



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,
Oromieyee A.R.² PhD

How to cite this article

Montazer Z, Habibi-Najafi M.B, Mohebbi M, Oromieyee 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 راکتورهای 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 به مدت یک ماه در معرض تابش خورشید و سپس به مدت صد روز در واکنش‌گاه‌های زیستی هوازی تحت تأثیر دو گونه میکروبی /سفن‌گلوپاکتریوم 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 تأثیر دو باکتری به ترتیب $3/31 \pm 0/013\%$ و $3/98 \pm 0/025\%$ 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 به‌طوری که 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 به‌طوری که 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 تسوجی و همکاران در سال ۱۹۸۰ بیان شد [10].

در اولین آزمون‌های زیست‌تخریب‌پذیری، دانشمندان تلاش کردند تأثیر 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 تأثیر تیمار با اشعه فرابنفش یا مواد اکسیدکننده و حرارت قرار می‌گیرد [11, 15, 27-29]. در برخی تحقیقات میزان تأثیر هر کدام از روش‌های پیش‌تیمار، جداگانه یا همزمان مورد بررسی قرار گرفته و نیاز به تأثیر 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 گرانروی ذاتی 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

اسفنگوپاکتریوم مولتیوروم: باکتری میله ای شکل بدون تحرک و بدون تولید اسپور، گرم منفی (رنگ صورتی- قرمز) با دیواره پیتیدوگلیکانی نازک، با دمای بهینه رشد $28-26^{\circ}\text{C}$ و دارای متابولیسم هوازی و تولیدکننده مقادیر فراوان اسفنگولیپید (یک زیست سطح فعال 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 رنگ های مصنوعی در فاضلاب استفاده می شود. به علت نوظهور بودن این باکتری به آزمون های دیگری به منظور تعیین ویژگی ها نیاز است [46, 47]. به قدرت تجزیه کنندگی پلی اتیلن و برخی روغن های روان کننده توسط اسفنگوموناس ها در برخی مقالات اشاره شده است [48, 49]. گونه مورد استفاده در این پژوهش اسفنگوپاکتریوم مولتیوروم IRN11 است که باعث ایجاد تغییرات ظاهری محسوس در سطح فیلم پلی اتیلن شامل دانه دانه شدن، کدر شدن و چروکیدگی بود.

دلفتیا تسوروها تنزیس: باکتری میله ای 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 تجزیه کنندگی پلی اتیلن بدون پیش پرداخت) [11, 13] دارای قدرت تجزیه محدود گسترده ای از مواد است. همچنین به تجزیه کنندگی دلفتیا اسیدوورانس روی پلی اتیلن توسط کوتنی و همکاران اشاره شده است [51]. گونه شناسایی شده آن در این پژوهش دلفتیا تسوروها تنزیس IRN27 است.

با توجه به ویژگی های عنوان شده شرایط بهینه فرآیند زیست تخریب پذیری شامل کاربرد محدوده دمایی $29-27^{\circ}\text{C}$ ، محدوده pH متعادل و استفاده از ترکیباتی با پایه شیمیایی مشابه پلی اتیلن در محیط (هیدوکربن های خطی کوتاه زنجیر) به عنوان آغازگر فرآیند است. همچنین کاربرد ترکیبات زیست سطح فعال (شامل توئین ها و EDTA) در محیط با بهبود فرآیند اتصال میکروب به سطح پلیمر و کاهش کشش سطحی می تواند تاثیرگذار باشد [34].

ب) فیلم پلی اتیلنی کم چگال (LDPE)

فیلم LDPE از گرانول های پلی اتیلنی گونه Polarian LF0200 براساس مشخصات شرکت سازنده (جدول ۱) بدون هیچ گونه افزودنی خاص با ضخامت متوسط 10 میکرومتر تهیه شد.

جدول ۱) مشخصات گرانول پلی اتیلن گونه Polarian LF0200			
خصوصیت	واحد	روش اندازه گیری	مقدار
شاخص جریان مذاب (۱۹۰°C/۲/۱۶Kg)	گرم/10 دقیقه	ASTM D-1238	7/1-3/2
دانسیته	گرم/میلی لیتر	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
شیشه ای شدن در ۶۰°C	gu	ASTM D-523	60 دقیقه

