زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

غربالگری باکتری‌های جداشده از رسوبات نفتی خلیج فارس با قابلیت تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و شناسایی ساختار فیزیکوشیمیایی پلیمر زیستی تولیدشده

ندا سینایی[1]، داود زارع[2*]، مهرداد آذین[3]

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 نمابر: 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 به‌عنوان یک محیط کشت ارزان‌قیمت و اقتصادی، برای جداسازی و شناسایی سویه برتر مولد PHA استفاده شد. درنهایت، خصوصیات شیمیایی و فیزیکی پلیمر زیستی استخراج‌شده با روش‌های FTIR و ^{1}H-NMR بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع 76 سویه باکتریایی جداشده 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 به‌عنوان بهترین سویه تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در محیط کشت صنعتی انتخاب شد. این سویه پس از تعیین توالی به‌عنوان Citreicella thiooxidans شناسایی شد. به‌علاوه نتایج آنالیزهای فیزیکوشیمیایی نشان داد، پلیمر زیستی استخراج‌شده، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) است.

نتیجه‌گیری: این پژوهش اولین گزارش از تولید PHB توسط سویه Citreicella thiooxidans بومی ایران است که در آن غربالگری و شناسایی باکتری تولیدکننده و تعیین نوع پلیمر زیستی تولیدشده 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 جداشده توانایی بالقوه‌ای در تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات دارد.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

مقدمه

امروزه حجم زیادی از پلاستیک‌های مصرفی در بازار از فرآورده‌های نفتی به‌دست می‌آیند و برگشت آنها به محیط، چند هزار سال طول می‌کشد [1]. علت اصلی زیست‌تخریب‌ناپذیربودن این پلاستیک‌ها این است که موجودات تجزیه‌کننده به‌دلیل بلندی طول مولکول پلیمر و پیوند قوی بین مونومرهای آن نمی‌توانند آن را تجزیه کنند [2]. بنابراین، پژوهشگران درپی جایگزینی پلاستیک‌های زیستی یا تجزیه‌پذیر با این پلاستیک‌ها هستند. پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (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 پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها را تولید و ذخیره کنند. Bacillus، Azotobacter، Alcaligenes، Pseudomonas و Rhizobium ازجمله 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، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات داخل سلول تولید و ذخیره می‌شود. علاوه‌بر محدودیت در عناصر یادشده، محدودیت موادی مانند آهن، منگنز، منیزیم، پتاسیم وسدیم هم می‌تواند موجب تولید بیشتر پلیمر زیستی شود [1, 3].

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها 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 پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با طول زنجیره بلند نامیده می‌شوند [4]. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB)، رایج‌ترین نوع پلیمر زنجیره کوتاه و هموپلیمری از 3-هیدروکسی بوتیریک اسید است. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات یک ترموپلاستیک با خصوصیات مکانیکی بسیار خوب مشابه پلی پروپیلن است. بیشترین گزارش‌ها درباره تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات 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 به‌خوبی مطالعه شده‌اند. در باکتری‌ها سنتز پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از استیل کوآنزیم آ به واسطه فعالیت متوالی سه آنزیم انجام می‌شود. ابتدا آنزیم بتا کتو تیولاز 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 ردوکتاز وابسته به NADP انجام می‌شود. درنهایت با فعالیت آنزیم سنتتاز مونومرهای مورد نظر به یکدیگر متصل و زنجیره‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها ساخته می‌شوند [5].

