

غربالگری باکتری‌های جدا شده از رسوبات نفتی خلیج فارس با قابلیت تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات و شناسایی ساختار فیزیکوشیمیایی پلیمر زیستی تولید شده

ندا سینایی¹، داود زارع^{2*}، مهرداد آذین³

1. دکتری، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

2. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

3. استاد، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: 1399/4/19

تاریخ پذیرش: 1399/8/20

*نویسنده مسئول: تلفن: 09122402213 شماره: 02156276636

آدرس پست الکترونیکی: zare@irost.ir

چکیده

مقدمه و هدف: پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) پلیمرهایی با ویژگی زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار هستند که در برخی از باکتری‌ها تولید می‌شوند. در این مطالعه، از رسوبات نفتی جهت غربالگری باکتری‌های مولد پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، سپس از محیط کشت صنعتی پساب نفتی به عنوان یک محیط کشت ارزان‌قیمت و اقتصادی، برای جداسازی و شناسایی سویه برتر مولد PHA استفاده شد. در نهایت، خصوصیات شیمیایی و فیزیکی پلیمر زیستی استخراج‌شده با روش‌های FTIR و ^1H -NMR بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع 76 سویه باکتریایی جدا شده 11 سویه توانایی تولید پلیمر زیستی داشتند که از میان آنها سویه Sb8 با 44/13% وزن خشک سلول و 1/2 گرم در لیتر در 27 ساعت به عنوان بهترین سویه تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در محیط کشت صنعتی انتخاب شد. این سویه پس از تعیین توالی به عنوان *Citricella thiooxidans* شناسایی شد. به علاوه نتایج آنالیزهای فیزیکوشیمیایی نشان داد، پلیمر زیستی استخراج‌شده، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) است.

نتیجه‌گیری: این پژوهش اولین گزارش از تولید PHB توسط سویه *Citricella thiooxidans* بومی ایران است که در آن غربالگری و شناسایی باکتری تولیدکننده و تعیین نوع پلیمر زیستی تولید شده بررسی و قابلیت تولید در محیط کشت ارزان‌قیمت پساب نفتی ارزیابی شد. با توجه به تولید پلیمر زیستی با درصد بازدهی بسیار و بدون افزودن هیچ‌گونه مکملی به محیط کشت پساب نفتی، می‌توان گفت سویه وحشی جدا شده توانایی بالقوه‌ای در تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات دارد.

کلمات کلیدی: پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، غربالگری، پساب نفتی، سویه باکتریایی

مقدمه

امروزه حجم زیادی از پلاستیک‌های مصرفی در بازار از فرآورده‌های نفتی به دست می‌آیند و برگشت آنها به محیط، چند هزار سال طول می‌کشد [1]. علت اصلی زیست تخریب ناپذیر بودن این پلاستیک‌ها این است که موجودات تجزیه کننده به دلیل بلندی طول مولکول پلیمر و پیوند قوی بین مونومرهای آن نمی‌توانند آن را تجزیه کنند [2]. بنابراین، پژوهشگران در پی جایگزینی پلاستیک‌های زیستی یا تجزیه پذیر با این پلاستیک‌ها هستند. پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها (PHAs) گروهی از پلیمرها هستند که می‌توانند جایگزین خوبی برای پلاستیک‌های نفتی باشند. تقریباً 300 نوع باکتری مختلف که انواع گرم مثبت و گرم منفی را شامل می‌شوند، قادر هستند انواع پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها را تولید و ذخیره کنند. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* و *Rhizobium* از جمله جنس‌های مهم تولیدکننده پلیمرهای زیستی هستند. در این باکتری‌ها تحت شرایط نامطلوب رشد مانند محدودیت در منبع نیتروژن، فسفات، منیزیم یا اکسیژن در حضور مقادیر اضافی کربن، پلی هیدروکسی آلکانوات داخل سلول تولید و ذخیره می‌شود. علاوه بر محدودیت در عناصر یادشده، محدودیت موادی مانند آهن، منگنز، منیزیم، پتاسیم و سدیم هم می‌تواند موجب تولید بیشتر پلیمر زیستی شود [3, 1].

پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها بین 1 تا 14 کربن طول دارند و با توجه به اندازه و طول زنجیره به سه دسته تقسیم می‌شوند: پلیمرهایی با طول زنجیره کوتاه (C3-C5)، اسید چرب‌هایی با طول زنجیره متوسط (C6-C14) و دسته‌ای که بیش از 14 کربن دارند که پلی هیدروکسی آلکانوات با طول زنجیره بلند نامیده می‌شوند [4]. پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB)، رایج ترین نوع پلیمر زنجیره کوتاه و هموپلیمری از 3-هیدروکسی بوتیریک اسید است. پلی هیدروکسی بوتیرات یک ترموپلاستیک با خصوصیات مکانیکی بسیار خوب

مشابه پلی پروپیلن است. بیشترین گزارش‌ها درباره تولید پلی هیدروکسی بوتیرات به باکتری *Ralstonia eutropha* مربوط می‌شود. این باکتری قادر به تولید و تجمع پلیمر درون سلول تا 80% وزن خشک سلولی است. مسیرهای تولید و تنظیم این پلیمر در *Ralstonia* به خوبی مطالعه شده‌اند. در باکتری‌ها سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات از استیل کوآنزیم آ به واسطه فعالیت متوالی سه آنزیم انجام می‌شود. ابتدا آنزیم بتا کتوتیولاز تشکیل استو استیل کوآنزیم آ از دو مولکول استیل کوآنزیم آ را کاتالیز می‌کند، سپس احیای این مولکول به هیدروکسی بوتیریل کوآنزیم آ توسط آنزیم استو استیل کوآنزیم آ ردکتاز وابسته به NADP انجام می‌شود. در نهایت با فعالیت آنزیم سنتتاز مونومرهای مورد نظر به یکدیگر متصل و زنجیره‌های پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها ساخته می‌شوند [5].

