪ ضایعات دورریز) [4] و بروز نگرانی‌های جدی در ارتباط با انباشتگی پلاستیک در سراسر دنیا شده است. در این میان پلی‌اتیلن به‌دلیل مقادیر بالای تولید و تجزیه‌ناپذیری بلندمدت و زمان مصرف کوتاه، از گروه آلاینده‌های اصلی محیط زیست به

حساب می‌آید به‌طوری‌که نیاز به پلی‌اتیلن‌های زیست‌تجزیه‌پذیر و تجزیه بیولوژیکی آن اهمیت فزاینده‌ای یافته است [5-8]. حذف ضایعات انباشت شده و بازگرداندن ضایعات پلاستیکی بسته‌بندی به طبیعت دغدغه جهانی بوده و به این منظور پروژه‌های مختلفی نظیر "دریاهای تمیزتر" در سال‌های اخیر اجرا شده یا استانداردهایی مانند ASTM D6400-12 و BS EN 13432 که بر مبنای برچسب‌زنی بسته‌بندی‌های غذایی دارای قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری یا کمپوست‌شدن تدوین شده‌اند [9].

تجزیه‌پذیری میکروبی الیگومرهای پلی‌اتیلن با وزن مولکولی زیر ۱۰۰۰ اولین بار توسط تسوچی و همکاران در سال ۱۹۸۰ بیان شد [10].

در اولین آزمون‌های زیست‌تخریب‌پذیری، دانشمندان تلاش کردند تاثیر رشد میکروب‌ها روی پلاستیک را به‌صورت تغییرات ظاهری و فیزیکی پلاستیک مانند تنش کششی، جذب آب و خواص بلورین‌بودن نشان دهند [11, 12]. از اوایل قرن حاضر تحقیقات زیادی روی تجزیه‌پذیری میکروبی پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌ناپذیر به‌ویژه پلی‌اتیلن در سراسر دنیا صورت گرفته، که شامل تلاش برای جداسازی و ایزولاسیون گونه‌های مختلف میکروبی دارای پتانسیل تجزیه پلی‌اتیلن از منابع متفاوت مانند خاک [13]، خاک‌های دفن پسماندهای پلاستیکی [14-17]، ضایعات پلاستیکی جامد [18, 19]، آب دریا [20-22]، خاک آلوده به مواد نفتی [23, 24]، لجن و فاضلاب [8, 25] و حتی بدن حشرات مانند کرم واکس [26] و بررسی زیست‌تخریب‌پذیری پلی‌اتیلن تحت اثر این میکروب‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. در اکثر این آزمایش‌ها به‌منظور تسریع فرآیند تخریب میکروبی، پلاستیک تحت تاثیر تیمار با اشعه فرابنفش یا مواد اکسیدکننده و حرارت قرار می‌گیرد [11, 15, 27-29]. در برخی تحقیقات میزان تاثیر هر کدام از روش‌های پیش‌تیمار، جداگانه یا همزمان مورد بررسی قرار گرفته و نیاز به تاثیر پیش‌تیمار برای شروع فعالیت میکروبی به اثبات رسیده است [30, 31].

زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی را می‌توان به چهار مرحله اضمحلال، هیدرولیز یا اکسیداسیون، دپلیمریزاسیون یا قطعه‌قطعه‌شدن، جذب بیولوژیکی و معدنی‌شدن تقسیم نمود. بر مبنای مراحل بیان‌شده دانشمندان، روش‌های متفاوتی را برای اثبات زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی به کار برده‌اند که هر کدام از این روش‌ها یکی از مراحل زیست‌تخریب‌پذیری را اثبات می‌کند. تمام مراحل به‌جز مرحله آخر تاکنون توسط روش‌های مختلف آزمایشگاهی اثبات شده‌اند [5, 32].

آزمون‌های اثبات تجزیه پلاستیک شامل کاربرد FT-IR به‌منظور اثبات اکسیداسیون و تولید گروه‌های کربونیلی؛ SEM برای اثبات تجمع باکتریایی روی سطح و خوردگی احتمالی سطحی پلیمر در اثر ترشح مواد تجزیه‌کننده مانند آنزیم‌ها [17, 28, 29, 33-37]؛ GC-MS به‌منظور اثبات تولید فراورده‌های کوتاه‌زنجیر حاصل از تجزیه (قطعه‌قطعه‌شدن بیولوژیکی) [15, 36, 38]؛ اندازه‌گیری کاهش وزن پلیمر با استفاده از ترازوهای حساس و دقیق که نشان‌دهنده جداشدن ترکیبات مختلف از بستر پلیمر است [14, 39] و کاربرد کروماتوگرافی تراوش ژل (GPC) و اندازه‌گیری گرانی‌ذاتی به‌منظور اثبات کاهش وزن مولکولی پلیمر در اثر شکسته‌شدن زنجیره اصلی هستند [14, 33, 40, 41]. دو آزمون اول رایج‌ترین آزمون‌های ارزیابی زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی مورد استفاده توسط پژوهشگران است.

تاکنون فرضیه‌های مختلفی در ارتباط با مکانیزم فرآیند زیست‌تخریب‌پذیری پلی‌اتیلن عنوان شده است که عمومی‌ترین آنها شامل اکسیداسیون به‌عنوان مرحله آغاز فرآیند است. در محیط

اسفنگویاکتریوم مولتیپوروم: باکتری میله‌ای شکل بدون تحرک و بدون تولید اسپور، گرم منفی (رنگ صورتی- قرمز) با دیواره پپتیدوگلیکانی نازک، با دمای بهینه رشد $28-26^{\circ}\text{C}$ و دارای متابولیسم هوازی و تولیدکننده مقادیر فراوان اسفنگولیپید (یک زیست‌سطح‌فعال طبیعی) است. این باکتری توانایی استفاده از قندهای مختلف و احیای نیتروژن به گاز نیتروژن را دارد. از آن در تولید پلیمرهای طبیعی و تجزیه رنگ‌های مصنوعی در فاضلاب استفاده می‌شود. به علت نوظهور بودن این باکتری به آزمون‌های دیگری به منظور تعیین ویژگی‌ها نیاز است [46, 47]. به قدرت تجزیه‌کنندگی پلی‌اتیلن و برخی روغن‌های روان‌کننده توسط اسفنگوموناس‌ها در برخی مقالات اشاره شده است [48, 49]. گونه مورد استفاده در این پژوهش اسفنگویاکتریوم مولتیپوروم IRN11 است که باعث ایجاد تغییرات ظاهری محسوس در سطح فیلم پلی‌اتیلن شامل دانه‌دانه شدن، کدر شدن و چروکیدگی بود.

دلفتیا تسوروها تنزیس: باکتری میله‌ای گرم منفی کاتالاز و اکسیداز مثبت و متحرک با دمای بهینه $30-28^{\circ}\text{C}$ است که اولین بار از کارخانه تصفیه فاضلاب خانگی جداسازی شده است [50]. جنس دلفتیا نزدیک به دو جنس کوماموناس و سودوموناس (هر سه دارای قدرت تجزیه‌کنندگی پلی‌اتیلن بدون پیش‌پرداخت) [11, 13] دارای قدرت تجزیه محدود گسترده‌ای از مواد است. همچنین به تجزیه‌کنندگی دلفتیا اسیدوورانس روی پلی‌اتیلن توسط کوتنی و همکاران اشاره شده است [51]. گونه شناسایی شده آن در این پژوهش دلفتیا تسوروها تنزیس IRN27 است.