به‌دلیل داشتن ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی خاص، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها می‌توانند کاربردهای تکنیکی فراوانی داشته باشند. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با داشتن خصوصیات مشابه پلی اتیلن گلیکول گزینه مناسبی در صنایع بسته‌بندی به‌شمار می‌روند [6]. همچنین، به‌دلیل تجزیه‌پذیری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در خاک می‌توان برای محافظت از بذر از حشره‌کش مناسبی که در پوششی از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات قرار گرفته است، استفاده کرد. فعالیت باکتری‌های تخریب‌کننده پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات سبب آزادشدن تدریجی حشره‌کش می‌شود [7]. از تجزیه پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در بدن انسان، هیدروکسی بوتیریک اسید تولید می‌شود که یک ماده حد واسط برای متابولیت‌ها محسوب می‌شود [8]. بنابراین، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با سلول‌های زنده کاملاً سازگار هستند و به‌دلیل داشتن ویژگی‌های تجزیه‌پذیری زیستی و سازگاری زیستی می‌توان از آن به‌عنوان نخ بخیه، داربست زخم، پچ پریکارد در جراحی قلب و رهایش کنترل‌شده دارو در پزشکی و داروسازی استفاده کرد [9, 10]. در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای درباره بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی انجام شده است. اما با وجود این تلاش‌ها، تولید تجاری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به‌دلیل هزینه‌های بالای فرایند تولید همچنان محدود است. عوامل متعددی بر هزینه تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها تأثیر می‌گذارند که مهم‌ترین آن میزان تجمع پلیمر در سلول، میزان استحصال، قیمت سوبسترا و بازدهی تولید به‌ازای واحد سوبسترا است. قیمت منبع کربن عاملی اساسی در قیمت تمام‌شده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات است و تقریباً 38 درصد از کل هزینه تولید را شامل می‌شود [11].

در حال حاضر، استفاده از پساب‌های صنعتی و کشاورزی به‌عنوان منبع کربن و انرژی ارزان‌قیمت برای کاهش هزینه‌های تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها پیشنهاد می‌شود. ملاس [12]، وینـاس [13]، پساب کارخانجات لبنیات [14]، محصول فرعی نشاسته سیب زمینی [15] و چندین منبع دیگر برای تولید اقتصادی این پلیمر زیستی بررسی شده‌اند. بااین‌حال مطالعات محدودی درباره استفاده از پساب‌های پالایشگاه‌های نفتی انجام شده و تاکنون هیچ پژوهشی درباره کاربرد پساب نفتی به‌عنوان تنها منبع دردسترس باکتری جهت رشد و تولید پلیمر زیستی انجام نشده است. این تحقیق برای بررسی این موارد، به غربالگری سویه‌ها با قابلیت بهره‌دهی بالا و رشد مناسب با استفاده از پساب نفتی می‌پردازد. ازآنجاکه جداسازی سلول‌های باکتریایی تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از رسوبات نفتی اعماق خلیج فارس انجام می‌گیرد، فرضیه آن است که قدرت سازگاری سویه‌های مولد با محیط کشت پساب نفتی، بر افزایش بهره‌وری تولید تأثیر مثبتی داشته باشد. به‌همین‌منظور، در مرحله اول پژوهش، برای اولین‌بار برای جداسازی سویه‌های 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 هیچ‌گونه مکملی بررسی شد. درانتها ساختار فیزیکوشیمیایی پلاستیک زیستی تولیدشده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها: ازآنجاکه رسوبات نفتی غنی از کربن هستند و نیتروژن و فسفر کمی دارند، در این پژوهش، از مجموع بیش از 1000 سویه باکتری‌هایی که طی یک پروژه غربالگری از رسوبات اعماق خلیج فارس و از قسمت‌های آلوده به نفت جدا شده بودند، به‌عنوان منبع غربالگری باکتری‌های مولد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استفاده شد. به این منظور، سویه‌هایی که سرعت رشد بالاتر و کلنی‌های درشت‌تر داشتند، برای بررسی انتخاب و روی سطح پلیت حاوی محیط کشت Marine agar کشت داده و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرماگذاری شدند [16]. در مرحله بعد براساس رنگ‌آمیزی سودان سیاه بررسی و غربالگری اولیه شدند.