به دلیل داشتن ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی خاص، پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها می‌توانند کاربردهای تکنیکی فراوانی داشته باشند. پلی هیدروکسی بوتیرات با داشتن خصوصیات مشابه پلی اتیلن گلیکول گزینه مناسبی در صنایع بسته بندی به شمار می‌روند [6]. همچنین، به دلیل تجزیه پذیری پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها در خاک می‌توان برای محافظت از بذر از حشره کش مناسبی که در پوششی از پلی هیدروکسی بوتیرات قرار گرفته است، استفاده کرد. فعالیت باکتری‌های تخریب کننده پلی هیدروکسی بوتیرات سبب آزاد شدن تدریجی حشره کش می‌شود [7]. از تجزیه پلی هیدروکسی بوتیرات در بدن انسان، هیدروکسی بوتیریک اسید تولید می‌شود که یک ماده حد واسط برای متابولیست‌ها محسوب می‌شود [8]. بنابراین، پلی هیدروکسی بوتیرات با سلول‌های زنده کاملاً سازگار هستند و به دلیل داشتن ویژگی‌های تجزیه پذیری زیستی و سازگاری زیستی می‌توان از آن به عنوان نخ بخیه، داربست زخم، پیچ پریکارد در جراحی قلب و رهایش کنترل شده دارو در پزشکی و داروسازی استفاده کرد [9, 10]. در

سال های اخیر تحقیقات گسترده ای درباره بهینه سازی تولید پلیمر زیستی انجام شده است. اما با وجود این تلاش ها، تولید تجاری پلی هیدروکسی آلکانوات ها به دلیل هزینه های بالای فرایند تولید همچنان محدود است. عوامل متعددی بر هزینه تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها تأثیر می گذارند که مهم ترین آن میزان تجمع پلیمر در سلول، میزان استحصال، قیمت سوپسترا و بازدهی تولید به ازای واحد سوپسترا است. قیمت منبع کربن عاملی اساسی در قیمت تمام شده پلی هیدروکسی آلکانوات است و تقریباً 38 درصد از کل هزینه تولید را شامل می شود [11].

در حال حاضر، استفاده از پساب های صنعتی و کشاورزی به عنوان منبع کربن و انرژی ارزان قیمت برای کاهش هزینه های تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها پیشنهاد می شود. ملاس [12]، ویناس [13]، پساب کارخانجات لبنیات [14]، محصول فرعی نشاسته سیب زمینی [15] و چندین منبع دیگر برای تولید اقتصادی این پلیمر زیستی بررسی شده اند. با این حال مطالعات محدودی درباره استفاده از پساب های پالایشگاه های نفتی انجام شده و تاکنون هیچ پژوهشی درباره کاربرد پساب نفتی به عنوان تنها منبع در دسترس باکتری جهت رشد و تولید پلیمر زیستی انجام نشده است. این تحقیق برای بررسی این موارد، به غربالگری سویه ها با قابلیت بهره دهی بالا و رشد مناسب با استفاده از پساب نفتی می پردازد. از آنجا که جداسازی سلول های باکتریایی تولیدکننده پلی هیدروکسی بوتیرات از رسوبات نفتی اعماق خلیج فارس انجام می گیرد، فرضیه آن است که قدرت سازگاری سویه های مولد با محیط کشت پساب نفتی، بر افزایش بهره وری تولید تأثیر مثبتی داشته باشد. به همین منظور، در مرحله اول پژوهش، برای اولین بار برای جداسازی سویه های موجود در رسوبات نفتی اعماق خلیج فارس با قابلیت تولید پلیمر زیستی اقدام شد. پس از بررسی میزان

تولید پلیمر زیستی و غربالگری سویه برتر و شناسایی مولکولی آن، تولید پلاستیک زیستی در محیط کشت پساب نفتی پالایشگاه بندر امام بدون افزودن هیچ گونه مکملی بررسی شد. در انتها ساختار فیزیکوشیمیایی پلاستیک زیستی تولید شده بررسی شد.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری ها: از آنجا که رسوبات نفتی غنی از کربن هستند و نیتروژن و فسفر کمی دارند، در این پژوهش، از مجموع بیش از 1000 سویه باکتری هایی که طی یک پروژه غربالگری از رسوبات اعماق خلیج فارس و از قسمت های آلوده به نفت جدا شده بودند، به عنوان منبع غربالگری باکتری های مولد پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده شد. به این منظور، سویه هایی که سرعت رشد بالاتر و کلنی های درشت تر داشتند، برای بررسی انتخاب و روی سطح پلیت حاوی محیط کشت Marine agar کشت داده و در دمای 28 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت گرماگذاری شدند [16]. در مرحله بعد براساس رنگ آمیزی سودان سیاه بررسی و غربالگری اولیه شدند.

تهیه محیط پیش کشت: محیط پیش کشت Marine broth متشکل از ترکیبات مشابه با آب دریا در ارلن های 250 میلی لیتر تهیه و پس از تنظیم pH روی 7، به مدت 15 دقیقه در 121 درجه سانتی گراد اتوکلاو شد [16]. هر سویه مورد بررسی در فلاسک جداگانه ای تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای 28 ± 1 درجه سانتی گراد و سرعت 110 دور بر دقیقه گرماگذاری شد. جذب نوری نمونه ها (OD) با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) در طول موج 625 نانومتر هر 3 ساعت یک بار اندازه گیری شد. هنگامی که غلظت سلولی در محیط Marine broth برابر 1 مک فارلند (3×10^8 سلول در هر میلی لیتر) شد، 2/5 میلی لیتر از محیط پیش کشت به ارلن های حاوی 50

میلی لیتر محیط کشت تولید انتقال یافت که غلظتی معادل 5٪ (حجمی/حجمی) ایجاد شد.

تهیه محیط کشت صنعتی تولید: پساب نفتی شرکت پتروشیمی بندر امام جمع آوری و تا زمان استفاده در دمای 2 تا 4 درجه سانتی گراد ذخیره شد. طبق آنالیزهای انجام شده، میزان اکسیژن خواهی شیمیایی¹ و اکسیژن خواهی زیستی² به ترتیب (931 میلی گرم در لیتر) و (88 میلی گرم در لیتر) اندازه گیری شد. براساس نتایج آنالیزهای واحد تولیدی، پساب مورد نظر حاوی 4/83 میلی گرم در لیتر نیتрат و 0/37 گرم در لیتر فسفر بود. برای ازبین بردن مواد جامد معلق، نمونه های اتوکلاو شده در سانتریفیوژ با گرانش 5500g به مدت 15 دقیقه رسوب داده شدند. سپس، مایع رویی جدا و به عنوان محیط کشت تولید برای بررسی میزان تولید پلیمر زیستی توسط سویه های باکتریایی انتخاب شده، استفاده شد.

