تجزیه زیستی پلی‌اتیلن با دانسیته پایین[1] توسط جدایه‌های قارچ و باکتری جدا شده از خاکهای مکانهای دفن زباله

عاطفه اسماعیلی[1]، احمدعلی پوربابایی[2]، حسینعلی علیخانی[3]، رخساره خلیلی[1]
1دانشجوی کارشناسی ارشد، 2 و 3 استادیار و دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی گروه مهندسی علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
Esmaeili1985@yahoo.com

چکیده

فقدان تجزیه‌پذیری و کاهش ظرفیت مکان‌های دفن زباله، سبب ایجاد توجه خاصی به پلاستیک‌ها، بویژه فرآیند تجزیه زیستی آن‌ها شده است. در این مطالعه، تجزیه زیستی پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با پیش تیمار اکسیداسیون نوری در محیط مایع توسط دو جدایه قارچ از جنس *آسپرژیلوس* و دو جدایه باسیل گرم مثبت اسپوردار جدا شده از خاک‌های مکان‌های دفن زباله، در سه تیمار جدایه‌های قارچی، باکتریایی و تیمار مخلوط جدایه‌های قارچ و باکتری بررسی شد. نتایج آنالیز FTIR نشان داد که تیمار قارچی با 33% کاهش شاخص کربونیل موثرترین تیمار در تجزیه زیستی پلی‌اتیلن در مدت 56 روز گرماگذاری در دمای30 درجه سانتیگراد بوده است.

کلمات کلیدی: ***آسپرژیلوس*، باسیل، پلی‌اتیلن، تجزیه زیستی، خاک**

مقدمه

پلیمرهای مصنوعی (پلاستیک‌ها) از جمله پلی‌اتیلن، بطور گسترده در صنایع بسته‌بندی و سایر مصارف صنعتی و کشاورزی (مالچ کشاورزی) مورد استفاده قرار می‌گیرند. پایایی این ترکیبات منجر به تجمع سالانه 25 میلیون تن ضایعات پلاستیکی در محیط زیست می‌شود (Orhan *et al.*, 2000). افزایش میزان ضایعات پلی‌اتیلنی، کاهش ظرفیت مکان‌های دفن زباله، سرعت پایین تجزیه این پلیمر در طبیعت از جمله عواملی است که محققین را به سمت راه‌هایی برای کاهش میزان ضایعات پلاستیکی از محیط زیست سوق داده است. ریز موجودات نقش مهمی در تجزیه مواد در طبیعت بازی می‌کنند. از طرفی، ماهیت آبگریز، وزن ملکولی بالا و فقدان گروه‌های عملکردی در ساختار پلی-اتیلن از عواملی است که حمله میکروبی به آن را محدود می‌کند. پیش تیمارهای اکسیداسیون نوری با نور ماوراءبنفش، اکسیداسیون حرارتی و اکسیداسیون شیمیایی قبل از قرار دادن پلی‌اتیلن در محیط زیستی، تجزیه زیستی را افزایش می‌دهند (Gilan *et al.*, 2004). تجزیه زیستی توسط پیش تیمار اکسیداسیون نوری افزایش می‌یابد که علت آن، افزایش سطوح آبدوست پلیمر بواسطه تشکیل گروه‌های کربونیل طی اکسیداسیون است که می‌توانند توسط ریز موجودات مورد استفاده قرار گیرند (Gilan *et al.*, 2004). در این مطالعه، تجزیه زیستی فیلم‌های پلی‌اتیلن با دانسیته پایین توسط جدایه‌های قارچ و باکتری جدا شده از خاک‌های مکان‌های دفن زباله مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

[1] Low Density Poly Ethylene (LDPE)

پلی‌اتیلن گرانوله با دانسیته پایین (LF0200) از شرکت پتروشیمی اراک تهیه و برای ساخت فیلم پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با ضخامت 20 میکرون مورد استفاده قرار گرفت. فیلم‌ها به قطعات مناسب بریده شدند و به مدت 25 روز تحت تابش نور UV (Osram 110W) قرار گرفتند و سپس بصورت ابعاد 2×2 cm بریده شدند (Sahebnazar *et al.*, 2010).

نمونه برداری از خاک و جداسازی ریزموجودات توانمند

به منظور جداسازی ریزموجودات توانمند تجزیه کننده پلی‌اتیلن، اقدام به نمونه برداری از خاک‌های مکان‌های دفن زباله تهران واقع در کهریزک شد. نمونه‌های خاک از اطراف ضایعات پلی‌اتیلنی دفن شده در تراشه‌های دفن زباله مربوط به سال‌های متفاوت، برداشت شدند. آزمایشات غنی سازی با استفاده از فیلم و پودر پلی‌اتیلن انجام شد (Gilan *et al.*, 2004). جداسازی اولیه ریزموجودات از طریق کشت از محیط‌های غنی سازی بر روی محیط معدنی جامد حاوی پارافین خطی انجام شد. سپس، رشد جدایه‌های انتخابی در محیط معدنی مایع حاوی الیگواتیلن مورد سنجش قرار گرفت. جدایه‌های انتخابی در این مرحله، به محیط معدنی مایع حاوی پودر پلی‌اتیلن با دانسیته پایین منتقل و جدایه‌های برتر نهایی بر اساس مقایسه توانایی رشد انتخاب شدند.