ج) محیط کشت

از محیط کشت پایه نمک های حداقلی به منظور غوطه وری فیلم های LDPE به عنوان منبع منحصربه فرد کربن در محیط استفاده شد. روش تهیه این محیط براساس روش های به کاررفته توسط سایر محققان با اندکی تغییر [52-54] و در محیط در هر لیتر شامل دی پتاسیم فسفات 5 گرم، مونوسدیم فسفات 2 گرم، آمونیوم سولفات 4 گرم، منیزیم سولفات ۷ آب 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 گروه های عاملی می شود. در سال های اخیر عملکرد برخی آنزیم های خارج سلولی اکسیدکننده میکربی در شروع اکسیداسیون زنجیره پلیمری و شروع تخریب پلاستیک های سنتزی اثبات شده است [42]؛ اما در اکثر پژوهش ها برای مطالعه زیست تخریب پذیری از اکسیداسیون غیرمیکربی نظیر استفاده از اشعه فرابنفش (فوتوکسیداسیون) به عنوان مرحله غیرقابل اجتناب برای شروع فرآیند بیولوژیکی و برای شکسته شدن ابتدایی استفاده می شود [16, 27]؛ با شکستن باندهای موادی با وزن مولکولی کم که به اندازه کافی برای عبور از غشای نیمه تراوای خارجی باکتری ها کوچک هستند، تولید می شوند و افزایش سطح قابل دسترس به علت شکسته شدن افزایش می یابد. در این مکانیزم ابتدا تابش فرابنفش توسط زنجیره پلیمری جذب می شود که منجر به تشکیل رادیکال خواهد شد. اکسیژن جذب رادیکال شده و هیدروپراکسیدها تشکیل می شوند. محصول نهایی گروه های کربونیلی مختلف هستند که آب دوستی پلیمر را افزایش و کریستاله بودن پلیمر را نیز کاهش می دهند [11]. پس از شکسته شدن زنجیره طولانی به زنجیره های کوتاه تر خطی (n- آلکان ها)، میکروارگانیزم و آنزیم های مترشحه راحت تر می توانند به پلیمرها حمله کنند. n- آلکان ها در مراحل بعدی اکسیداسیون به آلدهید و کتون و سپس اسید تبدیل می شوند. n- آلکان های کربوکسیله شده مشابه اسیدهای چرب هستند و بنابراین از طریق چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TGA) و مسیر بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب تا رسیدن به دو کربن (استیک اسید) پیروی می کنند [23, 43, 44].

اگرچه با گذشت زمان مانده پلاستیک در طبیعت و تغییر فیزیولوژی میکروبی به سمت مصرف مواد پلاستیکی و همچنین ایزولاسیون گونه های قوی تر تجزیه کننده امید برای تجزیه میکروبی به عنوان روش قابل اجرا افزایش یافته و مستند شده است؛ اما تحقیقات کمی در ارتباط با زیست تخریب پذیری پلاستیک ها در محیط های واقعی (که به زیست تخریب پذیری ضایعات پلاستیکی در خاک پرداخته اند) [18, 45] و با کاربرد پیش تیمارهای 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 زیست تخریب پذیری فیلم های پلی اتیلنی پرداخت شده با تابش طبیعی نور خورشید در شرایط نیمه صنعتی در محیط آبی توسط دو جدایه میکروبی تجزیه کننده است که به منظور بررسی زیست تخریب پذیری میکروبی ضایعات پلاستیکی در شرایط غیرآزمایشگاهی و بررسی قابلیت کاربرد روش در محیط واقعی انجام شده است.

مواد و روش ها

الف) سویه های میکروبی

سویه های میکروبی به کاررفته شامل جدایه های قوی تجزیه کننده پلی اتیلن و به دست آمده از محل دفن پسماندهای پلاستیکی مشهد اسفنگوپاکتریوم مولتیوروم IRN11 (شماره دسترسی: MF348188) و دلفتیا تسوروها تنزیس IRN27 (شماره دسترسی: MF348184) بودند که با روش های وابسته به کشت از خاک جداسازی شده و پس از استخراج و تخلیص DNA، قطعه ژن 16sDNA در آنها با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر و سپس تعیین توالی و شناسایی شدند. ماهیت باکتری ها به شرح زیر است؛

عناصر نادر یک میلی لیتر (حاوی 1/0 گرم از نمک های آهن (II) سولفات ۷آبه، مس (II) سولفات و کلرید روی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) و توئین 80 یک میلی لیتر بود.