انتخاب سویه برتر براساس بازدهی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات: برای ارزیابی بازدهی و بهره وری تولید پلی هیدروکسی آلکانوات، 50 میلی لیتر پساب نفتی صاف شده از مرحله قبل به عنوان محیط کشت تولید به ارلن های 250 میلی لیتری منتقل و پس از تنظیم pH محیط روی 7، به عنوان محیط کشت استفاده شد. سپس به میزان 5٪ (حجمی/حجمی) از هریک از محیط های پیش کشت مربوط به باکتری های انتخاب شده به آنها تلقیح شد. ارلن ها در انکوباتور شیکردار با سرعت 110 دور بر دقیقه و دمای 28 درجه سانتی گراد به مدت 72 ساعت گرماگذاری شدند. جذب نوری (OD) محیط کشت و میزان تولید پلی هیدروکسی آلکانوات هر 3 ساعت یک بار اندازه گیری شد. سویه باکتریایی با بالاترین بهره وری تولید پلیمر زیستی برای مطالعات بیشتر انتخاب شد.

خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی باکتری برتر انتخاب شده: سویه باکتریایی براساس واکنش گرم، شکل

کلونی و مورفولوژی سلول شناسایی شدند. همچنین، برای شناسایی مولکولی سویه برتر، از روش تعیین توالی 16s rRNA با پرایمرهای همگانی

3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5'-16sF و 3' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 5'-16sR

استفاده شد. نتیجه خوانش توالی های حاصل از دو زنجیره، توسط نرم افزار Vector NTI 11 بررسی شد و در نهایت توالی کامل ناحیه ژنی 16S rRNA سویه مورد نظر به دست آمد. برای شناسایی توالی های 16S rRNA از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> استفاده شد.

روش استخراج پلی هیدروکسی آلکانوات: محیط کشت های حاوی نمونه در سانتریفیوژ با 7000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه رسوب گذاری شدند. 10 میلی لیتر محلول هیپوکلریت سدیم (5٪ کلر فعال با pH برابر با 10) به رسوب باکتری اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس، با سرعت 7000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتری به ترتیب با آب جوش، استون و اتانول مطلق شسته و در پایان هر مرحله سانتریفیوژ شدند. سپس، رسوبات حاصل در محلولی با نسبت 7، 3، 1 از کلروفرم، متانول، آب حل و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت گرماگذاری شدند [17]. پس از سانتریفیوژ، یک محلول سه لایه (تری فازیک) با لایه بالایی آب، لایه مرکزی بقایای سلولی و لایه زیرین محلول کلروفرم به دست آمد. قسمت کلروفرم جدا و در آون با دمای 55 درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از تبخیر کامل کلروفرم، یک فیلم سفید رنگ از پلی هیدروکسی آلکانوات به دست آمد که برای تعیین غلظت پلیمر زیستی تولید شده با روش سنجنش اسید کروتونونیک بررسی شد. پس از غربالگری باکتری ها و

¹. COD: Chemical Oxygen Demand

². BOD: Biological Oxygen Demand

(1). وزن نمونه های استخراج شده با مقایسه آن با اندازه گیری پلی هیدروکسی آلکانوات و با استفاده از روش اسید کروتونونیک تأیید شد.

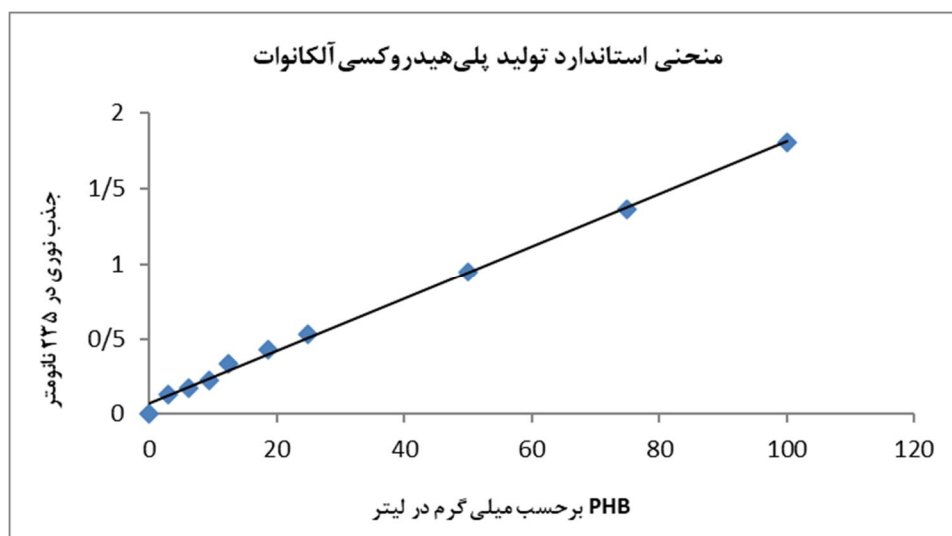
اندازه گیری پلی هیدروکسی آلکانوات ذخیره شده توسط سویه منتخب، از آنجاکه میزان تولید بالایی از پلی هیدروکسی آلکانوات در مقادیر گرم بر لیتر مشاهده شد، روش محاسبه به توزین محصول تغییر یافت (شکل



شکل 1. پلی هیدروکسی آلکانوات تولید شده توسط سویه برتر در محیط کشت صنعتی پساب نفتی

مدت 10 دقیقه در 100 درجه سانتی گراد در یک حمام آب گرم قرار داده شد تا پلی هیدروکسی آلکانوات به اسید کروتونیک تبدیل شود. سپس جذب محلول در 235 نانومتر در برابر محلول بلانک که اسید سولفوریک جوشیده بود، اندازه گیری شد [18]. منحنی استاندارد با استفاده از پلی هیدروکسی بوتیرات خالص از شرکت سیگما ترسیم شد. به این منظور مقادیر مختلف (0 تا 100 میکروگرم) پلی هیدروکسی بوتیرات استاندارد در 10 میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و داغ حل، جذب نمونه ها در 235 نانومتر اندازه گیری و منحنی استاندارد رسم شد (شکل 2).

اندازه گیری پلی هیدروکسی آلکانوات با استفاده از روش اسید کروتونونیک: غلظت پایین پلی هیدروکسی آلکانوات در نمونه ها را با استفاده از روش اسپکتروفتومتری می توان اندازه گیری کرد. اساس این روش بر پایه تبدیل پلی هیدروکسی آلکانوات به اسید کروتونونیک، با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ و حرارت است. جذب نوری اسید کروتونونیک حاصل به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرا بنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) اندازه گیری شد. در مجموع، 10 میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ به پلی هیدروکسی آلکانوات های استخراج شده اضافه و به



شکل 2. منحنی استاندارد و جذب نوری کروتونیک اسید حاصل از مقادیر مشخص پلی هیدروکسی بوتیرات که با اسیدسولفوریک غلیظ هیدرولیز شده اند.

$$\text{بهره وری} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{زمان (ساعت)}}$$

رابطه

(2)

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلیمر زیستی استخراج شده طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریر (FTIR): طیف سنجی تبدیل فوریر مادون قرمز تکنیکی بسیار مفید برای شناسایی پیوندهای شیمیایی و گروه های عاملی است. گروه های مهم عاملی موجود در پلیمر زیستی استخراج شده با استفاده از طیف سنجی FTIR مشخص شدند. نمونه های پلی هیدروکسی آلکانوات با 2% KBr مخلوط نیز به صورت قرص های مخصوص برای آنالیز آماده و در طیف سنج (FTIR (Bruker IFS 120 HR قرار داده شدند [20].

طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای ($^1\text{H-NMR}$): طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای نقش بسیار مهمی در یافتن ساختار گسترده مولکول دارد. $^1\text{H-NMR}$ برای تشخیص بین 3-هیدروکسی بوتیرات با دیگر اسیدهای چرب 3-هیدروکسی در یک هتروپلیمر

تخمین وزن خشک سلولی: برای تخمین وزن خشک سلولی، 10 میلی لیتر محیط کشت تولید با سانتی فیوژ 7000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه رسوب گذاری شد. پس از سه بار شستشو با آب مقطر، رسوب باکتریایی در دمای 55 درجه سانتی گراد در آون خشک شد تا وزن ثابت به دست آید [19].

میزان تولید، اندازه گیری درصد تجمع و بهره وری تولید پلی هیدروکسی آلکانوات: برای سنجش کمی پلی هیدروکسی آلکانوات، پلیمر استخراج شده با ترازوی دقیق عددی توزین و درصد تجمع پلی هیدروکسی آلکانوات براساس نسبت پلی هیدروکسی آلکانوات تولیدی در وزن خشک سلولی طبق رابطه زیر محاسبه شد. میزان بهره وری نیز با محاسبه نسبت تجمع پلی هیدروکسی آلکانوات در هر ساعت مطابق رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{درصد تجمع پلیمر} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{وزن خشک سلولی (گرم)}} \times 100$$

رابطه (1)

100

پلی‌هیدروکسی آلکانوات استفاده می‌شود. طیف $^1\text{H-NMR}$ با حل کردن بیوپلیمر استخراج شده در دوتریوکلروفرم (CDCl_3) با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در یک طیف‌سنج Bruker Avance II 500 در دمای 20 درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. استاندارد داخلی tetramethylsilane بود [21].

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): مورفولوژی فیلم‌های پلیمر زیستی استخراج شده، با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. نمونه‌ها با یک لایه طلای 10 نانومتر پوشش داده شدند و تجزیه و تحلیل ساختار نمونه‌ها با SEM مدل JEOL LSM5600LV در 15 کیلو ولت انجام شد.

تجزیه و تحلیل نتایج آنالیزها: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 16 استفاده شد. همه آزمایش‌ها با سه تکرار، با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) تجزیه و تحلیل و برای مقایسه زوج میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

غربالگری اولیه سویه‌ها: 1000 سویه جداسازی شده از رسوبات نفتی خلیج فارس که محققان سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جمع‌آوری کرده بودند، به‌عنوان منبع اولیه غربالگری بررسی شدند. تعداد 76 سویه که از لحاظ مورفولوژیکی، کلونی درشت و سرعت رشد بالا داشتند، به محیط کشت Marine agar منتقل و در مرحله بعد براساس رنگ‌آمیزی سودان سیاه بررسی شدند. از آنجاکه رنگ‌آمیزی روشی دقیق برای غربالگری سویه‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی آلکانوات نیست، تمامی سویه‌هایی که در آنها نشانه‌هایی از وجود دانه‌های ذخیره‌ای بود، به محیط کشت Marine broth منتقل و در محیط کشت تولید ارزیابی شد. میزان تولید پلیمر زیستی توسط 24 سویه در محیط کشت صنعتی پساب نفتی به‌دقت بررسی و اندازه‌گیری شد. از این تعداد، 11 سویه میزان پلی‌هیدروکسی آلکانوات زیادی تولید کردند که نتایج آن در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول 1. میزان وزن خشک و تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات در سویه‌های باکتری با قابلیت تجمع پلی‌هیدروکسی آلکانوات در محیط

کشت صنعتی

سویه	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)*	درصد تجمع پلی‌هیدروکسی آلکانوات	زمان (ساعت)	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
Sb ₁	3/102±0/003	1/268±0/004	40/88	69	0/0183±0/00005
Sb ₂	0/984±0/001	0/103±0/002	10/47	24	0/0042±0/00003
Sb ₃	1/371±0/002	0/389±0/004	28/37	54	0/0072±0/00006
Sb ₄	1/592±0/002	0/537±0/003	33/73	63	0/0085±0/00004
Sb ₅	2/389±0/004	0/918±0/006	38/43	42	0/0218±0/00007
Sb ₆	2/153±0/003	1/012±0/009	47	51	0/0198±0/0001
Sb ₇	1/023±0/002	0/038±0/003	3/71	72	0/0005±0/00004
Sb ₈	2/726±0/003	1/203±0/007	44/13	27	0/0445±0/00009
Sb ₉	0/682±0/002	0/117±0/004	17/15	45	0/0026±0/00005
Sb ₁₀	1/019±0/002	0/169±0/001	16/58	39	0/0043±0/00003
Sb ₁₁	2/541±0/003	0/415±0/003	16/33	30	0/0138±0/00004

براساس نتایج جدول 1، 11 سویه در فواصل زمانی 27 تا 72 ساعت به حداکثر تولید پلیمر زیستی دست یافتند. نتایج نشان می‌دهد، سویه Sb_1 بالاترین تولید پلیمر زیستی را دارد. با توجه به اینکه مدت زمان تولید حداکثر در این سویه 69 ساعت و در تولید صنعتی بهره‌وری فاکتور مهم‌تری برای انتخاب سویه برتر است، این سویه نمی‌تواند سویه انتخابی باشد، زیرا میزان بهره‌وری آن نسبت به سویه Sb_8 بیش از دو بار کمتر است. در مقایسه، سویه Sb_2 با اینکه در کمترین زمان یعنی 24 ساعت به تولید حداکثری می‌رسد، به دلیل میزان کم تولید پلیمر زیستی در آن، تولید و بهره‌وری پایینی خواهد داشت. به همین ترتیب سویه Sb_6 با بالاترین درصد تجمع پلی‌هیدروکسی آلکانوات نمی‌تواند سویه انتخابی باشد. در تمام موارد، آزمون دانکن اختلاف معنادار (5 درصدی (P value < 0.05) را بین میانگین‌ها نشان داد. بنابراین، سویه Sb_8 با بالاترین میزان بهره‌وری به عنوان سویه برتر برای مراحل بعدی غربالگری شد.

