

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

SHOBOO SALEHPOUR¹, MEHDI JONOABI^{2*}, MAJID KHANALI³

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Poly (vinyl alcohol), 16SrDNA .PCR, *Pseudomonas geniculata*

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

شوبو صالح‌پور^۱، مهدی جنوبی^{۲*}، مجید خانعلی^۳

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

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

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

(تاریخ ارسال: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵)

چکیده

آلودگی زیست محیطی ناشی از پلیمرهای نفتی و محدودیت منابع نفتی باعث توسعه پلیمرهای زیست‌پایه و حرکت به‌سوی کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی شده است. در سال‌های اخیر پلی‌وینیل الکل (PVA) به دلیل حلالیت در آب، غیر سمی بودن، مقاومت شیمیایی عالی، خواص بازدارندگی مناسب و زیست تخریب‌پذیری توجه زیادی را به خود جلب کرده است. علیرغم استفاده روزافزون آن، اطلاعات در مورد تخریب آن به‌ویژه نقش باکتری‌ها در این فرآیند، نسبتاً کم است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری است. نمونه‌برداری در طی فرآیند تولید کمپوست از زباله‌های جامد شهری در کارخانه کمپوست کرج انجام شد. فیلم‌های پلی‌وینیل الکل با استفاده از نیتروژن مایع، خشک‌کردن انجام‌داده و پرس داغ تهیه شدند. فیلم‌های پلی‌وینیل الکل به مدت ۱۵۰ روز در داخل کمپوست زباله‌های جامد شهری دفن شدند. سپس تعداد باکتری‌ها در محیط کشت شمارش گردید. یک سویه باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل الکل از کمپوست زباله‌های جامد شهری جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس با انجام PCR با روش 16S rDNA باکتری مورد نظر شناسایی شد. در این مطالعه، بیشترین تعداد باکتری در محیط کشت حاوی کمپوست و فیلم‌های پلی‌وینیل الکل $280 \pm 0/1$ و کمترین تعداد باکتری $110 \pm 0/3$ در محیط کشت کنترل به‌دست آمد. بعد از شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن 16S rDNA، بلاست توالی شباهت بالای نمونه با *Pseudomonas geniculata* را نشان داد. مطالعه حاضر، اولین گزارش تخریب پلی‌وینیل الکل توسط *Pseudomonas geniculata* می‌باشد.

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

مقدمه

بر اساس برآوردهای صورت گرفته همه‌ساله نزدیک به ۱۴۰ میلیون تن پلاستیک‌های سنتزی از مشتقات نفتی در دنیا تولید می‌شوند که بخش مهمی از این مواد را بسته‌بندی‌های یک‌بار مصرف مورد استفاده در صنعت غذا تشکیل می‌دهند (Shah et al., 2008; Phua et al., 2011). یکی از بزرگترین مشکلات این مواد، عدم زیست‌تخریب‌پذیری آنها و در نتیجه آلودگی محیط زیست می‌باشد. تأثیرات مخرب محیطی ناشی از تجمع مواد پلاستیکی و غیر تخریب‌پذیر یکی از مهمترین نگرانی‌ها در جهان امروز است (Hopewell et al., 2009). یکی از راه‌کارهای مهم برای حل مشکل تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت، استفاده از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر است (Shah et al., 2008). از آنجا که زیست پلیمرها از منابع تجدیدپذیر به‌دست

آمده و زیست تخریب‌پذیرند، بنابراین استفاده از آنها در مقایسه با پلیمرهای بر پایه ترکیبات نفتی دارای حداقل آثار منفی زیست محیطی است (Silverio et al., 2013; Marvast, et al., 2013). پلی‌وینیل الکل یکی از پلیمرهای سازگار با طبیعت و محلول در آب بوده که دارای خواص بسیار عالی و امولسیون‌کننده در محیط هست (Silvério et al., 2013). این پلیمر توانایی تشکیل فیلم‌های شفاف، زیست تخریب‌پذیر، انعطاف‌پذیر با پایداری حرارتی و مقاومت شیمیایی مطلوب دارد و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان لیف، فیلم، در صنعت کاغذ و صنعت پارچه-سازی، همچنین به‌عنوان بهبوددهنده رزین ترموست و در ساخت چند لایه‌ها به کار می‌رود (Silvério et al., 2013). پلی-وینیل الکل، جزء معدود پلیمر وینیلی محلول در آب است که استعداد تخریب زیستی کامل در حضور میکروارگانیسم‌های را دارد (Campos et al., 2011). درجه پلیمریزاسیون (DP) و درجه هیدرولیز (DS) عوامل مؤثر بر تجزیه بیولوژیکی پلی‌وینیل