روش پژوهش

الف) پیش تیمار فیلم های پلی اتیلنی کم چگال با استفاده از تابش خورشید

از آنجایی که تاثیر فعال سازی گروه های عاملی در شروع تجزیه باکتریایی به اثبات رسیده است، کاربرد پیش تیماری نظیر تابش فرابنفش به علت کاربردی بودن آن در محیط های واقعی (درون تنی) به صورت تابش نور خورشید، هزینه کمتر، اثر بیشتر نسبت به روش های حرارتی (غیر از گرمخانه گذاری با باکتری های ترموفیل در دمای ۷۰°C) و پاک بودن روش نسبت به کاربرد مواد اکسید کننده و حرارت انتخاب شد [16, 31, 35, 55].

فیلم های LDPE در معرض نور خورشید در ماه تیر با زاویه تابش متغیر تا رسیدن به اندیس کربونیل ۰/۲ در موقعیت عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۴۴ دقیقه (شمال) و عرض جغرافیایی ۶۰ درجه و ۴۷ دقیقه (شرق) قرار گرفتند. قطعات فیلم پلی اتیلن در دو شکل دایره به قطر 26 میلی متر (TLDPE) و مربع با قطر 22 میلی متر با اندیس کربونیل صفر (ULDPE) به عنوان نمونه شاهد و مرجع به منظور بررسی تاثیر میکروبی بر کاهش وزن و تغییر ساختار شیمیایی نمونه های پرداخت شده با آفتاب، سترون شده و پس از آماده سازی به روش آرک تکار و همکاران 2009 به محیط اضافه شدند. به این منظور کلیه قطعات به مدت 4 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲٪ در دمای ۵۰°C به منظور حذف باکتری های چسبیده احتمالی قرار گرفتند و پس از شست و شوی کامل با آب مقطر به مدت 30 دقیقه برای سترون سازی در اتانول قرار داده شدند. این قطعات پس از استخراج از اتانول در ظروف پتری از قبل سترون شده تا زمان تبخیر کامل اتانول و خشک شدن قرار گرفتند و وزن شدند [55].

ب) آماده سازی واکنش گاه زیستی

دو عدد واکنش گاه زیستی شیشه ای مکعب مربع به طول 45 سانتی متر از جنس شیشه، مجهز به محل نمونه برداری، سامانه کنترل دمای بیشینه و کمینه و همزن از جنس فولاد ضد زنگ با سرعت چرخش قابل تنظیم طراحی و ساخته شدند. تصویر این واکنش گاه ها در شکل ۱ نمایش داده شده است. کلیه قطعات واکنش گاه تحت تابش فرابنفش (به مدت 12 ساعت) قرار گرفتند. سپس فرمانتورها با آب تا میزان مورد نیاز پر شده (25 لیتر به ازای هر فرمانتور) و کل دو مجموعه توسط گاز اوزن (سرعت جریان 450 میلی گرم 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 به عنوان منبع کربنی با پایه نفتی و 50ppm -n- هگزادکان با ساختاری مشابه پلی اتیلن به صورت سترون به عنوان استارترهای شروع رشد به ازای هر فرمانتور به آن افزوده شد. سرعت چرخش همزن 30 دور در دقیقه تنظیم و سپس قطعات فیلم پلی اتیلن با آنها اضافه شدند (شکل ۱).

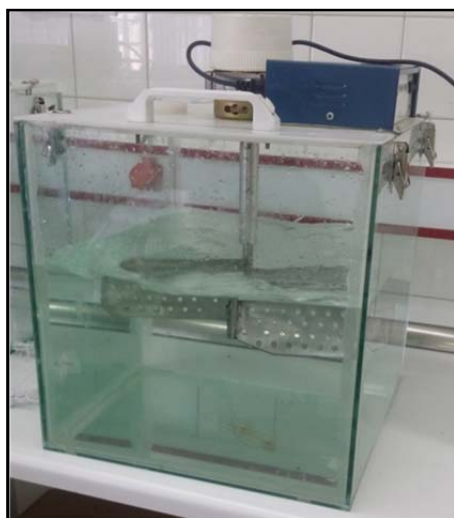
ج) تایید سترون بودن فرمانتور و آزمون زیست تخریب پذیری

نتایج منفی حاصل از کشت محتویات داخل فرمانتور، سترون بودن محیط را تایید نمود. سپس فرمانتورها به مدت یک روز به منظور پایش شرایط و کنترل دما بدون تلقیح روشن شدند. دو گونه میکروبی مورد نظر در محیط کشت های براث مغذی و نمک های حداقلی حاوی پلی اتیلن برای فعال سازی تلقیح شدند و پس از

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 ۱/۵×۱۰^۸ cfu/ml) به آن تلقیح گردد. تغییرات دما و pH به مدت ۱۰۰ روز برای کنترل شرایط بهینه واکنش گاه های زیستی و پایش تغییرات احتمالی pH در اثر تخریب، اندازه گیری 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 باقی ماندن شرایط اسپتیک، به طور متناوب از محیط واکنش گاه زیستی کشت میکروبی صورت گرفت. علاوه بر اینها آزمون هایی روی قطعات پلاستیک انجام و رشد میکروبی به شرح زیر طی این مدت پایش شد.