با توجه به ویژگی‌های عنوان شده شرایط بهینه فرآیند زیست‌تخریب‌پذیری شامل کاربرد محدوده دمایی $29-27^{\circ}\text{C}$ ، محدوده pH متعادل و استفاده از ترکیباتی با پایه شیمیایی مشابه پلی‌اتیلن در محیط (هیدوکربن های خطی کوتاه‌زنجیر) به عنوان آغازگر فرآیند است. همچنین کاربرد ترکیبات زیست‌سطح‌فعال (شامل توئین‌ها و EDTA) در محیط با بهبود فرآیند اتصال میکروب به سطح پلیمر و کاهش کشش سطحی می‌تواند تاثیرگذار باشد [34].

ب) فیلم پلی‌اتیلنی کم چگال (LDPE)

فیلم LDPE از گرانول‌های پلی‌اتیلنی گونه Polarian LF0200 براساس مشخصات شرکت سازنده (جدول ۱) بدون هیچ‌گونه افزودنی خاص با ضخامت متوسط 10 میکرومتر تهیه شد.

جدول ۱) مشخصات گرانول پلی‌اتیلن گونه Polarian LF0200			
خصوصیت	واحد	روش اندازه‌گیری	مقدار
شاخص جریان مذاب (۱۹۰°C/۲/۱۶Kg)	گرم/10 دقیقه	ASTM D-1238	7/1-3/2
دانسیته	گرم/میلی‌لیتر	TSTM 209 B	918/0-922/0
نقطه نرم شدن	°C	ASTM D-1525	92-96
ایری بودن	درصد	ASTM D-1003	حد اکثر 15
شیشه‌ای شدن در ۶۰°C	gu	ASTM D-523	60 دقیقه

ج) محیط کشت

از محیط کشت پایه نمک‌های حداقلی به منظور غوطه‌وری فیلم‌های LDPE به عنوان منبع منحصربه‌فرد کربن در محیط استفاده شد. روش تهیه این محیط براساس روش‌های به‌کاررفته توسط سایر محققان با اندکی تغییر [52-54] و در محیط در هر لیتر شامل دی‌پتاسیم فسفات 5 گرم، مونوسدیم فسفات 2 گرم، آمونیوم سولفات 4 گرم، منیزیم سولفات ۷ آب ۰/۵ گرم، سدیم کلرید ۱ گرم، پتاسیم کلرید 15/0 گرم، کلسیم کلرید ۶ آب 2/0 گرم، محلول

طبیعی اکسیداسیون توسط عوامل غیربیولوژیکی مانند تشعشع آفتاب یا حرارت تسریع و باعث تولید گروه‌های عاملی می‌شود. در سال‌های اخیر عملکرد برخی آنزیم‌های خارج سلولی اکسیدکننده میکروبی در شروع اکسیداسیون زنجیره پلیمری و شروع تخریب پلاستیک‌های سنتزی اثبات شده است [42]؛ اما در اکثر پژوهش‌ها برای مطالعه زیست‌تخریب‌پذیری از اکسیداسیون غیرمیکروبی نظیر استفاده از اشعه فرابنفش (فوتوکسیداسیون) به عنوان مرحله غیرقابل اجتناب برای شروع فرآیند بیولوژیکی و برای شکسته شدن ابتدایی استفاده می‌شود [16, 27]؛ با شکستن باندهای موادی با وزن مولکولی کم که به اندازه کافی برای عبور از غشای نیمه‌تراوای خارجی باکتری‌ها کوچک هستند، تولید می‌شوند و افزایش سطح قابل دسترس به علت شکسته شدن افزایش می‌یابد. در این مکانیزم ابتدا تابش فرابنفش توسط زنجیره پلیمری جذب می‌شود که منجر به تشکیل رادیکال خواهد شد. اکسیژن جذب رادیکال شده و هیدروپراکسیدها تشکیل می‌شوند. محصول نهایی گروه‌های کربونیلی مختلف هستند که آب‌دوستی پلیمر را افزایش و کریستاله بودن پلیمر را نیز کاهش می‌دهند [11]. پس از شکسته شدن زنجیره طولانی به زنجیره‌های کوتاه‌تر خطی (n- آلکان‌ها)، میکروارگانیزم و آنزیم‌های مترشحه راحت‌تر می‌توانند به پلیمرها حمله کنند. n- آلکان‌ها در مراحل بعدی اکسیداسیون به آلدهید و کتون و سپس اسید تبدیل می‌شوند. n- آلکان‌های کربوکسیله شده مشابه اسیدهای چرب هستند و بنابراین از طریق چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TGA) و مسیر بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب تا رسیدن به دو کربن (استیک اسید) پیروی می‌کنند [23, 43, 44].

اگرچه با گذشت زمان مانده پلاستیک در طبیعت و تغییر فیزیولوژی میکروبی به سمت مصرف مواد پلاستیکی و همچنین ایزولاسیون گونه‌های قوی‌تر تجزیه‌کننده امید برای تجزیه میکروبی به عنوان روش قابل اجرا افزایش یافته و مستند شده است؛ اما تحقیقات کمی در ارتباط با زیست‌تخریب‌پذیری پلاستیک‌ها در محیط‌های واقعی (که به زیست‌تخریب‌پذیری ضایعات پلاستیکی در خاک پرداخته‌اند) [18, 45] و با کاربرد پیش‌تیمارهای طبیعی نظیر نور خورشید (به منظور القای بهتر تیمار میکروبی) به منظور حذف پسماندهای پلاستیکی به صورت عملی صورت گرفته است. هدف از این مقاله بررسی امکان زیست‌تخریب‌پذیری فیلم‌های پلی‌اتیلنی پرداخته شده با تابش طبیعی نور خورشید در شرایط نیمه‌صنعتی در محیط آبی توسط دو جدایه میکروبی تجزیه‌کننده است که به منظور بررسی زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی ضایعات پلاستیکی در شرایط غیرآزمایشگاهی و بررسی قابلیت کاربرد روش در محیط واقعی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

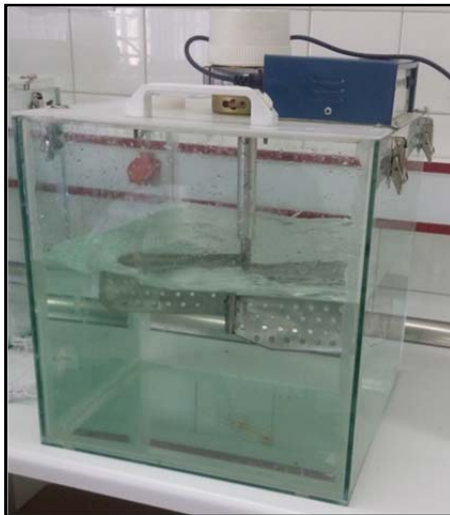
الف) سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی به‌کاررفته شامل جدایه‌های قوی تجزیه‌کننده پلی‌اتیلن و به‌دست آمده از محل دفن پسماندهای پلاستیکی مشهد اسفنگویاکتریوم مولتیپوروم IRN11 (شماره دسترسی: MF348188) و دلفتیا تسوروها تنزیس IRN27 (شماره دسترسی: MF348184) بودند که با روش‌های وابسته به کشت از خاک جداسازی شده و پس از استخراج و تخلیص DNA، قطعه ژن 16sDNA در آنها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر و سپس تعیین توالی و شناسایی شدند. ماهیت باکتری‌ها به شرح زیر است؛

12 ساعت از زمان آخرین کشت به میزان ۱٪ حجم محیط داخل فرمانتور (غلظت تنظیم شده، جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر مطابق با $1/5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$) به آن تلقیح گردد. تغییرات دما و pH به مدت ۱۰۰ روز برای کنترل شرایط بهینه واکنش‌گاه‌های زیستی و پایش تغییرات احتمالی pH در اثر تخریب، اندازه‌گیری شدند. روند تخریب با توجه به وجود تغییراتی نظیر ظاهر قطعات پلاستیکی، ایجاد بو یا رنگ خاص در محیط پایش شد. همچنین به منظور اطمینان از باقی‌ماندن شرایط اسپتیک، به‌طور متناوب از محیط واکنش‌گاه زیستی کشت میکروبی صورت گرفت. علاوه بر اینها آزمون‌هایی روی قطعات پلاستیک انجام و رشد میکروبی به شرح زیر طی این مدت پایش شد.