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

و *Bacillus pseudomonas* sp VM15A (Shimao et al., 1986) و *megaterium* PN19 (Kim and Rhee, 2003) و *Sphingomonas* sp SA3 و SA2 (Chandra and Rustgi, 1998).

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

مواد و روش ها

در این تحقیق، محیط کشت آگار (TSB)^۱، نوترینت آگار و پلی وینیل الکل (PVA) با وزن مولکولی 1×10^5 g.mol⁻¹ به عنوان ماده زمینه پلیمری از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

تولید فیلم های پلی وینیل الکل

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

الکل هستند (Campos et al., 2011). مکانیسم تخریب پلی- وینیل الکل شامل دو مرحله است: مرحله اول گسست پیوند کربن-کربن پلیمر پلی وینیل الکل توسط آنزیم های خارج سلولی است و مرحله دوم جذب سلولی قطعات پلی وینیل الکل با وزن مولکولی پایین تر که در داخل سلول رخ می دهد، است (Corti et al., 2002). اولین تخریب پلی وینیل الکل توسط قارچ *Fusarium lini* B گزارش شده است (Fusako and Hu, 2009). تخریب زیستی پلی وینیل الکل در شرایط مختلف مانند خاک (Chiellini et al., 2003)، کمپوست (Liu et al., 2009)، لجن (Porter and Snider, 1976; Chiellini et al., 2003) و زباله های جامد شهری (Salehpour et al., 2018) مورد بررسی قرار گرفته است. در چند سال گذشته، طیف وسیعی از میکروارگانسیم ها که می توانند پلی وینیل الکل را تجزیه کنند، شناسایی شده اند (Sakazawa et al., 1981; Corti et al., 2002; Du et al., 2007; Chen et al., 2007; Leja and Lewandowicz, 2010). بیشتر این گونه ها جدا شده باکتری- های، مانند *Pseudomonas* sp (Watanabe et al., 1976; Hatanaka et al., 1995; Mori et al., 1997; Semenov et al., 2003; Lodha, 2004) *Alcaligenes faecalis* (Matsumara et al., 1994; Corti et al., 2002)، *Bacillus megaterium* (Mori et al., 1996; Corti et al., 2002)، *Penicillium* sp، *Flammulina velatipes* (Chiellini et al. 1999; Tsujiyama et al., 2011)، *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahemolyticus* (Raghul et al., 2014)، فقط *Stenotrophomonas* sp (Ullah et al., 2017) تعداد محدودی از این باکتری ها می توانند پلی وینیل الکل را در محیط کشت خالص تخریب کنند (Corti et al., 2002; Chen et al., 2007). یکی از باکترهای مهم در زمینه تخریب زیست پلی وینیل الکل گونه *Pseudomonas* است که تاکنون گزارش- های متعددی درباره تجزیه پلی وینیل الکل توسط این باکتری در شرایط مختلف ارائه شده است (Suzuki et al., 1973; Sakazawa et al., 1981; Shimao et al., 1982; Hatanaka et al., 1995; Premraj and Doble, 2005; Leja and Lewandowicz, 2010). اولین گزارش از تجزیه کامل پلی- وینیل الکل توسط باکتری *Pseudomonas* O-3 در سال ۱۹۸۱ ارائه شد که از پلی وینیل الکل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می کند (Sakazawa et al., 1981). تخریب زیستی پلی- وینیل الکل معمولاً به آسانی رخ نمی دهد در بسیاری از موارد، تجزیه پلی وینیل الکل نیاز به همکاری دو گونه دارد، همانطور که توسط چندین گروه تحقیقاتی اثبات شده است، ظرفیت بسیاری از گونه های تخریب کننده پلی وینیل الکل برای استفاده از پلی وینیل الکل اغلب متکی بر همکاری با باکتری های دیگر است، به عنوان مثال *Pseudomonas* sp. VM15C