د) اندازه گیری افت وزن پلیمر

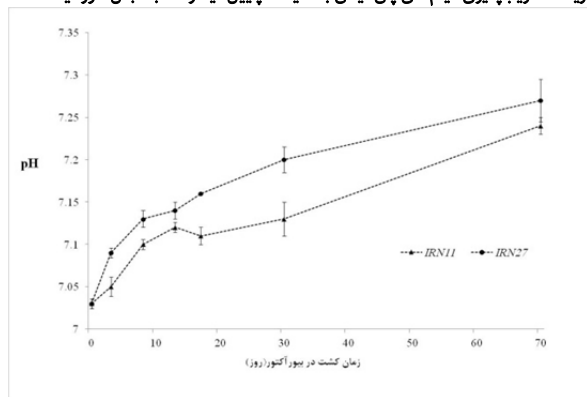
فیلم های پلی اتیلن در فواصل زمانی ۳ روزه و در سه تکرار از محیط کشت جدا، شسته شده و به مدت 4 ساعت در محلول SDS 2٪ در دمای ۵۰°C به منظور حذف باکتری های چسبیده احتمالی قرار گرفتند و پس از شست و شوی کامل با آب مقطر به مدت 30 دقیقه برای سترون سازی در اتانول قرار داده شدند. این قطعات پس از استخراج از اتانول در ظروف پتری از قبل سترون شده قرار گرفتند و پس از تبخیر کامل اتانول و خشک شدن در آن ۶۰°C وزن شدند [55].



شکل ۱) واکنش گاه هواری مورد استفاده در بررسی زیست تخریب پذیری فیلم های پلی اتیلن کم چگال

بررسی تغییرات ساختار مولکولی با FT-IR

طیف سنجی مادون قرمز برای بررسی گروه های عاملی کربونیل و متیلن حاضر در ترکیب پلیمر به کار رفت. پس از تخریب میکروبی، به وجود آمدن یا از بین رفتن گروه های 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 cm⁻¹ بود؛ زیرا افزایش شاخص کربونیل پس از پیش تیمار با نور آفتاب نشان دهنده تولید گروه های عاملی کربونیلی و کاهش شاخص کربونیل نشان دهنده تجزیه میکروبی پلیمر است. شاخص کربونیل برابر است با نسبت جذب گروه های کربونیل در گروه کربوکسیلی (-COO-) در طول موج 1714 cm⁻¹ به جذب گروه های متیلن (-CH₂-) (در طول موج 1435 cm⁻¹ (طول موج برش متیلن) که برای بیان مقدار غلظت ترکیبات کربونیلی توسط طیف سنجی مادون قرمز (Thermo AVATAR 370) دستگاه طیف سنج مادون قرمز مدل



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 فسینس 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 آنزیم‌های 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 ULDPE 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±۰/۰۹۸٪ 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 سابتیلیس 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 پلی‌اتیلن 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٪ گلوآلدهید 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 ۲۰ 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×، ۵۰۰×، ۲۰۰۰×، ۲۰۰۰× و ۵۰۰۰× تصویربرداری شدند.

ن تحلیل آماری نتایج

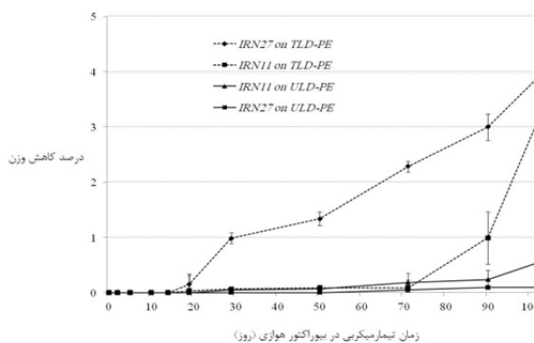
در آزمون‌هایی که نیاز به تحلیل آماری برای بررسی معنی‌داری نتایج وجود داشت، اعداد به‌دست‌آمده با کمک نرم‌افزار آماری R و با به‌کارگیری بسته stat به‌منظور بررسی معنی‌داری تاثیر متغیرها با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری بیش از ۹۵٪ تحلیل شدند. میانگین‌ها با به‌کارگیری آزمون t-test در سطح احتمال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

یافته‌ها

مشاهدات چشمی، تغییرات دما و pH

مشاهدات چشمی در ارتباط با آزمون میکروبی در واکنش‌گاه‌های زیستی هوازی 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 مولتی‌روم 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 تسوروها تنریس 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).