تهیه محیط پیش‌کشت: محیط پیش کشت Marine broth متشکل از ترکیبات مشابه با آب دریا در ارلن‌های 250 میلی‌لیتر تهیه و پس از تنظیم pH روی 7، به مدت 15 دقیقه در 121 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد [16]. هر سویه مورد بررسی در فلاسک جداگانه‌ای تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای 1±28 درجه سانتی‌گراد و سرعت 110 دور بر دقیقه گرماگذاری شد. جذب نوری نمونه‌ها (OD) با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) در طول موج 625 نانومتر هر 3 ساعت یک بار اندازه‌گیری شد. هنگامی‌که غلظت سلولی در محیط Marine broth برابر 1 مک‌فارلند (3×10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) شد، 2/5 میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت به ارلن‌های حاوی 50

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

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

تهیه محیط کشت صنعتی تولید: پساب نفتی شرکت پتروشیمی بندر امام جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای 2 تا 4 درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. طبق آنالیزهای انجام‌شده، میزان اکسیژن‌خواهی شیمیایی[1] و اکسیژن‌خواهی زیستی[2] به‌ترتیب (931 میلی‌گرم در لیتر) و (88 میلی‌گرم در لیتر) اندازه‌گیری شد. براساس نتایج آنالیزهای واحد تولیدی، پساب مورد نظر حاوی 4/83 میلی‌گرم در لیتر نیترات و 0/37 گرم در لیتر فسفر بود. برای ازبین‌بردن مواد جامد معلق، نمونه‌های اتوکلاوشده در سانتریفیوژ با گرانش 5500g به‌مدت 15 دقیقه رسوب داده شدند. سپس، مایع رویی جدا و به‌عنوان محیط کشت تولید برای بررسی میزان تولید پلیمر زیستی توسط سویه‌های باکتریایی انتخاب‌شده، استفاده شد.

انتخاب سویه برتر براساس بازدهی تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: برای ارزیابی بازدهی و بهره‌وری تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، 50 میلی‌لیتر پساب نفتی صاف‌شده از مرحله قبل به‌عنوان محیط کشت تولید به ارلن‌های 250میلی‌لیتری منتقل و پس از تنظیم pH محیط روی 7، به‌عنوان محیط کشت استفاده شد. سپس به میزان 5٪ (حجمی/حجمی) از هریک از محیط‌های پیش‌کشت مربوط به باکتری‌های انتخاب‌شده به آنها تلقیح شد. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با سرعت 110 دور بر دقیقه و دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت گرماگذاری شدند. جذب نوری (OD) محیط کشت و میزان تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات هر 3 ساعت یک بار اندازه‌گیری شد. سویه باکتریایی با بالاترین بهره‌وری تولید پلیمر زیستی برای مطالعات بیشتر انتخاب شد.

خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی باکتری برتر انتخاب‌شده: 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

16sF-5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´ و

16sR-5´ ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3´

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

روش استخراج پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات: محیط کشت‌های حاوی نمونه در سانتریفیوژ با 7000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه رسوب‌گذاری شدند. 10 میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت‌سدیم (5% کلر فعال با pH برابر با 10) به رسوب باکتری اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت دو ساعت گرماگذاری شدند [17]. پس از سانتریفیوژ، یک محلول سه‌لایه (تری فازیک) با لایه بالایی آب، لایه مرکزی بقایای سلولی و لایه زیرین محلول کلروفرم به‌دست آمد. قسمت کلروفرم جدا و در آون با دمای 55 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از تبخیر کامل کلروفرم، یک فیلم سفید رنگ از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به‌دست آمد که برای تعیین غلظت پلیمر زیستی تولیدشده با روش سنجش اسید کروتونیک بررسی شد. پس از غربالگری باکتری‌ها و