بررسی مورفولوژیکی و شناسایی مولکولی سویه برتر: نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نشان داد، باکتری غربال شده گرم منفی، لیمویی شکل، هوازی و غیر متحرک است. بررسی میزان تطابق ژنتیکی ژن‌های تکثیر شده با سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI 99% بین سویه غربال شده و گونه باکتریایی اکسیدکننده گوگرد با نام *Citricella thiooxidans* را نشان می‌دهد که اولین بار در سال 2005 از دریای سیاه جداسازی و شناسایی شده است [22]. به این ترتیب، این سویه با عنوان فرضی *Citricella thiooxidans* شناسایی شد. در نهایت، با استفاده از نرم افزار MEGA درختچه فیلوژنتیکی باکتری مذکور ترسیم شد. این درختچه در شکل 3 نشان داده شده است.

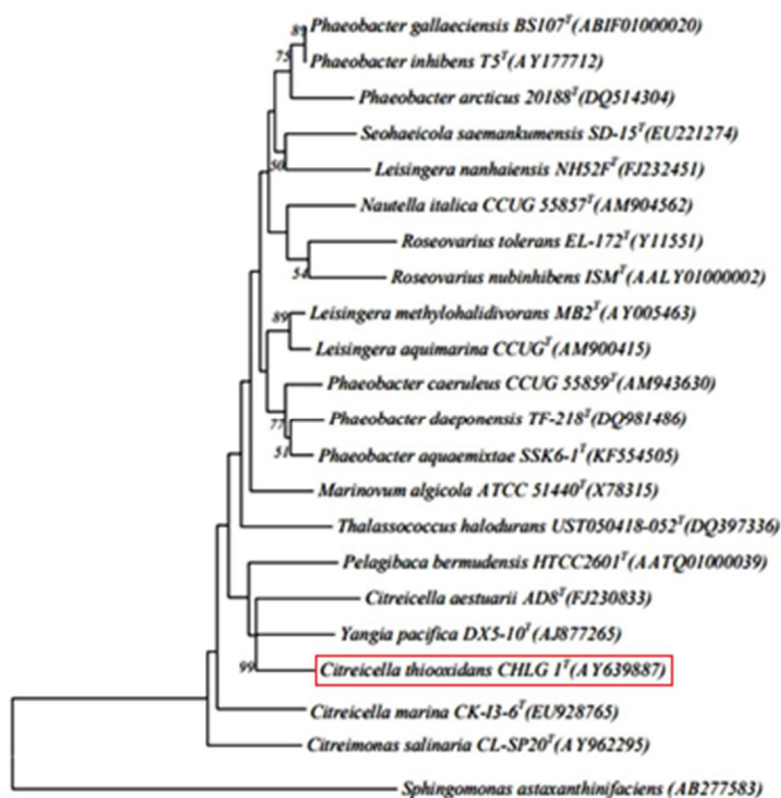
تاکنون سویه‌های بسیاری شناسایی شده‌اند که می‌توانند پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید کنند. همچنین،

تلاش برای یافتن سویه‌هایی با ویژگی‌های برتر بیوتکنولوژی از اهمیت خاصی برخوردار بوده است. این ویژگی‌ها عبارت‌اند از: سرعت تولید بیشتر، دمای مناسب رشد، تولید بالاتر و همچنین توانایی استفاده از طیف وسیع و متنوع منابع کربنی ارزان قیمت. در این تحقیق سویه *Citricella thiooxidans* به عنوان بهترین سویه تولیدکننده معرفی شد. تا به حال فعالیت بیماری‌زایی برای این سویه در گیاهان و جانوران گزارش نشده است. همچنین، این ارگانیزم می‌تواند در محیط‌هایی با مواد غذایی پایین مثل آب و خاک برای مدت زمان زیادی زنده بماند. نتایج تحقیقات Sorokin و همکارانش در سال 2005 توانایی بالای این باکتری را برای رشد روی محیط‌های مختلف چون استات، مالات، لاکتات، پیروات، سترات، پروپیونات، بوتیرات، گلی اکسلات، گلوکونات، گلیکولات و بسیاری سوبستراهای دیگر ثابت کردند. نتایج مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه برتر جداسازی شده در این پژوهش، کاملاً بر نتایج تحقیقات Sorokin و همکارانش منطبق است [22]. با وجود اینکه این محققان در سلول‌های باکتریایی رشد یافته وجود گرانول‌های درشت پلی‌هیدروکسی بوتیرات را به اثبات رساندند، تاکنون گزارشی درباره میزان تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات از این سویه چاپ نشده است.

نکته مهم این است که به دلیل هزینه بالای فرایند تولید پلیمر زیستی، جایگزینی وسیع این دسته از پلیمرها با پلاستیک‌های تولید شده بر پایه ترکیبات نفتی تاکنون امکان‌پذیر نبوده است و تلاش برای یافتن منبع کربن ارزان قیمت (که مهم‌ترین عامل بالابودن هزینه تمام شده پلاستیک‌های زیستی است) ادامه دارد. یکی از منابع ارزان قیمت مورد توجه، پساب‌های صنایع هستند. این پساب‌ها هم بسیار ارزان هستند و هم به دلیل داشتن مواد آلی فراوان، مشکلات زیست محیطی فراوانی ایجاد می‌کنند، ولی باکتری‌ها می‌توانند به راحتی این مواد آلی را

به ترکیبات مفیدی چون پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها تبدیل کنند. تحقیقات Ahn و همکارانش در سال 2015 نیز ثابت کرد، نسبت بالای کربن به نیتروژن در پسماندها و فاضلاب‌ها شرایطی مناسب برای تولید و ذخیره‌سازی پلیمر زیستی توسط باکتری مهیا می‌کند [23]. پیش از آن، Golf و همکاران در سال 2007 با رشد باکتری *Pseudomonas putida* روی پساب صنایع پلاستیک‌های نفتی و بهینه‌سازی خوراک‌دهی توانستند به میزان 42% ماده خشک سلولی، پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید کنند [24]. نتایج Bosco و Chiampo در سال 2010 نشان داد، غلظت پلیمر زیستی تولیدی در پساب صنایع لبنی و با کمک باکتری‌های لجن فعال کمتر از 0/5 گرم بر لیتر است [25]. Yuan و همکاران در سال 2020 با رشد باکتری‌های لجن فعال در پساب شهری به تولید پلیمر