1. Tryptic Soy Broth

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

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پلی‌وینیل‌الکل

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

خواص شیمیایی کمپوست

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

طریق معادله ۱، درصد کربن محاسبه شد (Phillip, 2010).

(رابطه ۱) $1/8 \text{ (خاکستر-1)} = (\text{.}) / \text{درصد کربن}$

شمارش جمعیت باکتری‌ها

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

خالص‌سازی باکتری تجزیه‌کننده پلی‌وینیل‌الکل

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

شناسایی مولکولی باکتری

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

Bioneer کره جنوبی فرستاده شد. توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast در بانک ژن با دیگر توالی های موجود در این پایگاه اطلاعاتی مقایسه شدند. درختچه فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA5 به روش neighbour joining ترسیم شدند. بر اساس حداقل خطا از درخت توپولوژی Boot strap ۱۰۰ تکرار بود (Tamura et al., 2007).

روش آماری

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

نتایج و بحث

خواص شیمیایی کمپوست

نتایج خواص شیمیایی کمپوست (شاهد) و کمپوست حاوی فیلم های پلی وینیل الکل قبل و بعد از تخریب زیستی در جدول (۱) ارائه شده است. همانطور که از جدول (۱) مشاهده می شود، نسبت C/N کمپوست قبل از تخریب زیستی ۳۰ بود. در حالیکه بعد از تخریب زیستی نسبت C/N کاهش یافت. میزان شوری کمپوست (شاهد) بعد از ۱۵۰ روز ۰/۱۸ μS/cm بود. در حالیکه در نمونه های کمپوست حاوی فیلم های پلی وینیل الکل خالص و نانو چندسازه ای میزان شوری کاهش یافت.

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

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

انجام شد (Zakaria et al., 2010). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر طبق مراحل زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه در دمای °C ۹۴ برای سه دقیقه، یک سیکل شامل واسرشت سازی در دمای °C ۹۴ برای ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای °C ۵۶ برای ۴۰ ثانیه، توسعه در دمای °C ۷۲ برای یک دقیقه و یک مرحله توسعه نهایی^۱ برای ۱۰ دقیقه. پس از انجام PCR، DNA تکثیر یافته باکتری ها روی ژل آگاروز قرار داده شد. پس از گرفتن باند مناسب، نمونه ها جهت تعیین توالی به شرکت

1. Final Extention

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

نمونه		قبل از تخریب		بعد از تخریب	
	Ec	C/N	محتوای کربن (mg g ⁻¹)	Ec	C/N
کمپوست (شاهد)	۰/۲۲±۰/۱	۳۰±۰/۱	۲۶±۰/۲	۰/۱۸±۰/۱	۱۹±۰/۲
کمپوست+PVA	۰/۲۲±۰/۱	۳۰±۰/۱	۲۶±۰/۲	۰/۱۶±۰/۲	۲۲±۰/۱

در کمپوست حاوی فیلم های پلی وینیل الکل اشاره کرد. از عوامل مؤثر بر جمعیت باکتری ها، شوری کمپوست است (Teimouri et al., 2005). هر چه میزان شوری کمپوست کمتر باشد باکتری های بیشتری قادر به ساکن شدن در آن خواهند بود. عامل دیگری که می تواند محدود کننده تعداد کل باکتری ها باشد میزان مواد آلی کمپوست است. زیرا باکتری تجزیه کننده از نوع هتروتروف بوده و برای رشد به مواد آلی به عنوان منبع کربن نیاز دارند (Teimouri et al., 2005). وجود میزان بالاتری از کربن در کمپوست حاوی فیلم های پلی وینیل الکل نشان دهنده فروانی بیشتر باکتری ها در این محیط است.