۱. COD: Chemical Oxygen Demand
۲. BOD: Biological Oxygen Demand

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

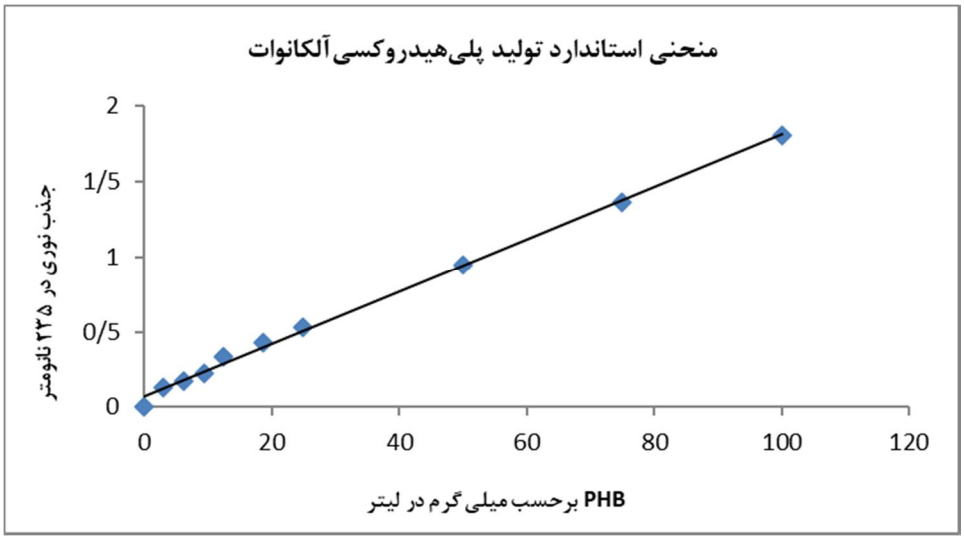
اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات ذخیره‌شده توسط سویه منتخب، ازآنجاکه میزان تولید بالایی از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در مقادیر گرم بر لیتر مشاهده شد، روش محاسبه به توزین محصول تغییر یافت (شکل 1). وزن نمونه‌های استخراج‌شده با مقایسه آن با اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات و با استفاده از روش اسید کروتونونیک تأیید شد.

شکل 1. پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولیدشده توسط سویه برتر در محیط کشت صنعتی پساب نفتی

اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با استفاده از روش اسید کروتونونیک: غلظت پایین پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در نمونه‌ها را با استفاده از روش اسپکتروفتومتری می‌توان اندازه‌گیری کرد. اساس این روش بر پایه تبدیل پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به اسید کروتونیک، با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ و حرارت است. جذب نوری اسید کروتونیک حاصل به‌وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) اندازه‌گیری شد. درمجموع، 10 میلی‌لیتر H_2SO_4 غلیظ به پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌های استخراج‌شده اضافه و به مدت 10 دقیقه در 100 درجه سانتی‌گراد در یک حمام آب گرم قرار داده شد تا پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به اسید کروتونیک تبدیل شود. سپس جذب محلول در 235 نانومتر در برابر محلول بلانک که اسید سولفوریک جوشیده بود، اندازه‌گیری شد[18]. منحنی استاندارد با استفاده از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص از شرکت سیگما ترسیم شد. به این منظور مقادیر مختلف (0 تا 100 میکروگرم) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استاندارد در 10 میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ و داغ حل، جذب نمونه‌ها در 235 نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد رسم شد (شکل 2).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]



شکل 2. منحنی استاندارد و جذب نوری کروتونیک اسید حاصل از مقادیر مشخص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات که با اسیدسولفوریک غلیظ هیدرولیز شده‌اند.

تخمین وزن خشک سلولی: برای تخمین وزن خشک سلولی، 10 میلی‌لیتر محیط کشت تولید با سانتریفیوژ 7000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه رسوب‌گذاری شد. پس از سه بار شستشو با آب مقطر، رسوب باکتریایی در دمای 55 درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد تا وزن ثابت به‌دست آید [19].

میزان تولید، اندازه‌گیری درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات: برای سنجش کمی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، پلیمر استخراج‌شده با ترازوی دقیق عددی توزین و درصد تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات براساس نسبت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولیدی در وزن خشک سلولی طبق رابطه زیر محاسبه شد. میزان بهره‌وری نیز با محاسبه نسبت تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در هر ساعت مطابق رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{درصد تجمع پلیمر} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج‌شده (گرم)}}{\text{وزن خشک سلولی (گرم)}} \times 100 \quad \text{رابطه (1)}$$

$$\text{بهره‌وری} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج‌شده (گرم)}}{\text{زمان (ساعت)}} \quad \text{رابطه (2)}$$

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلیمر زیستی استخراج‌شده

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریر (FTIR): طیف‌سنجی تبدیل فوریر مادون قرمز تکنیکی بسیار مفید برای شناسایی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی است. گروه‌های مهم عاملی موجود در پلیمر زیستی استخراج‌شده با استفاده از طیف‌سنجی FTIR مشخص شدند. نمونه‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با 2٪ KBr مخلوط نیز به‌صورت قرص‌های مخصوص برای آنالیز آماده و در طیف سنج FTIR (Bruker IFS 120 HR) قرار داده شدند [20].