د) اندازه‌گیری افت وزن پلیمر

فیلم‌های پلی‌اتیلن در فواصل زمانی ۳ روزه و در سه تکرار از محیط کشت جدا، شسته شده و به مدت ۴ ساعت در محلول SDS ۲٪ در دمای 50°C به منظور حذف باکتری‌های چسبیده احتمالی قرار گرفتند و پس از شست‌وشوی کامل با آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه برای سترون‌سازی در اتانول قرار داده شدند. این قطعات پس از استخراج از اتانول در ظروف پتری از قبل سترون‌شده قرار گرفتند و پس از تبخیر کامل اتانول و خشک‌شدن در 60°C وزن شدند [55].



شکل ۱) واکنش‌گاه هوایی مورد استفاده در بررسی زیست‌تخریب‌پذیری فیلم‌های پلی‌اتیلن کم‌چگال

بررسی تغییرات ساختار مولکولی با FT-IR

طیف‌سنجی مادون‌قرمز برای بررسی گروه‌های عاملی کربونیل و متیلن حاضر در ترکیب پلیمر به کار رفت. پس از تخریب میکروبی، به‌وجود آمدن یا از بین رفتن گروه‌های عاملی کربونیل و متیلن در پلیمر توسط این روش پایش شد. تمرکز اصلی در این آزمون بر روی گروه کربونیل در محدوده فرکانس $1700-1800 \text{ cm}^{-1}$ بود؛ زیرا افزایش شاخص کربونیل پس از پایش تیمار با نور آفتاب نشان‌دهنده تولید گروه‌های عاملی کربونیلی و کاهش شاخص کربونیل نشان‌دهنده تجزیه میکروبی پلیمر است. شاخص کربونیل برابر است با نسبت جذب گروه‌های کربونیل در گروه کربوکسیلی (-COO) در طول موج 1714 cm^{-1} به جذب گروه‌های متیلن (-CH₂-) (در طول موج 1435 cm^{-1} (طول موج برش متیلن) که برای بیان مقدار غلظت ترکیبات کربونیلی توسط طیف‌سنجی مادون‌قرمز (Thermo AVATAR 370) دستگاه طیف‌سنج مادون‌قرمز مدل

عناصر نادر یک میلی‌لیتر (حاوی 1/0 گرم از نمک‌های آهن (II) سولفات ۷ آبه، مس (II) سولفات و کلریدری در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و توئین 80 یک میلی‌لیتر بود.

روش پژوهش

الف) پایش تیمار فیلم‌های پلی‌اتیلن کم‌چگال با استفاده از تابش خورشید

از آنجایی که تاثیر فعال‌سازی گروه‌های عاملی در شروع تجزیه باکتریایی به اثبات رسیده است، کاربرد پایش تیماری نظیر تابش فرابنفش به‌علت کاربردی بودن آن در محیط‌های واقعی (درون‌تنی) به‌صورت تابش نور خورشید، هزینه کمتر، اثر بیشتر نسبت به روش‌های حرارتی (غیر از گرمخانه‌گذاری با باکتری‌های ترموفیل در دمای 70°C) و پاک‌بودن روش نسبت به کاربرد مواد اکسیدکننده و حرارت انتخاب شد [16, 31, 35, 55].

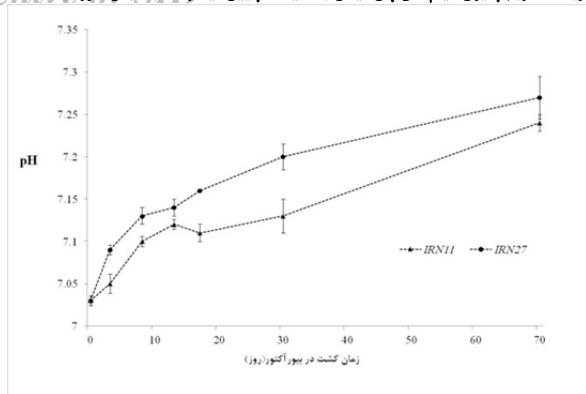
فیلم‌های LDPE در معرض نور خورشید در ماه تیر با زاویه تابش متغیر تا رسیدن به اندیس کربونیل ۰/۲ در موقعیت عرض جغرافیایی 34° درجه و 44° دقیقه (شمال) و عرض جغرافیایی 60° درجه و 47° دقیقه (شرق) قرار گرفتند. قطعات فیلم پلی‌اتیلن در دو شکل دایره به قطر 26 میلی‌متر (TLDPE) و مربع با قطر 22 میلی‌متر با اندیس کربونیل صفر (ULDPE) به‌عنوان نمونه شاهد و مرجع به‌منظور بررسی تاثیر میکروبی بر کاهش وزن و تغییر ساختار شیمیایی نمونه‌های پرداخت‌شده با آفتاب، سترون شده و پس از آماده‌سازی به روش آرکاتکار و همکاران 2009 به محیط اضافه شدند. به این منظور کلیه قطعات به مدت ۴ ساعت در محلول سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) ۲٪ در دمای 50°C به‌منظور حذف باکتری‌های چسبیده احتمالی قرار گرفتند و پس از شست‌وشوی کامل با آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه برای سترون‌سازی در اتانول قرار داده شدند. این قطعات پس از استخراج از اتانول در ظروف پتری از قبل سترون‌شده تا زمان تبخیر کامل اتانول و خشک‌شدن قرار گرفتند و وزن شدند [55].

ب) آماده‌سازی واکنش‌گاه زیستی

دو عدد واکنش‌گاه زیستی شیشه‌ای مکعب مربع به طول 45 سانتی‌متر از جنس شیشه، مجهز به محل نمونه‌برداری، سامانه کنترل دمای بیشینه و کمینه و همزن از جنس فولاد ضدزنگ با سرعت چرخش قابل تنظیم طراحی و ساخته شدند. تصویر این واکنش‌گاه‌ها در شکل ۱ نمایش داده شده است. کلیه قطعات واکنش‌گاه تحت تابش فرابنفش (به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. سپس فرمانتورها با آب تا میزان مورد نیاز پر شده (25 لیتر به‌ازای هر فرمانتور) و کل دو مجموعه توسط گاز اوزن (سرعت جریان 450 میلی‌گرم در ساعت) توسط دستگاه اوزن ساز مدل KED-A98 (50 هرتز و 15 وات) به مدت 20 دقیقه سترون شدند. به فرمانتور ترکیبات محیط کشت پایه در حد مورد نیاز، 100ppm پارافین به‌عنوان منبع کربنی با پایه نفتی و 50ppm -n هگزادکان با ساختاری مشابه پلی‌اتیلن به‌صورت سترون به‌عنوان استارترهای شروع رشد به‌ازای هر فرمانتور به آن افزوده شد. سرعت چرخش همزن 30 دور در دقیقه تنظیم و سپس قطعات فیلم پلی‌اتیلن با آنها اضافه شدند (شکل ۱).