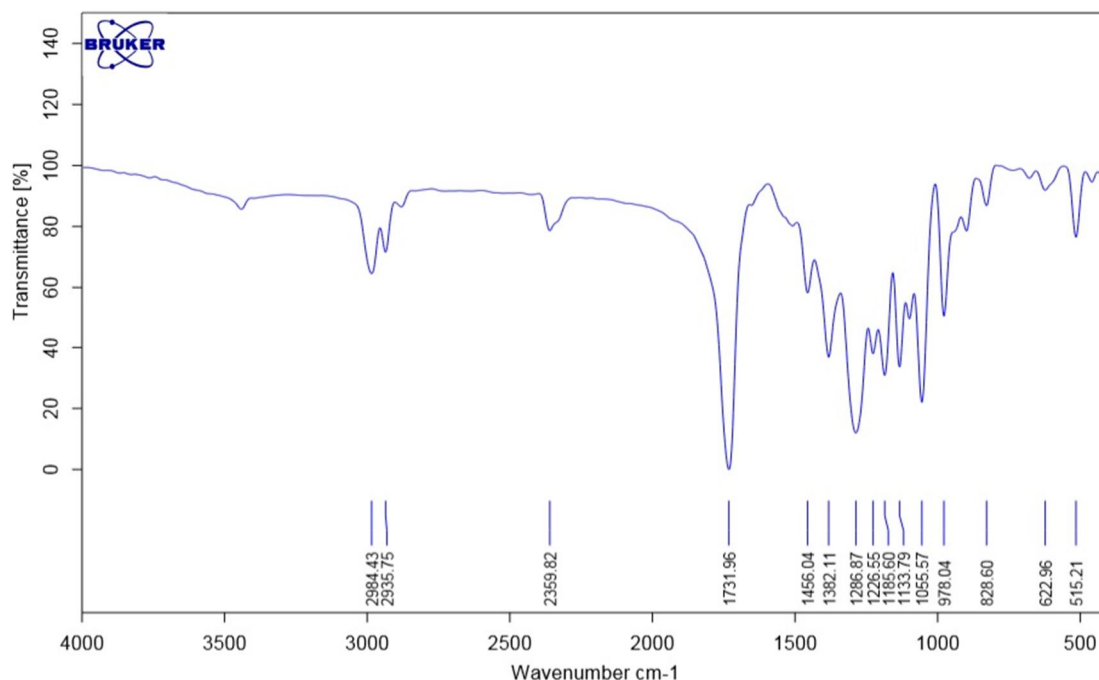
زیستی با میزان 15% وزن خشک سلول‌ها دست یافتند. این نتایج نشان داد، با استفاده هم‌زمان از چند منبع کربن می‌توان به تولید بالاتری دست یافت [26]. در مقایسه، این مطالعه با حداکثر میزان پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدی با غلظت 1/2 گرم در لیتر و 44/13% وزن خشک سلولی در 27 ساعت، تولید بالایی را نسبت به منابع کربنی ارزان‌قیمت مشابه نشان می‌دهد. براساس نتایج این پژوهش، باکتری جداسازی‌شده با استفاده از پساب نفتی و بدون نیاز به مواد مکمل گران‌قیمت، توانایی رشد و تولید زیادی از پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارد. این خصوصیت بارز می‌تواند شرایط استفاده از این سویه را به‌عنوان یک سویه بیوتکنولوژیکی برای تولید انبوه پلیمر زیستی فراهم کند.



شکل 3. درختچه فیلوژنتیکی سویه باکتریایی *Citreicella thiooxidans*

شناسایی فیزیک و شیمیایی پلیمر زیستی استخراج شده طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریر (FTIR): وجود باندهای اختصاصی برای گروه‌های عاملی برای تعیین خصوصیات و ساختار ماده مورد نظر بسیار با اهمیت هستند. FTIR بررسی بودن یا نبودن باندهای جذبی در

ناحیه اثر انگشتی همراه دیگر باندها می‌تواند برای تفسیر ساختار مولکولی ماده مورد آنالیز به کار رود. در شکل 4، طیف FTIR پلیمر زیستی استخراج شده نشان داده شده است.