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (^{1}HNMR): طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای نقش بسیار مهمی در یافتن ساختار گسترده مولکول دارد. ^{1}H-NMR برای تشخیص بین 3-هیدروکسی‌بوتیرات با دیگر اسیدهای چرب 3-هیدروکسی در یک هتروپلیمر

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات استفاده می‌شود. طیف ^{1}H-NMR با حل‌کردن بیوپلیمر استخراج‌شده در دوتروکلروفرم ($CDCl_3$) 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 استخراج‌شده، 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 جداسازی‌شده از رسوبات نفتی خلیج فارس که محققان سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جمع آوری 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. ازآنجاکه رنگ‌آمیزی روشی دقیق برای غربالگری سویه‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات 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 پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات زیادی تولید کردند که نتایج آن در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول 1. میزان وزن خشک و تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در سویه‌های باکتری با قابلیت تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در محیط کشت صنعتی

سویه	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولیدشده (گرم در لیتر)*	درصد تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات	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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

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، به‌دلیل میزان کم تولید پلیمر زیستی در آن، تولید و بهره‌وری پایینی خواهد داشت.به همین‌ترتیب سویه Sb_6 با بالاترین درصد تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات نمی‌تواند سویه انتخابی باشد. در تمام موارد، آزمون دانکن اختلاف معنادار 5درصدی (P value < 0.05) را بین میانگین‌ها نشان داد. بنابراین، سویه Sb_8 با بالاترین میزان بهره‌وری به‌عنوان سویه برتر برای مراحل بعدی غربالگری شد.

بررسی مورفولوژیکی و شناسایی مولکولی سویه برتر: نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نشان داد، باکتری غربال‌شده گرم منفی، لیمویی‌شکل، هوازی و غیر متحرک است. بررسی میزان تطابق ژنتیکی ژن‌های تکثیرشده با سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI تشابه 99% بین سویه غربال‌شده و گونه باکتریایی اکسیدکننده گوگرد با نام Citreicella thiooxidans را نشان می‌دهد که اولین‌بار در سال 2005 از دریای سیاه جداسازی و شناسایی شده است [22]. به‌این‌ترتیب، این سویه با عنوان فرضی Citreicella thiooxidans شناسایی شد. درنهایت، با استفاده از نرم‌افزار MEGA درختچه فیلوژنتیکی باکتری مذکور ترسیم شد. این درختچه در شکل 3 نشان داده شده است.