ج) تایید سترون‌بودن فرمانتور و آزمون زیست‌تخریب‌پذیری

نتایج منفی حاصل از کشت محتویات داخل فرمانتور، سترون‌بودن محیط را تایید نمود. سپس فرمانتورها به مدت یک روز به‌منظور پایش شرایط و کنترل دما بدون تلقیح روشن شدند. دو گونه میکروبی مورد نظر در محیط کشت‌های برات مغذی و نمک‌های حداقلی حاوی پلی‌اتیلن برای فعال‌سازی تلقیح شدند و پس از



نمودار ۱) تغییرات pH در طی تیمار میکروبی فیلم‌های LDPE در واکنش‌گاه‌های زیستی

افزایش جزئی pH طی تخریب پلی‌اتیلن با نتایج داس و کومار که زیست‌تخریب‌پذیری پلی‌اتیلن کم‌چگال را تحت اثر باسیلوس لیکوئی فسیئس بررسی کرده‌اند در تطابق است. این بررسی افزایش pH را از ۷ تا ۷/۵ طی ۶۰ روز گرمخانه‌گذاری نشان می‌دهد. افزایش جزئی pH را می‌توان به ترشح ترکیبات خارج سلولی میکروب‌ها نظیر آزیم‌های مترشحه دارای عوامل بازی مرتبط دانست که منجر به تجزیه پلی‌اتیلن می‌شوند. همچنین تبدیل منبع نیتروژنی آمونیوم موجود در محیط کشت به ترکیباتی نظیر آمونیاک در اثر رشد باکتریایی می‌تواند منجر به افزایش جزئی pH شود [17].

بررسی روند کاهش وزن قطعات LDPE

کاهش وزن قطعات پلاستیکی طی ۱۰۰ روز گرمخانه‌گذاری برای نمونه‌های TLDPE و ULDPPE تحت تاثیر گونه‌های IRN27 و IRN11 اندازه‌گیری شدند. نمودار ۱ منحنی روند کاهش را برای تمامی نمونه‌ها نشان می‌دهد. منحنی‌های تخریب به‌دست‌آمده برای دو گونه میکروبی روندهای مختلفی را نشان می‌دهند. در حالی که تخریب نمونه مرجع تحت تاثیر دو گونه میکروبی صفر تا ۵/۰٪ بود، تخریب قطعات TLDPE با روند تغییر متفاوت و بین ۳ تا ۴٪ دیده شد. با توجه به تعداد بالای قطعات پلیمری در واکنش‌گاه‌ها این میزان تخریب، مواد مغذی کافی را طی رشد میکروب‌ها در مدت حدود سه ماه تامین کرده است. براساس مشاهدات نمودار ۲ تخریب فیلم LDPE در اثر فعالیت گونه IRN11 پس از پایان ماه اول تیمار و گونه IRN27 پس از دو هفته اول تیمار در واکنش‌گاه زیستی آغاز شده است؛ به‌طوری که گونه IRN27 تخریب پلی‌اتیلن را زودتر آغاز نموده و سپس با سرعت ثابتی تا پایان زمان تیمار میکروبی ادامه داده است. در ارتباط با گونه IRN11 تخریب در طی دو ماه اول بسیار کم و پس از ۷۰ روز با سرعت بیشتری ادامه یافته است. بالاترین میزان تخریب مربوط به رشد IRN27 در پایان ۱۰۰ روز به میزان ۰/۰۲۵±۰/۰۳۸٪ بود. میزان تاثیر اسفنگوموناس‌ها روی پلی‌اتیلن تاکنون در هیچ مقاله‌ای گزارش نشده است، همچنین به تاثیر دلفتیا روی تجزیه پلی‌اتیلن در چندین مقاله اشاره شده [23, 13, 51] اما میزان این تاثیر به‌صورت عددی گزارش نشده است. به هر صورت در میان گونه‌های مختلف میکروبی تاثیر گونه‌های باسیلوس و سودوموناس در پروژه‌های زیست‌تخریب‌پذیری بیشتر بررسی شده است [37, 57, 58]. هاشوردهان و جها در سال ۲۰۱۳ کاهش وزن ۱/۵ تا ۱/۷۵٪ پلی‌اتیلن را طی ۳۰ روز به‌ترتیب توسط باسیلوس پومیلیس و باسیلوس ساتینلیس در شرایط آزمایشگاهی

Nicolet؛ ایالات متحده آمریکا) به کار رفت. چون گروه متیلن تنها گروه عاملی بود که طی روند تخریب دچار تغییر نمی‌شد، به‌عنوان عدد استاندارد برای محاسبه اندیس کربونیل به کار رفت [11, 16].

$$C.I. (Carbonyl Index) = A1714/A1435$$

بررسی تغییرات سطحی فیلم PE و تشکیل بیوفیلم توسط SEM

بیوفیلم تشکیل‌شده روی سطح پلاستیک و تغییرات سطح نمونه‌های پلاستیک بعد از زیست‌تخریب‌پذیری میکروبی با روش SEM مشاهده شد. نمونه به‌منظور بررسی سلول‌های میکروبی به روش هاشوردهان و جها در سال ۲۰۱۳ آماده‌سازی شدند [21]. به این صورت که فیلم‌های پلی‌اتیلنی پس از جداسازی از محیط کشت با بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH برابر ۷/۲) به‌منظور جداسازی سلول‌ها و محیط کشت اضافی شسته شدند. به‌منظور مشاهده بیوفیلم تشکیل‌شده نمونه‌های فیلم به همراه سلول‌های میکروبی چسبیده تثبیت شدند. به این منظور تمام نمونه‌ها در محلول ۲٪ گلوئوتارآلدهید به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و سپس دوبار به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۵۰٪، یک شبانه‌روز در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و در نهایت با اتانول ۱۰۰٪ سه مرتبه و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه شسته شدند تا نمونه‌ها آب‌گیری شوند. پس از آب‌گیری، نمونه‌ها در خلا خشک شده، روی استاب روی چسب دوطرفه قرار داده شدند و سپس توسط دستگاه پوشش‌دهنده اسپاتر مدل SC7620 به مدت ۱۲۰ ثانیه توسط طلا و پلاتین پوشش‌دهی شدند و سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی مدل LEO-1450 VP تحت ولتاژ ۲۰ کیلوولت با آشکارسازهای ثانویه (SE) و برگشتی (QBSD) در بزرگنمایی‌های ۵۰۰×، ۵۰۰۰×، ۲۰۰۰×، ۲۰۰۰۰× و ۵۰۰۰۰× تصویربرداری شدند.

ن تحلیل آماری نتایج

در آزمون‌هایی که نیاز به تحلیل آماری برای بررسی معنی‌داری نتایج وجود داشت، اعداد به‌دست‌آمده با کمک نرم‌افزار آماری R و با به‌کارگیری بسته stat به‌منظور بررسی معنی‌داری تاثیر متغیرها با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری بیش از ۹۵٪ تحلیل شدند. میانگین‌ها با به‌کارگیری آزمون t-test در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند [56].

یافته‌ها

مشاهدات چشمی، تغییرات دما و pH

مشاهدات چشمی در ارتباط با آزمون میکروبی در واکنش‌گاه‌های زیستی هوای ابتدا به‌صورت تغییر در شناوری قطعات دیده شد. در سه روز ابتدایی تحت تاثیر قرارگیری فیلم‌های LDPE با باکتری، به‌علت خاصیت شناوری، قطعات و ماهیت آب‌گریزی روی سطح محیط شناور بودند. طی این مدت قطعات پلاستیک به‌طور متناوب در شرایط اسپتیک به‌صورت دستی به داخل محیط هدایت می‌شدند. در پایان روز سوم مشاهده شد در واکنش‌گاه زیستی مربوط به باکتری اسفنگوباکتریوم مولتیپوروم IRN11 قطعات به داخل محیط کشیده شده و تمایل بیشتری به ماندن در محیط مایع داشتند. این پدیده در واکنش‌گاه زیستی مربوط به باکتری دلفتیا تسورواتنریس IRN27 در روزهای بعد اتفاق افتاد. تغییرات دمای گرمخانه‌گذاری در مدت سه ماه بین ۱۵ و ۲۳/۵°C بود. تغییرات pH نیز در نمودار ۱ مشاهده می‌شود. تغییرات pH از محدوده خنثی (۷) شروع شد و تا پایان ۹۰ روز برای هر دو گونه میکروبی دارای افزایش جزئی بود و به حدود ۷/۲۵ رسید (نمودار ۱).