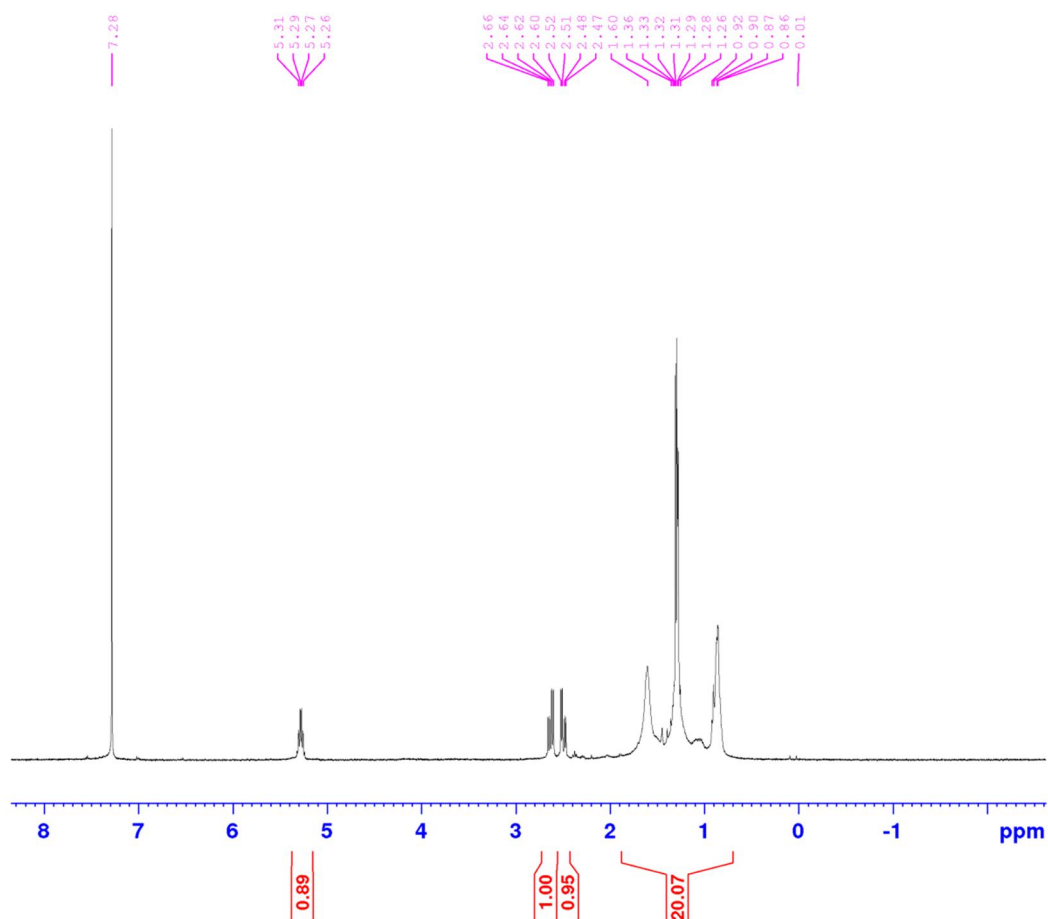


شکل 4. طیف FTIR پلیمر زیستی استخراج شده از باکتری *Citreicella thiooxidans*

باند پهن در محدوده 3400cm^{-1} وجود گروه‌های هیدروکسیل را نشان می‌دهد. در این ناحیه باندهای NH نیز مشاهده می‌شوند که معمولاً از باندهای هیدروکسیل واضح‌تر هستند. در این طیف، پیوندهای C-H برای گروه‌های متیل (Asymmetric) در نزدیکی 2984cm^{-1} و برای گروه‌های متیلن در (Asymmetric) در حدود 1456cm^{-1} و 1382cm^{-1} دیده می‌شوند. باند ناحیه 2359cm^{-1} مربوط به دی‌اکسیدکربن اتمسفر است. باند کربونیل استر یعنی باند شاخص پلی‌هیدروکسی بوتیرات در نزدیکی 1731cm^{-1} مشاهده می‌شود. این باند توسط ارتعاش پیوند C=O از پیوند استری اسیدهای چرب به وجود می‌آید. این باند و

باندهای ناحیه اثر انگشت (بین 1500cm^{-1} و 500cm^{-1}) در تشخیص نهایی پلیمر زیستی نقش دارند. باندهای 1456cm^{-1} و 1382cm^{-1} به ترتیب به گروه متیل (Symmetric bending) و (Asymmetric bending) مربوط هستند. باند 1286cm^{-1} وجود عامل کربنی متیلن Wagging را نشان می‌دهد. دو باند بعدی به ترتیب به گروه‌های C-O-C Symmetric و Asymmetric مربوط می‌شوند و دو باند آخر پیوندهای C-O و C-C را نشان می‌دهند. تفسیر این باندها وجود پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات را اثبات می‌کند [21, 27].

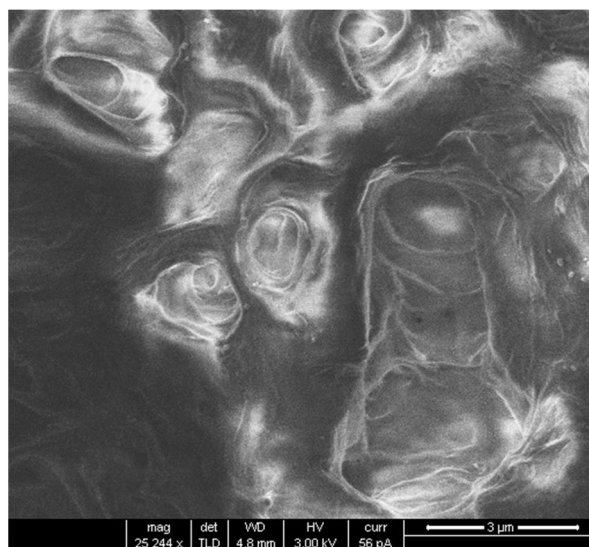
نتایج طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای ^1H (HNMR): شکل 5 نتیجه طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ^1H (HNMR) پلیمر زیستی تولیدی را نشان می‌دهد.



شکل 5. طیف ^1H HNMR پلیمر زیستی استخراج شده از باکتری Citreicella thiooxidans جداسازی شده

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM):
براساس تصویر 6 فیلم خالص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استخراج شده سطحی کاملاً صاف و بدون ترک دارد. همچنین، بیوفیلم حاصل کاملاً متخلخل و اندازه منافذ آن نیز تقریباً یکنواخت است. این منافذ صدفی شکل هستند و هرچه به عمق بیوفیلم نزدیک می‌شویم، قطر منافذ کوچک‌تر می‌شود. این خصوصیات پتانسیل این بیوفیلم را برای استفاده در مقاصد پزشکی به‌ویژه رهایش کنترل شده دارو نشان می‌دهد.

سیگنال گروه‌های متیل یا CH_3 در فاصله 1/26ppm تا 1/60ppm دیده می‌شود. پیک‌های بین 2/47ppm و 2/66ppm به وجود گروه‌های متیلن یا CH_2 مربوط و سیگنال‌های 5/26ppm تا 5/31ppm با گروه‌های متین یا CH مرتبط هستند. پیک مشخص 7/28ppm به کلروفرم مربوط می‌شود. تمام پیک‌های موجود در طیف رزونانس، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات بودن پلیمر زیستی استخراج شده را تأیید می‌کنند [21].



شکل 6. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مربوط به فیلم‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استخراج‌شده

نتیجه‌گیری

در جنوب ایران به دلیل وجود منابع غنی نفت و گاز، تعداد زیادی پالایشگاه احداث شده است و این مواد نفتی از ترکیبات شیمیایی گوناگونی تشکیل شده‌اند. پساب حاصل از این صنایع در صورت تصفیه نامناسب وارد آب‌های سطحی و زیرزمینی و حتی خاک مناطق نفت‌خیز می‌شود و اثرات زیست‌محیطی نامطلوبی برجا می‌گذارد. همچنین، با توجه به حجم بسیار بالای پساب خروجی، استقرار واحدهای مؤثر تصفیه برای دستیابی به پساب با ویژگی‌های متناسب با استانداردهای بین‌المللی محیط زیستی هزینه بالایی دارد. بنابراین، یافتن سویه باکتریایی که با وجود توانایی تولید پلیمر زیستی، قابلیت استفاده از پساب نفتی را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشته باشد، از جنبه اقتصادی و زیست‌محیطی حائز اهمیت است. به نظر می‌رسد با بررسی بیشتر، این پساب به عنوان منبع کارآمدی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به کار گرفته شود. در این پژوهش، استفاده از منابع مشابه برای جداسازی سویه‌ها و تولید پلیمر زیستی نتایج بسیار جالبی دربر داشته است. سویه وحشی جداسازی‌شده از رسوبات اعماق خلیج فارس (*Citricella thiooxidans*) در استفاده

از فاضلاب نفتی به عنوان تنها منبع غذایی برای رشد و تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (بدون افزودن هیچ‌گونه مکملی) توانایی بسیاری از خود نشان داد. این مسئله باعث می‌شود ارزش اقتصادی فرایند بررسی‌شده افزایش یابد. همچنین، نتایج نشان داد محصول پلیمر زیستی استخراج‌شده، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص است و قابلیت کاربرد در پزشکی را دارد. از این رو، می‌توان امید داشت که با بررسی‌های بیشتر بتوان از سویه جداسازی‌شده و محیط کشت صنعتی مورد بررسی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات مقرون‌به‌صرفه در مقیاس بزرگ استفاده کرد.