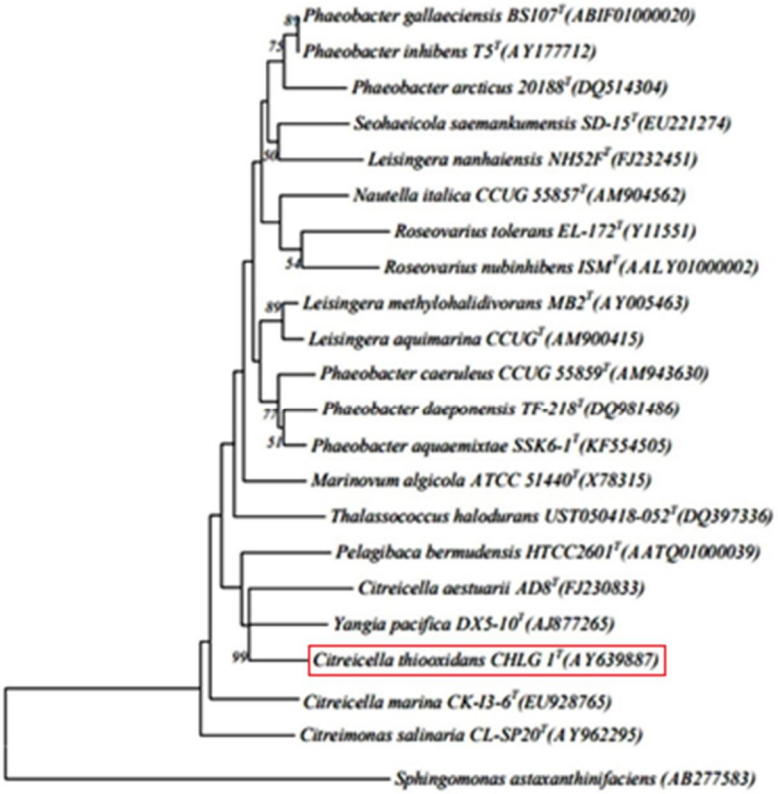
تاکنون سویه‌های بسیاری شناسایی شده‌اند که می‌توانند پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید کنند. همچنین، تلاش برای یافتن سویه‌هایی با ویژگی‌های برتر بیوتکنولوژی از اهمیت خاصی برخوردار بوده است. این ویژگی‌ها عبارت‌اند از: سرعت تولید بیشتر، دمای مناسب رشد، تولید بالاتر و همچنین توانایی استفاده از طیف وسیع و متنوع منابع کربنی ارزان‌قیمت. در این تحقیق سویه Citreicella thiooxidans به‌عنوان بهترین سویه تولیدکننده معرفی شد. تابه‌حال فعالیت بیماری‌زایی برای این سویه در گیاهان و جانوران گزارش نشده است. همچنین، این ارگانیسم 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، سیترات، پروپیونات، بوتیرات، گلی اکسالات، گلوکونات، گلیکولات و بسیاری سوبستراهای دیگر ثابت کردند. نتایج مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه برتر جداسازی‌شده در این پژوهش، کاملاً بر نتایج تحقیقات Sorokin و همکارانش منطبق است [22]. با وجود اینکه این محققان در سلول‌های باکتریایی رشدیافته وجود گرانول‌های درشت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را به اثبات رساندند، تاکنون گزارشی درباره میزان تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از این سویه چاپ نشده است.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

به ترکیبات مفیدی چون پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها 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، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات 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 پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات 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 پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات دارد. این خصوصیت بارز می‌تواند شرایط استفاده از این سویه را به‌عنوان یک سویه بیوتکنولوژیکی برای تولید انبوه پلیمر زیستی فراهم کند.