شروع به ترشح ترکیبات مختلف نظیر آزنیمها و عوامل فعال سطحی و در نتیجه استفاده از TLDPE به عنوان منبع کربنی می‌کنند[34].

بر اساس شکل ۳ سلول‌های گونه IRN11 روی سطح TLDPE تشکیل توده بیوفیلم واقعی داده‌اند و در حالی که این سلول‌ها به هم تنیده شده‌اند و در بستری از مواد مترشحه قرار دارند (شکل ۳- C) و در برخی موارد باکتری و پلیمر در هم ادغام می‌شوند (شکل ۳- D). وجود تغییراتی نظیر سوراخ‌شدگی و لایه‌لایه شدن در اطراف سلول‌های چسبیده سطح مشاهده می‌شود (شکل ۳- A و B) که شاهدهی برای وقوع زیست‌تخریب‌پذیری تحت تاثیر تشکیل بیوفیلم میکروبی است. چسبیدن سلول‌های گونه IRN27 به گونه‌ای متفاوت دیده می‌شود به طوری که به نظر می‌رسد سلول‌ها آزادانه‌تر به سطح چسبیده‌اند و بستر حقیقی بیوفیلم آن چنان که برای گونه IRN27 مشاهده شد، دیده نمی‌شود. این تجمع طی فرآیند آماده‌سازی نمونه به منظور تصویربرداری به راحتی از سطح جدا شده است و نمایش سلولی به صورت ناپیوسته و پراکنده در سطح پلیمر دیده می‌شود (شکل ۴- A). اما به هر صورت اثرات سوراخ‌شدگی (شکل ۴- D) و ترک‌خوردگی (شکل ۴- A)، رشد سلول‌ها روی سطح به صورت اثر به‌جامانده از رشد سلولی (شکل ۴- B)، لایه‌ای شدن و شکستگی (شکل ۴- C) به چشم می‌خورد. مقایسه تصاویر به‌دست‌آمده از تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد اگرچه گونه IRN11 بهتر قادر به تشکیل بیوفیلم سطحی است اما تغییرات ناشی از رشد IRN27 در محیط روی TLDPE عمیق‌تر است.

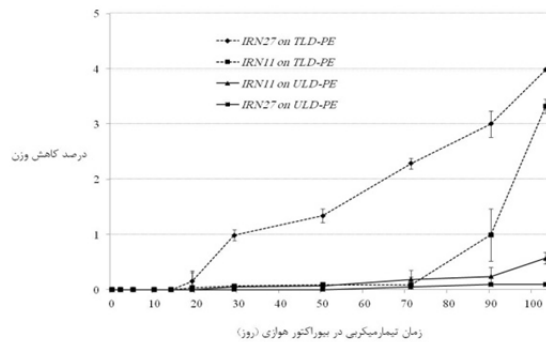
این نتایج با مقایسه کاهش وزن قطعات پلیمری TLDPE در هر دو گونه میکروبی تایید می‌شود، به طوری که کاهش وزن ناشی از گونه IRN27 با تفاوت معنی‌دار آماری از پلیمر تحت تاثیر گونه IRN11 بیشتر است.

کاهش وزن ناشی از رشد هر دو گونه نشان می‌دهد ضرورتاً فرآیند زیست‌تخریب‌پذیری توسط هر دو گونه رخ داده است و احتمالاً تفاوت در نوع تجمع میکروبی روی سطح به تفاوت در مکانیزم زیست‌تخریب‌پذیری دو گونه مربوط می‌شود. به بیان دیگر چسبیدن به سطح و تشکیل بیوفیلم به گفته بسیاری از محققین برای شروع تجزیه بیولوژیکی یکی از عوامل ضروری است [17, 31, 40]، اما تشکیل کلونی میکروبی ممکن است شرط کافی برای زیست‌تخریب‌پذیری نباشد و عواملی دیگر نظیر نوع آزنیم درگیر در زیست‌تخریب‌پذیری و مکانیزم زیست‌تخریب‌پذیری در اولویت تاثیر باشند، ضمن اینکه تشکیل بیوفیلم حقیقی فرآیندی زمان‌بر است.

کاواپی و همکاران در سال 2004 بیان کرده‌اند که دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی شامل لیپوپولی‌ساکاریدها برای اکثر آنها و اسفنگولیپیدها در برخی از گونه‌های خاص مثل اسفنگوموناس‌ها است که باعث می‌شود تمایل این دسته از باکتری برای چسبیدن به سطوح آب‌گریز مانند پلاستیک بیشتر باشد [43]. همچنین به نظر می‌رسد علت اصلی قدرت بالای IRN11 در تشکیل بیوفیلم تولید مقادیر بالای زیست‌سطح‌فعال‌های طبیعی توسط گونه‌های مختلف اسفنگوباکتریوم در محیط باشد [48] (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

جدول ۲ تغییر جزئی اندیس کربونیل موجود در نمونه‌های ULDPE را توسط گونه‌های مورد آزمون نشان می‌دهد. بر اساس جدول 2 گونه‌های میکروبی تغییر معنی‌داری در گروه‌های کربونیلی موجود در نمونه فیلم مرجع ایجاد نکرده‌اند اما به صورت معنی‌داری اندیس کربونیلی نمونه فیلم TLDPE را کاهش داده‌اند. این

گزارش کرده‌اند [21]. در گزارشی دیگر وامیلا و متئو کاهش ۹/۲۶٪ را توسط باسیلوس سانتیلیس در مدت ۳۰ روز روی پلی‌اتیلن پرداخت‌شده با تابش فرابنفش گزارش کرده‌اند [37]. اگرچه درصد تخریب فیلم پلی‌اتیلنی در شرایط نیمه‌صنعتی صورت‌گرفته در این پژوهش در مقایسه با پژوهش‌های پیشین انجام‌شده در شرایط آزمایشگاهی در برخی موارد بیشتر است؛ به هر صورت تفاوت در زمان گرمخانه‌گذاری، نوع و شدت پیش‌تیمار اعمال شده برای ایجاد حساسیت میکروبی و در نتیجه اندیس‌های کربونیلی متفاوت در نمونه پلیمری، نوع میکروارگانیزم به‌کاررفته در آزمون زیست‌تخریب‌پذیری و به‌دنبال آن روش‌های متابولیکی متفاوت تخریبی میکروبی‌ها و از همه مهم‌تر تفاوت در ساختار نمونه‌های پلیمری (زیست‌تخریب‌پذیر، پیش‌پرداخت‌شده، اکسا زیست‌تخریب‌پذیر) به‌کاررفته حتی در یک نوع خاص نظیر پلی‌اتیلن با وزن مولکولی‌های مختلف در پروژه‌های زیست‌تخریب‌پذیری پلاستیک‌های سنتزی تماماً در نتایج آزمون‌های زیست‌تخریب‌پذیری و درصد تخریب موثر بوده و مادامی که شرایط یکسانی در دو آزمون به کار نرفته باشد، مقایسه میزان تخریب نمونه‌های پلی‌اتیلنی با پروژه‌های مشابه را تقریباً ناممکن می‌سازد (نمودار ۲).