گزارش کرده‌اند^[21]. در گزارشی دیگر وامیلا و متئو کاهش ۹/۲۶٪ را توسط باسیلوس سابیتلیس 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 میکروارگانیسم به‌کاررفته در آزمون زیست‌تخریب‌پذیری و به‌دنبال آن روش‌های متابولیکی متفاوت تخریبی میکروب‌ها 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 ۱۰۰ 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 به‌صورت 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، به‌صورت 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 تاثیری 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، براساس قدرت استفاده و مکانیزم‌های موجود در سلول

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

براساس 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 لایه‌لایه‌شدن در اطراف سلول‌های چسبیده سطح مشاهده می‌شود (شکل ۳- A و B) که شاهدی برای وقوع زیست‌تخریب‌پذیری تحت تاثیر تشکیل بیوفیلم میکروبی است. چسبیدن سلول‌های گونه IRN27 به گونه‌ای متفاوت دیده می‌شود به‌طوری 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 به‌منظور تصویربرداری به‌راحتی از سطح جدا شده است و نمایش سلولی به‌صورت 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 به‌صورت اثر به‌جامانده از رشد سلولی (شکل ۴- B)، لایه‌ای‌شدن 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، به‌طوری 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 آنزیم درگیر در زیست‌تخریب‌پذیری و مکانیزم زیست‌تخریب‌پذیری در اولویت تاثیر باشند، ضمن اینکه تشکیل بیوفیلم حقیقی فرآیندی زمان‌بر است.

کاواچی و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان کرده‌اند که دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی شامل لیپوپلی‌ساکاریدها 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. براساس جدول 2 گونه‌های میکروبی تغییر معنی‌داری در گروه‌های کربونیلی موجود در نمونه فیلم مرجع ایجاد نکرده‌اند اما به‌صورت معنی‌داری اندیس کربونیلی نمونه فیلم TLDPE را کاهش داده‌اند. این

گونه	اندیس کربونیل قبل از تیمار میکروبی	اندیس کربونیل قبل از تیمار میکروبی
IRN27	0.027 ± 0.003^a	0.028 ± 0.001^a
IRN11	0.027 ± 0.003^a	0.028 ± 0.003^a
IRN27	0.043 ± 0.013^c	0.026 ± 0.013^b
IRN11	0.048 ± 0.004^c	0.026 ± 0.013^b

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.

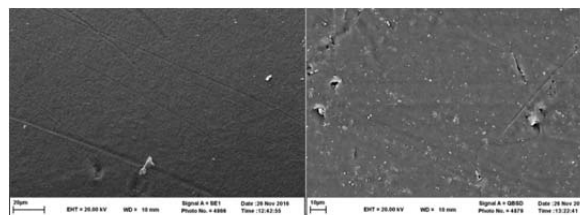
این نتایج در راستای نتایج به‌دست‌آمده از تصاویر حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی (IRN27) به‌صورت سلول‌های چسبیده پراکنده و جدا مشاهده شد) است که نشان می‌دهد سلول‌های گونه IRN27 پس از مراحل آماده‌سازی و تثبیت برای تصویربرداری کاملاً از سطح جدا شده‌اند و تجمع میکروبی این گونه تجمعی طبیعی حاصل 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.