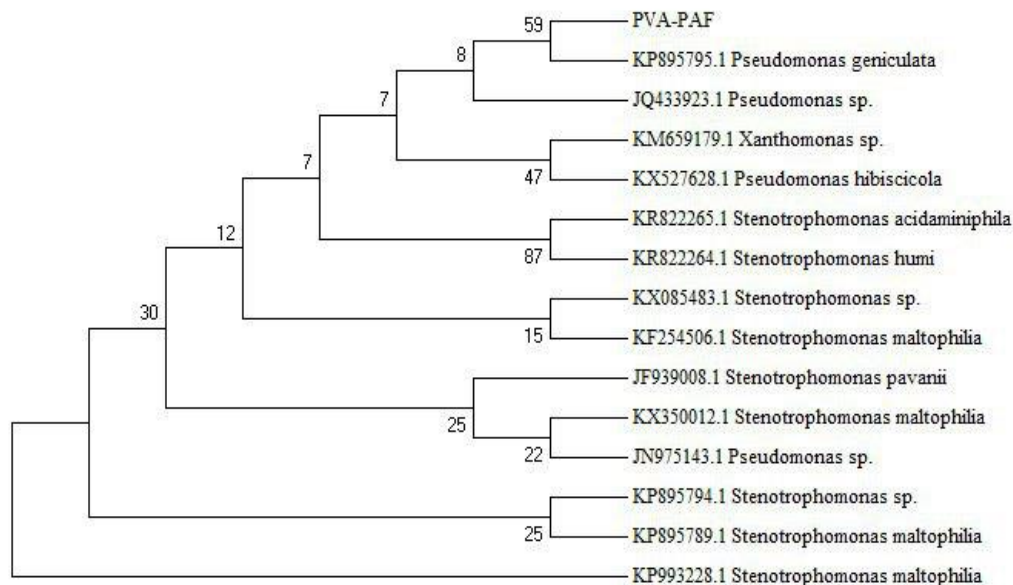
شمارش جمعیت باکتری ها

میانگین تعداد باکتری ها در محیط کشت کنترل در رقت های (۱۰^{-۸} و ۱۰^{-۹}) به ترتیب ۲۰۵ و ۱۱۰ (cfu/g) بود. با افزودن فیلم های پلی وینیل الکل تعداد باکتری ها افزایش یافت. میانگین تعداد باکتری ها در کمپوست حاوی فیلم های پلی وینیل الکل در رقت های (۱۰^{-۸} و ۱۰^{-۹}) ۲۸۰ و ۱۹۰ (cfu/g) بود (جدول ۱). در مقایسه رقت ها از نظر میانگین تعداد باکتری ها، بیشترین تعداد باکتری ها در محیط کشت حاوی کمپوست و فیلم های پلی وینیل الکل در رقت ۱۰^{-۷} و کمترین تعداد باکتری های در محیط کشت کنترل در رقت ۱۰^{-۹} مشاهده شد. این افزایش در تعداد باکتری ها را می توان به کاهش شوری و افزایش مواد آلی

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

نمونه	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-7} (cfu/g)	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-8} (cfu/g)	میانگین تعداد کل باکتری‌ها در رقت 10^{-9} (cfu/g)
کمپوست	غیر قابل شمارش	$280 \pm 0 / 1^a$	$205 \pm 0 / 3^a$
کمپوست+PVA	غیر قابل شمارش	$190 \pm 0 / 3^b$	$110 \pm 0 / 3^b$