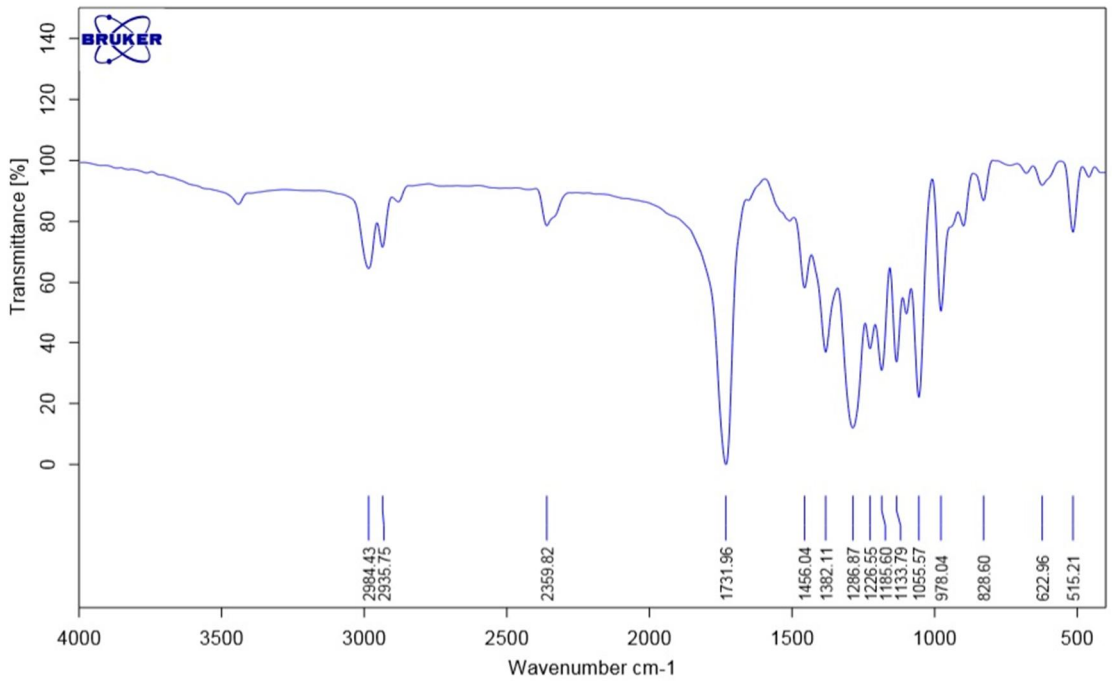


شکل 3. درختچه فیلوژنتیکی سویه باکتریایی Citreicella thiooxidans

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

شناسایی فیزیک و شیمیایی پلیمر زیستی استخراج‌شده طیف‌سنجی 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 به‌کار رود. در شکل 4، طیف FTIR پلیمر زیستی استخراج‌شده نشان داده شده است.



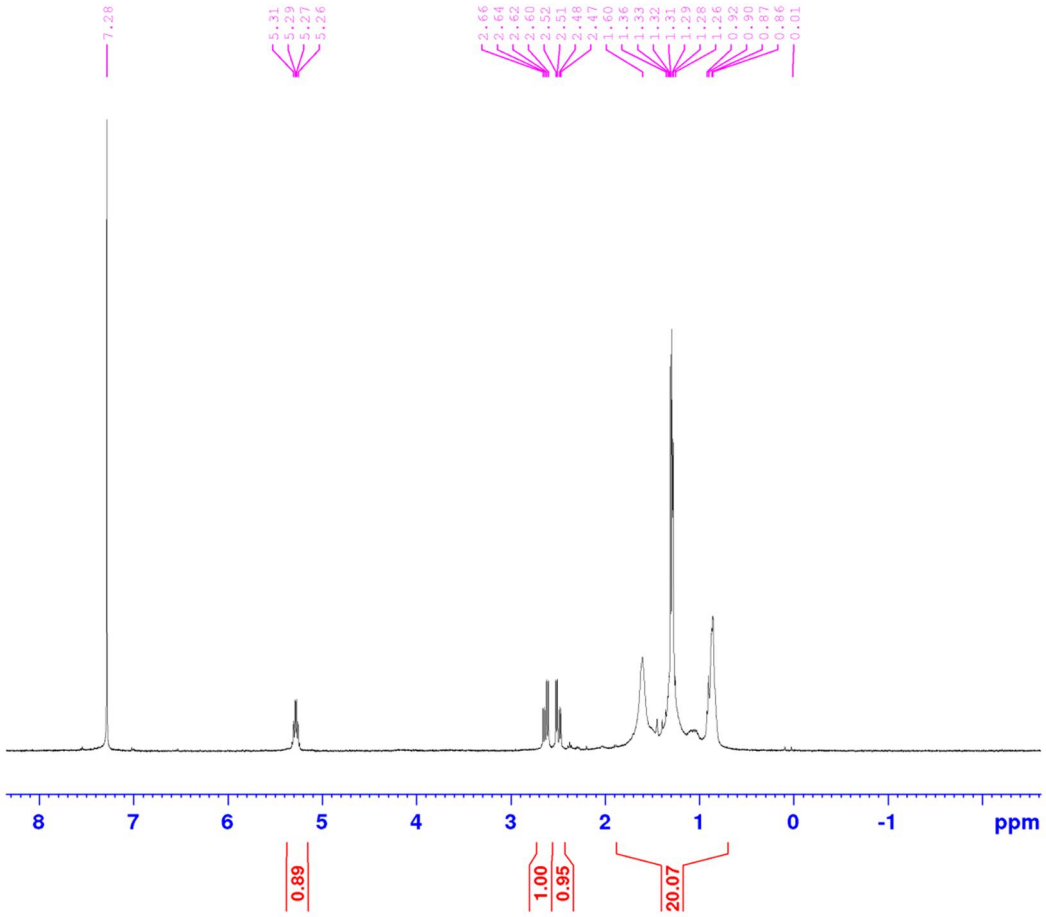
شکل 4. طیف FTIR پلیمر زیستی استخراج‌شده از باکتری *Citreicella thiooxidans*