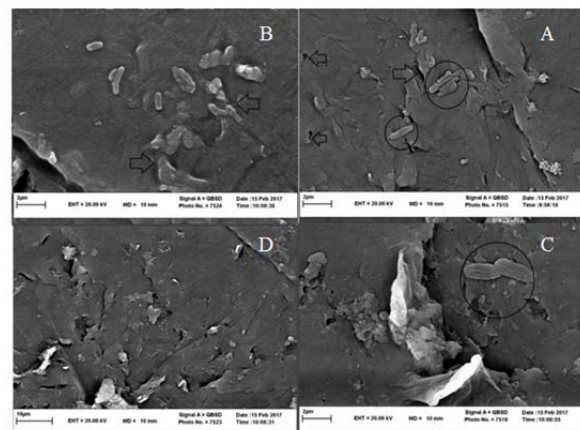
به‌طور کلی کنار هم قراردادن نتایج حاصل از تیمار LDPE توسط دو گونه فعال تخریب‌کننده LDPE (گونه IRN11 در زمینه تشکیل بیوفیلم و گونه IRN27 در زمینه کاهش وزن) در واکنش‌گاه‌های زیستی هوازی نشان می‌دهد گونه‌های مختلف میکروبی تخریب‌کننده LDPE رفتارها و مکانیزم‌های تخریبی متفاوتی برای تجزیه دارند و به این ترتیب 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 میکروارگانیسم‌ها در استفاده از پلی‌اتیلن به‌عنوان منبع کربنی توسط

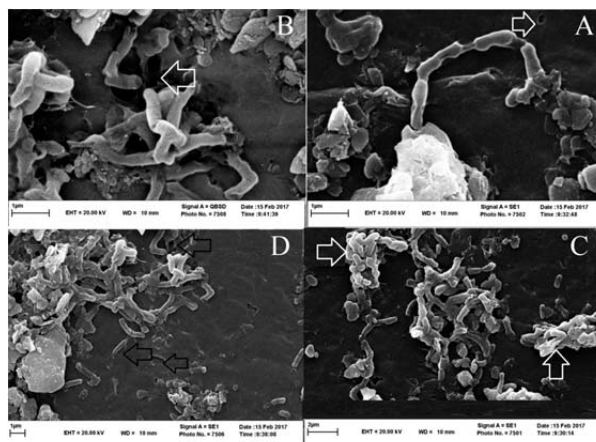
تغییرات برای هر دو گونه میکروبی IRN11 و IRN27 یکسان بود. نتایج به‌دست‌آمده در این آزمون در راستای نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مشابه بود. سودهاکار و همکاران پس از قراردادن نمونه‌های فیلم LDPE تیمار شده با حرارت در معرض گونه‌های مختلف باسیلوس بیان کرده‌اند که در معرض قراردادن طولانی‌مدت فیلم‌های دارای 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 استر می‌شود[31].



شکل ۲) تصویر سطح فیلم پلی‌اتیلنی قبل (سمت راست) و بعد از پرداخت خورشیدی (سمت چپ؛ $\times 2000$)



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 ($\times 5000$)، (B) روزنه‌های عمیق ناشی از تاثیر باکتری ($\times 5000$)، (C) تشکیل تجمعات پرسلول میکروبی در بستر بیوفیلم ($\times 2000$)، (D) ادغام باکتری و پلی‌اتیلن در اثر نفوذ باکتری ($\times 2000$)



شکل ۴) تصاویر به‌دست‌آمده از سطح TLDPE پرداخت شده با گونه IRN27 توسط اسکن با میکروسکوپ الکترونی پس از سه ماه گرمخانه‌گذاری ($\times 2000$)؛ (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 untreated 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 مسیرهای متابولیکی متفاوتی را برای تخریب زیستی پلی اتیلن پیشنهاد کرده‌اند، اما آنزیم‌های درگیر در این زیست‌تخریب‌پذیری و مسیرهای متابولیکی درگیر در تخریب بیولوژیکی پیچیده پلی اتیلن 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 پلی اتیلن (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 به عنوان منبع کربن توسط میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌تواند نتایج تحقیق را کاملاً مخدوش و غیرقابل قبول کند.

با توجه به اثبات روش‌های متابولیکی متفاوت به کاررفته توسط گونه‌های مورد استفاده در تجزیه پلیمرهای پلی اتیلنی، کاربرد هم‌زمان گونه‌های موثر به صورت کنسرسیوم میکروبی به منظور 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 مقرون به صرفه‌ترین 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 به منظور تخریب طبیعی ضایعات پلی اتیلنی به کار رود. نیاز به قابلیت اجرای تخریب میکروبی ضایعات پلی اتیلنی در شرایط واقعی به منظور حل مشکل تجمع ضایعات پلاستیکی و خصوصاً پلی اتیلنی احساس می‌شود. در حالی که این اولین گزارش از تاثیر دو گونه میکروبی اسفنگوباکتریوم و دلفتیا روی پلی اتیلن 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-Cuellar 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