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



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

الکل هستند (Leja and Lewandowicz, 2010). از این میان باکتری‌های *Pseudomonas sp* (Watanabe et al., 1976; Hatanaka et al., 1995; Mori et al., 1997; Semenov et al., 2003; Lodha, 2004) *Bacillus megaterium* (Mori et al., 1994; Corti et al., 2002) *Penicillium sp*, (et al., 1996; Corti et al., 2002) *Flammulina velatipes* (Chiellini et al. 1999; Tsujiyama) *Acinetobacter sp*. (Chandra and Rustgi) *Phanerochaete chrysosporium* Betty et al., (1998) *Pseudomonas vesicularis* PD (Watanabe et al., 1999) *Pseudomonas putida* (Shimao et al., 1982) *Achromobacter cholinophagum* (Lee and Kim 2003) *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahemolyticus* (Ullah et al., 2014) *Stenotrophomonas sp* (Raghul et al., 2017) گزارش شده است. باکتری‌های سودوموناس در ردیف جنس‌های باکتریایی معروف بوده و بسیاری از مطالعات قبلی نیز منجر به جداسازی گونه‌هایی از جنس این باکتری شده است (Suzuki et al., 1973; Sakazawa et al., 1981; Shimao et al., 1982; Premraj and Mukesh, (2005); Leja and Hashimoto and Fujita (2010). همچنین (Lewandowicz, 2010) (1985) نشان دادند، فیلم‌های پلی‌وینیل الکل توسط

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل

شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده فیلم‌های پلی‌وینیل الکل با تکثیر قسمتی از ناحیه 16S rDNA با پرایمرهای ویژه این ژن انجام شد. سپس محصول حاصل از ژل استخراج، خالص‌سازی و جهت تعیین توالی فرستاده شد. توالی حاصل شده در بانک جهانی ژنی ثبت شد. Accession number اختصاص داده شده به توالی ثبت شده KP895795.1 است. بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR و اطلاعات به دست آمده از بانک جهانی ژن درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم شد (شکل ۱). بر اساس نتایج به دست آمده از ترسیم درختچه فیلوژنتیکی، باکتری شناسایی شده به جنس *Pseudomonas geniculata* تعلق داشت. توالی به دست آمده در این تحقیق در پایگاه اطلاعاتی داده NCBI ثبت شد. شماره دستیابی به این جدایه در بانک ژنی NCBI به صورت جدایه sh212 با شماره MF578929 می‌باشد. گزارشات مختلفی نشان داده است که انواع مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه پلی‌وینیل

نتیجه گیری

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

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

REFERENCES

- Campos, A.D., Marconato J. C., and Martins-Franchetti S. M. (2011). Biodegradation of blend films PVA/PVC, PVA/PCL in Soil and Soil with Landfill Leachate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (6), 1367-1378.
- Chiellini, E., Corti, A., and Solaro R. (1999). Biodegradation of polyvinyl alcohol based blown films under different environmental conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 64, 305-312.
- Chiellini, E., Corti, A., Antone, S. D., and Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, 28, 963-1014.
- Chandra, R., and Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23, 1273-1335
- Chen, J., Zhang, Y., Du, G. C., Hua, Z. Z., and Zhu, Y. (2007). Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1686- 1691.
- Corti, A., Solaro, R., and Chiellini, E. (2002). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) in selected mixed microbial culture and relevant culture filtrate. *Polymer Degradation and Stability* 2002; 75, 447-45.
- Gomez, E. F., F, C., and Michel, J. r. (2013). Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 98, 2583-2591.
- Fourti, O., Jedidi, N., and Hassen, A. (2008). Behavior of main microbiological parameters and of enteric microorganisms during the composting of municipal solid wastes and sewage sludge in a semi Industrial composting plant. *American Journal of Environmental Sciences*, 4(8): 103-10.
- Fusakok, K., and HU, X. (2009). Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbial and Biotechnology*, . 84, 220-227.
- Jecu, L., Grosu, E., Raut, I., Ghiurea, M., Constantin, M., Stoica, A., Stroescu, M., and Vasilescu, G. (2012). Fungal degradation of polymeric materials. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 65, 97-104.
- Hopewell, J., Dvorak, R., and Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B*, 364, 2115-2126.
- Hatanaka, T., Asahi, N., and Tsuji, M. (1995). Purification and characterization of poly vinyl alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 113P3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1813-1816.
- Hashimoto, S., and Fujita, M. (1985). Isolation of bacterium requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation. *Journal of Fermentation Technology*, 63,471-474.
- Kim, D. Y., and Rhee Y. H. (2003). Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 300-308.
- Lodha, P. (2004). Fundamental approaches to improving performance of soy protein isolate based green' plastics and composites. Ph.D. dissertation, Cornell University..
- Liu, X., Sheng, X., Lee, J. K., and Kessler, M. R. (2009). The biodegradation of polymers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294, 21-35.
- Leja, K., and Lewandowicz, G., (2010). Polymer biodegradation and biodegradable polymers—a review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19, 255-266.
- Matsumara, S., Kurita, H., and Shimokobe, H (1994). Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters*, 15, 749-754.
- Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T., and Sakai, T. (1996). Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades polyvinyl alcohol. *Bioscience. Biotechnology and*