نمودار ۲ روند کاهش وزن قطعات پلی‌اتیلنی طی 100 روز تیمار میکروبی در واکنش‌گاه زیستی

تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی

شکل ۲ تصویر سطح فیلم پلی‌اتیلن با کم‌چگال را قبل و بعد از تیمار خورشیدی نشان می‌دهد. پس از تیمار نوری سطح به صورت جزئی دچار خوردگی و ترک‌خوردگی‌های ریز شده است (شکل ۲). مقایسه تاثیر تیمار میکروبی روی سطح پلیمر با مقایسه اشکال 4 با 5 و 6 حاصل می‌شود. تشکیل کلونی یا توده بیوفیلم نشان‌دهنده تمایل به آب‌گریزی و میل ترکیبی سلول برای اتصال با سطح LDPE است [19, 34]. تصاویر به‌دست‌آمده از عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی از چسبیدن سلول‌های میکروبی به سطح قطعات TLDPE در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است.

زمانی که جسم جامد در محیط آبی حاوی میکروب زنده قرار می‌گیرد، به صورت طبیعی روی سطح آن تشکیل بیوفیلم میکروبی تشکیل می‌شود و میزان این تجمع به میل ترکیبی سلول به سطح و آب‌گریزی سلول [19] یا میزان آب‌دوستی قطعات پلاستیکی در محیط (تولید گروه‌های کربونیلی و استری با تیمار) [20] بستگی دارد. آنچه در زیست‌تخریب‌پذیری اهمیت دارد تاثیر است که تجمع میکروبی روی سطح پلیمر دارد. سلول‌ها پس از چسبیدن به سطح در صورت عدم وجود منبع کربنی (قحطی کربن) دیگر در محیط، بر اساس قدرت استفاده و مکانیزم‌های موجود در سلول

جدول ۲) تغییرات گروه کربونیلی در نمونه‌های TLDPE و ULDPE پس از تیمار میکروبی

گروه	اندیس کربونیل قبل از تیمار میکروبی	اندیس کربونیل قبل از تیمار میکروبی
IRN27	۰/۰۲۸±۰/۰۰۱ ^{a*}	۰/۰۲۷±۰/۰۰۲ ^a
IRN11	۰/۰۲۸±۰/۰۰۳ ^a	۰/۰۲۷±۰/۰۰۱ ^a
IRN27	۰/۲۰۶±۰/۰۱۳ ^b	۰/۱۰۴±۰/۰۱۳ ^c
IRN11	۰/۲۰۶±۰/۰۱۳ ^b	۰/۰۹۸±۰/۰۰۴ ^c

حروف کوچک انگلیسی معنی‌داری تفاوت میان اعداد را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج به‌دست‌آمده از منحنی کاهش وزن، نشان می‌دهد تاثیر باکتری IRN27 در کاهش وزن TLDPE به‌صورت قابل توجهی از گونه IRN11 بالاتر است. همچنین مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری میزان pH و کاهش وزن پلیمر نشان می‌دهد، گونه تجزیه‌کننده موثرتر تغییرات جزئی اما بیشتری را در pH ایجاد کرده‌اند.

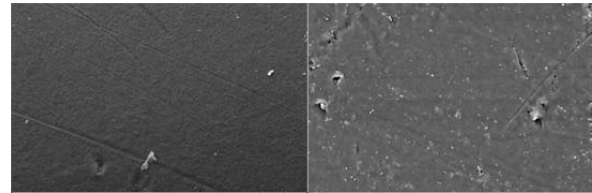
این نتایج در راستای نتایج به‌دست‌آمده از تصاویر حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی (IRN27) به‌صورت سلول‌های چسبیده پراکنده و جدا مشاهده شد) است که نشان می‌دهد سلول‌های گونه IRN27 پس از مراحل آماده‌سازی و تثبیت برای تصویربرداری کاملاً از سطح جدا شده‌اند و تجمع میکروبی این گونه تجمعی طبیعی حاصل از قرارگیری سطح جامد در محیط مایع حاوی میکروب است و ارتباطی با تشکیل بیوفیلم حقیقی ندارد. به هر صورت فرورفتگی‌های ناشی از رشد باکتری روی سطح پلی‌اتیلن ترشح مواد تجزیه‌کننده پلی‌اتیلن را طی رشد باکتری نشان می‌داد.

تمایل گونه IRN11 برای چسبیدن به سطح فیلم تیمار شده نشان می‌داد گروه‌های کربونیلی ایجاد شده پس از تیمار با تابش فرابنفش سطح پلیمر را آب‌دوست‌تر کرده‌اند که تمایل باکتری برای تشکیل بیوفیلم را بالا می‌برد. منحنی‌های کاهش وزن در این گونه نیز متفاوت از IRN27 بود و کاهش وزن در اواخر زمان تیمار میکروبی شدت گرفته است. این رویداد تخریب پلی‌اتیلن را در اثر تشکیل بیوفیلم میکروبی پیشنهاد می‌کند به‌طوری که پس از تشکیل بیوفیلم حقیقی که فرآیندی زمان‌بر است، کاهش وزن در نمونه فیلم آغاز شده است. تصاویر حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نیز نشان‌دهنده تنیدگی بیوفیلم میکروبی به سطح TLDPE است به‌طوری که پس از فرآیند تثبیت به‌منظور عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی همچنان روی سطح باقی مانده بود.

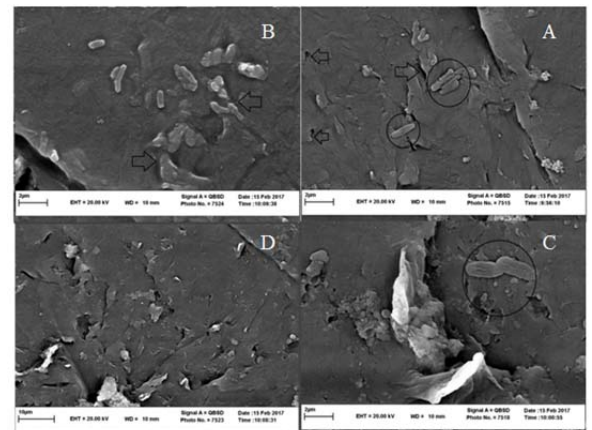
به‌طور کلی کنار هم قراردادن نتایج حاصل از تیمار LDPE توسط دو گونه فعال تخریب‌کننده LDPE (گونه IRN11 در زمینه تشکیل بیوفیلم و گونه IRN27 در زمینه کاهش وزن) در واکنش‌گاه‌های زیستی هوازی نشان می‌دهد گونه‌های مختلف میکروبی تخریب‌کننده LDPE رفتارها و مکانیزم‌های تخریبی متفاوتی برای تجزیه دارند و به این ترتیب می‌توان باکتری‌های موثر در کاهش وزن را به دو دسته گونه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم حقیقی و گونه‌های تجمع‌کننده روی سطح تقسیم نمود که ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و کاهش وزن فقط در دسته اول معنا می‌یابد. همچنین مکانیزم تخریب در باکتری‌های دو دسته متفاوت بوده و سینتیک تخریب متفاوتی دارند.

در سال‌های اخیر زیست‌تخریب‌پذیری، اضمحلال و توانایی میکروارگانیزم‌ها در استفاده از پلی‌اتیلن به‌عنوان منبع کربنی توسط

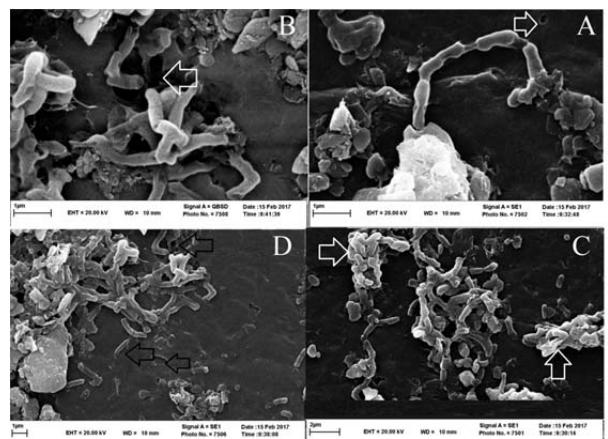
تغییرات برای هر دو گونه میکروبی IRN11 و IRN27 یکسان بود. نتایج به‌دست‌آمده در این آزمون در راستای نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مشابه بود. سودهاکار و همکاران پس از قراردادن نمونه‌های فیلم LDPE تیمار شده با حرارت در معرض گونه‌های مختلف باسیلوس بیان کرده‌اند که در معرض قراردادن طولانی‌مدت فیلم‌های دارای گروه‌های کربونیلی (ایجاد شده توسط حل اکسیژن محلول در محیط آبی طی تیمار حرارتی) با ارگانیزم‌ها منجر به کاهش طول موج گروه کربونیلی ایجاد شده به‌علت زیست‌تخریب‌پذیری (زیستی) از طریق مکانیزم نوریش یا تشکیل استرمی‌شود[31].