References

1. Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E. R. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 6(2), 251-260.
2. Kalia, V. C., Raiada, N. and Sonakya, V. (2000) Bioplastics. *J Sci Ind Res.* 59, 433-445.

13. Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S. K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., and Mukherjee, J. (2012) Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*. 9:2(1), 34.
14. Sathiyarayanan, G., Kiran, G. S., Selvinc, J., and Saibaba, G. (2013) Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. *Int J Biol Macromol*. 60, 253-261.
15. Haas, R., Jin, B., and Zepf, F. T. (2008) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72, 253-256.
16. Priyadharshini, S., Sajayyan, A., and Ravindran, A. (2018) Optimization and production of Polyhydroxy butyrate from a Marine sponge associated Bacteria MSI21. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. 5(9), 849-853.
17. Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., Lee, K. M., and Chang, H. N. (1993) The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology Techniques*. 7(3), 209-212.
18. Law, J., and Slepecky, R.A. (1961) Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*. 82, 52-55.
19. Pal, A., Parbhu, A., Kumar, A. A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Pannamma, V., and Shivakumar, S. (2002) Optimization of Process Parameters for Maximum Poly (β) hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology*. 2, 149-154.
20. Preethi, R., Sasikala, P., and Aravind, J. (2012) Microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHAs) utilizing fruit waste as a substrate. *Res in Biotech*. 3(1), 61-69.
21. Shrivastava, A., Mishraa, S. K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., and Mishraa, S. (2010) Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *Int J Biol Macromol*. 47, 283-287.
3. Zinn, M. (2003) Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoate. *European Cells and Materials*. 5, 38-39.
4. Tsuge, T. (2002) Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng*. 6:579-584.
5. Volova, T. G., Trusova, M. Y., Kalacheva, G. S. and Kozhevnicov, I. V. (2006) Physiological-biochemical properties and the ability to synthesize polyhydroxyalkanoates of the glucose-utilizing strain of the hydrogen bacterium *Ralstonia eutropha* B8562. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73, 429- 433.
6. Volova, T. G., Vasiliev, A. D., Zeer, E. P., Petrakovskaya, E. A. and Falaleev, O. V. (2000) Study of the molecular structure of polyhydroxybutyrate, a termoplastic and degradable biopolymer. *Biofizika*. 45, 445-451.
7. Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. and Castro-Sowinski, S. (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 31, 55-67.
8. Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H. and Zinn, M. (2005) Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules*. 6, 2290-2298.
9. Chen, G. Q., and Wu, Q. (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 26, 6565-6578.
10. Ozdil, D., and Aydin, H. M. (2014) Polymers for medical and tissue engineering applications. *J Chem. Technol Biotechnol*. 89(12), 1793-1810.
11. Akaraonye, E., Keshavarz, T., and Roy, I. (2010) Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol*. 85, 732-743.
12. Albuquerque, MGE., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B. R., and Reis, M. A. M. (2007) Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol*. 130, 411-421.

26. Yuan, Q., Sparling, R., and Oleszkiewicz, J. (2020) Polyhydroxybutyrate Production from Municipal Wastewater Activated Sludge with Different Carbon Sources. *J. Air, Soil and Water Research*. 8(1).
27. Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G. Q., and Huang, W. (1999) A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51, 523–526.

قدردانی و تشکر

از اساتید و همکاران محترم سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، جناب آقای دکتر کیانی و سرکار خانم عمیدی بابت دراختیار گذاشتن بانک سویه‌های جداسازی‌شده از رسوبات نفتی خلیج فارس و همچنین سرکار خانم دکتر محسنی برای حمایت در شناسایی مولکولی سویه غربال‌شده تشکر می‌کنیم.

22. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., and Muyzer, G. (2005) *Citricella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. *Syst Appl Microbiol*. 28, 679–687.
23. Ahn, J., Jho, E. H., and Nam, K. (2015) Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research*. 20(3), 246–253.
24. Goff, M., Ward, P.G., and O'Connor, K.E. (2007) Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: a nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. *J Biotechnol* 132:283–286.
25. Bosco, F., and Chiampo, F. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge Production of bioplastics using dairy residues. *J. Biosci. Bioeng*. 109, 418–421.

Screening of isolated bacteria from Persian Gulf petroleum sediments with capability of polyhydroxybutyrate production and identification of the physicochemical structure of the produced biopolymer

Neda Sinaei¹, Davood Zare^{2*}, Mehrdad Azin³

¹PhD, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.

²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.

³Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Received: 2020/7/9

Accepted: 2020/11/10

*Corresponding author. Tel: +98 912 240 2213; fax: +98 215 627 66 36
E-mail address: zare@irost.ir

Abstract

Background and Objective: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers with biodegradable and biocompatible properties that are produced by some bacteria. In the present study, petroleum sediments were applied to screen PHA-producing bacteria.

Method: The industrial culture medium of petroleum effluent was used as a low-cost and economical medium for isolating and identifying the superior PHA-producing strain. Finally, the chemical and physical properties of the extracted biopolymer were investigated by Fourier-transform infrared spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance.

Results: In general, 11 out of 76 isolated bacterial strains could produce biopolymers among which, the Sb8 strain was selected as the best PHA-producing strain in the industrial medium with the cell dry weight of 44.13% and 1.2 g/l in 27 h. This strain was identified as *Citricella thiooxidans* by sequencing determination. Eventually, the results of physicochemical analyses revealed that polyhydroxybutyrate (PHB) was the extracted biopolymer.

Conclusion: The present study is the first report on PHB production by Iranian native *Citricella thiooxidans* strain by focusing on identifying and separating producing bacteria, as well as determining the type of the produced biopolymer and the production capability in a low-cost culture medium of the petroleum effluent. Considering the production of the biopolymer with a relatively high yield percentage without adding any supplement to the petroleum effluent medium, the isolated wild strain has the potential to produce PHB.

Keywords: polyhydroxybutyrate (PHB), screening, petroleum effluent, bacterial strain