- Biochemistry*, 60, 330-332.
- Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T. and Sakai, T. (1997). Enzymatic desizing of polyvinyl alcohol from cotton fabrics. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, 151-156.
- Mollasalehi, S. (2013). Fungal biodegradation of poly (vinyl alcohol) in soil and compost environments. Ph. D. dissertation, University of Manchester.
- Premraj, P., and Doble, M. (2005). Biodegradation of polymers . *Indian journal of Biotechnology*, 4, 186-193.
- Phua, Y.J., Chow, W. S., and Mohd Ishak, Z. A. (2011). Mechanical properties and structure development in poly(butylensuccinate)/organo-montmorillonite nanocomposites under uniaxial cold rolling. *eXPRESS Polymer Letters*, 5, 93-103.
- Phillip, E.A. (2010). The design and construction of a pilot-scale compost reactor for the study of gas emissions from compost under different physical conditions. Ph. D. dissertation, University OF Montreal.
- Suzuki, T., Ichihara, Y., Yamada, M. and Tonomura, K. (1973). Some characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 747-756.
- Sakazawa C., Shimao, M., Taniguchi, Y., and Kato, N. (1981). Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 261-267.
- Shimao, M., Ninomiy, K., Kuno, O., Kato, N., and Sakazawa, C. (1982). Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinonedependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, Pseudomonas sp. strain VM15C. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 268-275.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 242 -247.
- Schadd, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. (pp. 76-336).
- Salehpour, Sh., Jonoobi, M., Ahmadzadeh, M., Siracusa, V., Rafieian, F., and Oksman, K. (2018). Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 264-270.
- Semenov, S. A., Gumargalieva, K. Z., and Zaikov, G. E. (2003). Biodegradation and durability of materials under the effect of microorganisms. *Boston, MA: VSP BV*.
- Shah, A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26, 246-265
- Silvério, H. A., Flauzino Neto, W. P. and Pasquini, D. (2013) Effect of incorporating cellulose nanocrystals from corncob on the tensile, thermal and barrier properties of poly(Vinyl Alcohol) nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 1-9 .
- Raghul, S. S., Bhat, S. G., Chandrasekaran, M., Francis, V., and Thachil, E. T. (2014). Biodegradation of polyvinyl alcohol-low linear density polyethylene-blended plastic film by consortium of marine benthic vibrios. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, 1827-1834.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007). Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 199-211.
- Tsujiyama, S.I., Nitta, T. and Maoka, T. (2011). Biodegradation of polyvinylalcohol by Flammulina velutipes in an unsubmerged culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122, 58-62.
- Teimouri, M., Korori, S.A.A., Matinizadeh, M., and Khoshnevis, M. (2005). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Vaz forest soil. *Pajouhesh ad Sazandegi*, 65, 57-64. (In Farsi)
- Ullah, M., Weng, C., Li, H., Sun, Sh., Zhang, H., Song, A. H., and Zhu. H. (2017). Degradation of polyvinyl alcohol by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas* sp SA21. *Environmental Technology*, 65, 1-6
- Watanabe, Y., Hamada, N., Morita, M. and Tsujisaka, Y. (1976). Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of Pseudomonas. *Biochemistry and Biophysics*, 174, 575-58.
- Zakaria, M. R., Tabatabaei, M., Ghazali, F. M., Abd-Aziz, S., Shirai, Y., Hassan, M. A (2010). Polyhydroxy alkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain *Comamonas* sp. EB172. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 767-774.