شکل ۲) تصویر سطح فیلم پلی‌اتیلن قبل (سمت راست) و بعد از پرداخت خورشیدی (سمت چپ؛ ×۲۰۰۰)



شکل ۳) تصاویر به‌دست‌آمده توسط میکروسکوپ الکترونی از سطح TLDPE پس از تاثیر گونه IRN11 در مدت سه ماه گرمخانه‌گذاری؛ (A) تکثیر باکتری روی سطح و ایجاد سوراخ‌شدگی (B، ×۵۰۰۰۰)، روزنه‌های عمیق ناشی از تاثیر باکتری (C، ×۵۰۰۰۰)، تشکیل تجمعات پرسول میکروبی در بستر بیوفیلم (D، ×۲۰۰۰۰)، ادغام باکتری و پلی‌اتیلن در اثر نفوذ باکتری (×۲۰۰۰۰)



شکل ۴) تصاویر به‌دست‌آمده از سطح TLDPE پرداخت شده با گونه IRN27 توسط اسکن با میکروسکوپ الکترونی پس از سه ماه گرمخانه‌گذاری (×۲۰۰۰۰)؛ (A) ترک‌های ایجاد شده در اثر رشد باکتری، (B) به‌جاماندن اثر رشد باکتری روی سطح، (C) لایه‌لایه شدن پلیمر در کنار سلول‌ها، (D) سوراخ‌شدگی سطح پلیمر

محمدباقر حبیبی نجفی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۵٪)؛ محبت محبی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ عبدالرسول ارومیه‌ای (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

منابع

- 1- PlasticsEurope, EPRO. Plastics - the facts 2016, an analysis of European plastics production, demand and waste data [Internet]. Brussels: PlasticEurope; 2016 [cited 2017 Jul 15]. Available from: <https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf>
- 2- Emadian SM, Onay TT, Demirel B. Biodegradation of bioplastics in natural environments. Waste Manag. 2017;59:526-36.
- 3- Bergmann M, Gutow L, Klages M, editors. Marine anthropogenic litter. Cham: Springer; 2015. pp. 117-40.
- 4- Gourmelon G. Global plastic production rises, recycling lags [Internet]. Washington DC: Worldwatch Institute; 2015 [cited 2017 Jul 15]. Available from: <http://www.worldwatch.org/global-plastic-production-rises-recycling-lags-0>
- 5- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnol Adv. 2008;26(3):246-65.
- 6- Ojeda T, Freitas A, Dalmolin E, Dal Pizzol M, Vignol L, Melnik J, et al. Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable foamed polystyrene. Polym Degrad Stab. 2009;94(12):2128-33.
- 7- Arutchelvi J, Joseph C, Doble M. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. Biochem Eng J. 2011;56(1-2):37-45.
- 8- Jeon HJ, Kim MN. Degradation of linear low density polyethylene (LLDPE) exposed to UV-irradiation. Eur Polym J. 2014;52:146-53.
- 9- BA Hons AS. Why we need to be clear about biodegradables and compostables [Internet]. Bude: Ei8htdesign; 2018 [cited 2018 Feb 20]. Available from: <http://www.ei8htdesign.net/new-blog-avenue/>
- 10- Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of Plastics. Int J Mol Sci. 2009;10(9):3722-42.
- 11- Albertsson AC, Anderson SO, Karlsson S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. Polym Degrad Stab. 1987;18(1):73-87.
- 12- Otake Y, Kobayashi T, Asabe H, Murakami N, Ono K. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. J Appl Polym Sci. 1995;56(13):1789-96.
- 13- Peixoto J, Silva LP, Krüger RH. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. J Hazard Mater. 2017;324(Pt B):634-44.
- 14- Usha R, Sangeetha T, Palaniswamy M. Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. Libyan Agric Res Cent J Int. 2011;2(4):200-4.
- 15- Abrusci C, Pablos JL, Corrales T, López-Marín J, Marín I, Catalina F. Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives. Int Biodeterior Biodegrad. 2011;65(3):451-9.

بسیاری از محققین به اثبات رسیده است و محققان مسیره‌های متابولیکی متفاوتی را برای تخریب زیستی پلی‌اتیلن پیشنهاد کرده‌اند. اما آنزیم‌های درگیر در این زیست‌تخریب‌پذیری و مسیره‌های متابولیکی درگیر در تخریب بیولوژیکی پیچیده پلی‌اتیلن همچنان ناشناخته باقی مانده است^[59]. به هر صورت به نظر می‌رسد زیست‌تخریب‌پذیری واقعی زمانی رخ می‌دهد که میکروارگانیسم بتواند علاوه بر مصرف ترکیباتی با قابلیت در دسترس در ساختار پلی‌اتیلن (شامل الیگومرها، زنجیره‌های کوتاه کربن و افزودنی‌ها)، زنجیره کربنی بلند زنجیره اصلی را تحت تاثیر آنزیم‌های مختلف نظیر آنزیم‌های اکسیدکننده قرار داده و ساختار آن را بشکند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به توانایی استفاده میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه از بیش از یک منبع کربنی اشاره نمود و این امر مستلزم حصول اطمینان از عدم وجود ترکیبات افزودنی مانند پلاستیسایزرها در ترکیب پلاستیک مورد مطالعه است چون ترکیباتی مانند گلیسرول که برای افزایش قابلیت انعطاف به پلاستیک افزوده می‌شود در صورت حضور در ترکیب پلاستیک و مصرف شدن آن به‌عنوان منبع کربن توسط میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌تواند نتایج تحقیق را کاملاً مخدوش و غیرقابل قبول کند.

با توجه به اثبات روش‌های متابولیکی متفاوت به‌کاررفته توسط گونه‌های مورد استفاده در تجزیه پلیمرهای پلی‌اتیلنی، کاربرد هم‌زمان گونه‌های موثر به‌صورت کنسرسیوم میکروبی به‌منظور بالابردن راندمان تخریب‌پذیری پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

افزایش روزافزون مطالعات و پژوهش‌های علمی در زمینه تجزیه پلاستیک‌های سنتزی توسط میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد تجزیه بیولوژیکی پلاستیک‌های سنتزی در حال حاضر یکی از مقرون‌به‌صرفه‌ترین و بی‌خطرترین روش‌های برگرداندن پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌ناپذیر به محیط زیست در مقایسه با روش‌های شیمیایی و فیزیکی مورد استفاده است^[18, 39]. همچنین تخریب غیرمیکروبی توسط تابش طبیعی نور خورشید در کشورهایی با زاویه تابش تقریباً عمود مانند ایران می‌تواند در ترکیب با تیمار میکروبی به‌منظور تخریب طبیعی ضایعات پلی‌اتیلنی به کار رود. نیاز به قابلیت اجرای تخریب میکروبی ضایعات پلی‌اتیلنی در شرایط واقعی به‌منظور حل مشکل تجمع ضایعات پلاستیکی و خصوصاً پلی‌اتیلنی احساس می‌شود. در حالی که این اولین گزارش از تاثیر دو گونه میکروبی اسفنکوباکتریوم و دلفتیا روی پلی‌اتیلن در واکنش‌گاه‌های زیستی است نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد کاربرد دیگر باکتری‌های موثر در تجزیه دور از دسترس نبوده و اجرای روش‌های تخریب طبیعی ضایعات پلاستیکی در شرایط واقعی با بررسی بیشتر و بهینه‌سازی شرایط قابل اجرا است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند، هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا منتظر (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۵٪)؛