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 $2935cm^{-1}$ دیده می‌شوند. باند ناحیه $2359cm^{-1}$ مربوط به دی‌اکسیدکربن اتمسفر است. باند کربونیل استر یعنی باند شاخص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات 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 $500cm^{-1}$ و $1500cm^{-1}$) در تشخیص نهایی پلیمر زیستی نقش دارند. باندهای $1456cm^{-1}$ و $1382cm^{-1}$ به‌ترتیب به گروه متیل (Asymmetric bending) و (Symmetric bending) مربوط هستند. باند $1286cm^{-1}$ وجود عامل کربنی متیلن Wagging را نشان می‌دهد. دو باند بعدی به‌ترتیب به گروه‌های Asymmetric C-O-C و Symmetric مربوط می‌شوند و دو باند آخر پیوندهای C-O و C-C را نشان می‌دهند. تفسیر این باندها وجود پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را اثبات می‌کند [21, 27].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

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



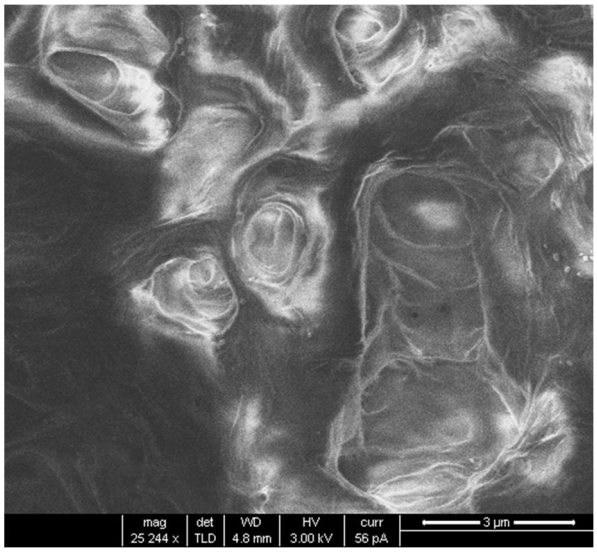
شکل 5. طیف ^{1}HNMR پلیمر زیستی استخراج‌شده از باکتری Citreicella thiooxidans جداسازی‌شده

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، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات‌بودن پلیمر زیستی استخراج‌شده را تأیید می‌کنند [21].

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): براساس تصویر 6 فیلم خالص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استخراج‌شده سطحی کاملاً صاف و بدون ترک دارد. همچنین، بیوفیلم حاصل کاملاً متخلخل و اندازه منافذ آن نیز تقریباً یکنواخت است. این منافذ صدفی‌شکل 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 کنترل‌شده دارو نشان می‌دهد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]



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

نتیجه‌گیری

در جنوب ایران به‌دلیل 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 به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشته باشد، از جنبه اقتصادی و زیست محیطی حائز اهمیت است. به نظر می‌رسد با بررسی بیشتر، این پساب به‌عنوان منبع کارآمدی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به‌کار 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 (Citreicella thiooxidans) در استفاده از فاضلاب نفتی به‌عنوان 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. ازاین‌رو، 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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

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. Appllied 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.

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. Sathiyanarayanan, 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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

22. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., and Muyzer, G.

(2005) Citreicella 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.

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 polyhydroxyalkonates 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 دراختیارگذاشتن بانک سویه‌های جداسازی‌شده از رسوبات نفتی خلیج فارس و همچنین سرکار خانم دکتر محسنی برای حمایت در شناسایی مولکولی سویه غربال‌شده تشکر می‌کنیم.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

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

Neda Sinaei[1], Davood Zare[2*], Mehrdad Azin[3]

[1]PhD, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
[3]Professor, 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 *Citreicella 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 *Citreicella 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.3.5]