- polyethylene. *Polym Degrad Stab.* 2003;81(3):441-52.
- 34- Mor R, Sivan A. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: Biodegradation of polystyrene. *Biodegradation.* 2008;19(6):851-8.
- 35- Fontanella S, Bonhomme S, Koutny M, Husarova L, Brusson JM, Courdavault JP, et al. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polym Degrad Stab.* 2010;95(6):1011-21.
- 36- Kyaw BM, Champakalakshmi R, Sakharkar MK, Lim CS, Sakharkar KR. Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian J Microbiol.* 2012;52(3):411-9.
- 37- Vimala PP, Mathew L. Biodegradation of Polyethylene using *Bacillus subtilis*. *Procedia Technol.* 2016;24:232-9.
- 38- Jeyakumar D, Chirsteen J, Doble M. Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes. *Bioresour Technol.* 2013;148:78-85.
- 39- Nanda S, Sahu SS. Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcus* spp. *N Y Sci J.* 2010;3(7):95-8.
- 40- Hadad D, Geresh S, Sivan A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *J Appl Microbiol.* 2005;98(5):1093-100.
- 41- Marqués-Calvo MS, Cerdà-Cuéllar M, Kint DPR, Bou JJ, Muñoz-Guerra S. Enzymatic and microbial biodegradability of poly(ethylene terephthalate) copolymers containing nitrated units. *Polym Degrad Stab.* 2006;91(4):663-71.
- 42- Santo M, Weitsman R, Sivan A. The role of the copper-binding enzyme - laccase - in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013;84:204-10.
- 43- Kawai F, Watanabe M, Shibata M, Yokoyama Sh, Sudate Y, Hayashi Sh. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi. *Polym Degrad Stab.* 2004;86(1):105-14.
- 44- Watanabe M, Kawai F, Shibata M, Yokoyama Sh, Sudate Y. Computational method for analysis of polyethylene biodegradation. *J Comput Appl Math.* 2003;161(1):133-44.
- 45- Muenmee S, Chiemchaisri W, Chiemchaisri C. Enhancement of biodegradation of plastic wastes via methane oxidation in semi-aerobic landfill. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2016;113:244-55.
- 46- Yabuuchi E, Kaneko T, Yano I, Wayne Moss C, Miyoshi N. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: Glucose-nonfermenting gram-negative rods in CDC groups I1K-2 and I1b. *Int J Syst Evolut Microbiol.* 1983;33(3):580-98.
- 47- Amir-Al Haque N. *Sphingobacterium multivorum* [Internet]. Gambier OH: MicrobeWiki; 2016 [cited 2017 Nov 5]. Available from: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sphingobacterium_multivorum
- 48- Noparat P, Maneerat S, Saimmai A. Application of biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the biodegradation of used lubricating oil. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(8):3949-63.
- 49- Kawai F, Shibata M, Yokoyama S, Maeda S, Tada K, 16- Abrusci C, Pablos JL, Marín I, Espí E, Corrales T, Catalina F. Comparative effect of metal stearates as pro-oxidant additives on bacterial biodegradation of thermal- and photo-degraded low density polyethylene mulching films. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013;83:25-32.
- 17- Das MP, Kumar S. An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *3 Biotech.* 2015;5(1):81-6.
- 18- Sahebznazar Z, Shojaosadati SA, Mohammad Taheri M, Nosrati, M. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Manag.* 2010;30(3):396-401.
- 19- Das MP, Kumar S. Influence of cell surface hydrophobicity in colonization and biofilm formation on LDPE biodegradation. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013;5(4):690-4.
- 20- Sudhakar M, Doble M, Sriyutha Murthy P, Venkatesan R. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2008;61(3):203-13.
- 21- Harshvardhan K, Jha B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Mar Pollut Bull.* 2013;77(1-2):100-6.
- 22- Paço A, Duarte K, Da Costa JP, Santos PSM, Pereira R, Pereira ME, et al. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Sci Total Environ.* 2017;586:10-15.
- 23- Yoon MG, Jeon JH, Kim MN. Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell. *J Bioremediat Biodegrad.* 2012;3(4):1000144.
- 24- Jeon HJ, Kim MN. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015;103:141-6.
- 25- El-Shafei HA, Abd El-Nasser NH, Kansoh AL, Ali AM. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi *Streptomyces* species. *Polym Degrad Stab.* 1998;62(2):361-5.
- 26- Yang J, Yang Y, Wu WM, Zhao J, Jiang L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environ Sci Technol.* 2014;48(23):13776-84.
- 27- Albertsson AC, Karlsson S. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Prog Polym Sci.* 1990;15(2):177-92.
- 28- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyama Y, Saiganji A, Tani Y. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym Degrad Stab.* 2001;72(2):323-7.
- 29- Yashchuk O, Portillo FS, Hermida EB. Degradation of polyethylene film samples containing oxo-degradable additives. *Procedia Mater Sci.* 2012;1:439-45.
- 30- Hasan F, Shah AA, Hameed A, Ahmed S. Synergistic effect of photo and chemical treatment on the rate of biodegradation of low density polyethylene by *Fusarium* sp. AF4. *J Appl Polym Sci.* 2007;105(3):1466-70.
- 31- Arutchelvi J, Sudhakar M, Arkatkar A, Doble M, Bhaduri S, Uppara PV. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian J Biotechnol.* 2008;7:9-22.
- 32- Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3722-42.
- 33- Bonhomme S, Cuer A, Delort AM, Lemaire J, Sancelme M, Scott G. Environmental biodegradation of

- Haris MRH, Sudesh K. Identification of new rubber-degrading bacterial strains from aged latex. *Polym Degrad Stab.* 2014;109:354-61.
- 55- Arkatkar A, Arutchelvi J, Bhaduri S, Uppara PV, Doble M. Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2009;63(1):106-11.
- 56- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2018 [cited 2018 Feb 20]. Available from: <https://www.gbif.org/en/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>
- 57- Kathiresan K. Polythene and plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Revista de Biología Tropical.* 2003;51(3-4):629-33.
- 58- Priyanka N, Archana T. Biodegradability of polythene and plastic by the help of microorganism: A way for brighter future. *J Environ Anal Toxicol.* 2011;1(4):1000111.
- 59- Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR. Microbial degradation and deterioration of polyethylene - a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2014;88:83-90.
- Hayashi S. Biodegradability of Scott-Gelead photodegradable polyethylene and polyethylene wax by microorganisms. *Macromol Symp.* 1999;144(1):73-84.
- 50- Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Numaguchi M, Morimura S, Kida K. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(Pt 5):1479-83.
- 51- Koutny M, Amato P, Muchova M, Ruzicka J, Delort AM. Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2009;63(3):354-7.
- 52- Sawadogo A, Harmonie OC, Sawadogo JB, Kaboré A, Traoré AS, Dianou D. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Environ Prot.* 2014;5(12):1183-96.
- 53- Parmila R, Ramesh KV. Potential biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by *Acinetobacter bumannii*. *Afr J Bacteriol Res.* 2015;7:24-8.
- 54- Chia KH, Nanthini J, Thottathil GP, Najimudin N, Mas