تجزیه زیستی پلی‌اتیلن با دانسیته پایین توسط جدایه‌های برتر انتخابی

برای این منظور، ارلن‌های 300 میلی‌لیتری با حجم کار 100 میلی‌لیتر انتخاب و تجزیه زیستی در سه تیمار جدایه‌های باکتری، جدایه‌های قارچ و مخلوط جدایه‌های قارچ و باکتری هرکدام با سه تکرار انجام شد. 100 میلی‌لیتر محیط کشت معدنی همراه با 0/3% تویین 80، 1% گلوگز برای تیمارهای باکتری و 1% عصاره مالت برای تیمارهای قارچ بعنوان محرک رشد اولیه در ارلن‌ها ریخته و پس از استریل کردن، 0/1 گرم فیلم پلی‌اتیلن (4-3 قطعه 2×2 cm) به ارلن‌ها اضافه و هر یک از تیمارها با جدایه‌های مورد نظر مایه زنی شدند. تیمارهای باکتریایی با 5 میلی‌لیتر از جدایه-های باکتری در فاز لگاریتمی رشد با جمعیت 150×10^{6} $cfu.ml^{-1}$، تیمارهای قارچی با 5 میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپوری با جمعیت 10^{6} $spore.ml^{-1}$ و تیمارهای مخلوط قارچ و باکتری با تلفیقی از دو روش مذکور تلقیح شدند. ارلن‌ها به مدت 56 روز بر روی شیکر با شدت 120 rpm در دمای 30 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. در زمان‌های مقرر، ارلن‌ها برداشت می‌شدند و وزن زیست توده قارچی و میزان رشد جدایه‌های باکتری (OD) مورد سنجش قرار می‌گرفت. در پایان، آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) برای بررسی تغییرات ساختار پلی‌اتیلن توسط طیف سنج مادون قرمز مدل EQUINOX 55 FT-IR انجام شد.

نتایج و بحث

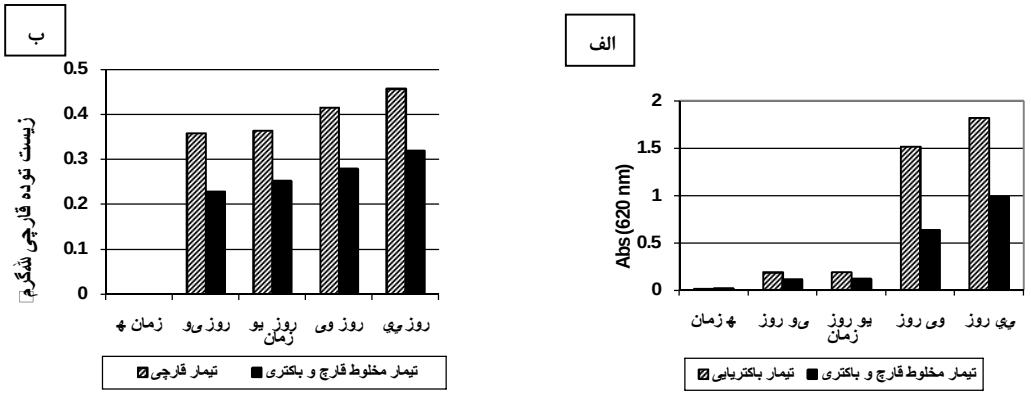
جداسازی ریزموجودات توانمند

در جداسازی اولیه در محیط معدنی جامد حاوی پارافین خطی، تعداد 144 جدایه بر اساس میزان رشد انتخاب شدند. در مرحله بعدی غربالگری از طریق مقایسه توانایی رشد جدایه‌ها در محیط مایع معدنی حاوی الیگواتیلن مایع بعنوان تنها منبع کربن، تعداد 5 جدایه باسیل گرم مثبت اسپوردار و 5 جدایه قارچ انتخاب شدند. در نهایت از طریق سنجش میزان رشد جدایه‌ها در محیط معدنی مایع حاوی پودر پلی‌اتیلن، 2 جدایه قارچ و 2 جدایه باکتری بعنوان جدایه‌های برتر نهایی برگزیده شدند. پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی، جدایه‌های باکتری بعنوان باسیل گرم مثبت اسپوردار شناسایی شدند. جدایه‌های قارچ نیز پس از کشت به روش اسلاید کالچر و مشاهده میکروسکوپی اندام-

های بارده و بررسی مرفولوژی و الگوی رشد، به عنوان سویه‌هایی از جنس *آسپرژیلوس نیجر* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شناسایی شدند.

سنجش میزان سرعت رشد جدایه‌ها در محیط کشت حاوی پلی‌اتیلن

مطابق اشکال 1و2، میزان زیست توده جدایه‌های قارچ در تیمارهای قارچ و مخلوط قارچ و باکتری در ابتدای دوره بدلیل مصرف منبع کربنی سهل الوصول (عصاره مالت) افزایش یافته و با اتمام کربن تا زمان استفاده از گروه‌های کربونیل فیلم، تقریبا ثابت مانده و سپس با مصرف کربن فیلم افزایش یافته است. اما میزان زیست توده قارچی در تیمار مخلوط باکتری و قارچ بدلیل رقابت با باکتری‌ها رشد کمتری نسبت به تیمار قارچی داشته است. میزان رشد باکتری‌ها نیز در تیمار مخلوط با قارچ نسبت به تیمار باکتری به تنهایی کمتر بوده است که می‌توان علت آن‌را رقابت بین قارچ و باکتری در استفاده از منابع کربنه دانست. میزان جذب در تیمار باکتری، در ابتدا با مصرف گلوکز افزایش و سپس تا زمان استفاده از کربن فیلم افزایش چشمگیری نداشته و با مصرف گروه‌های کربونیلی فیلم مجددا افزایش یافته است.



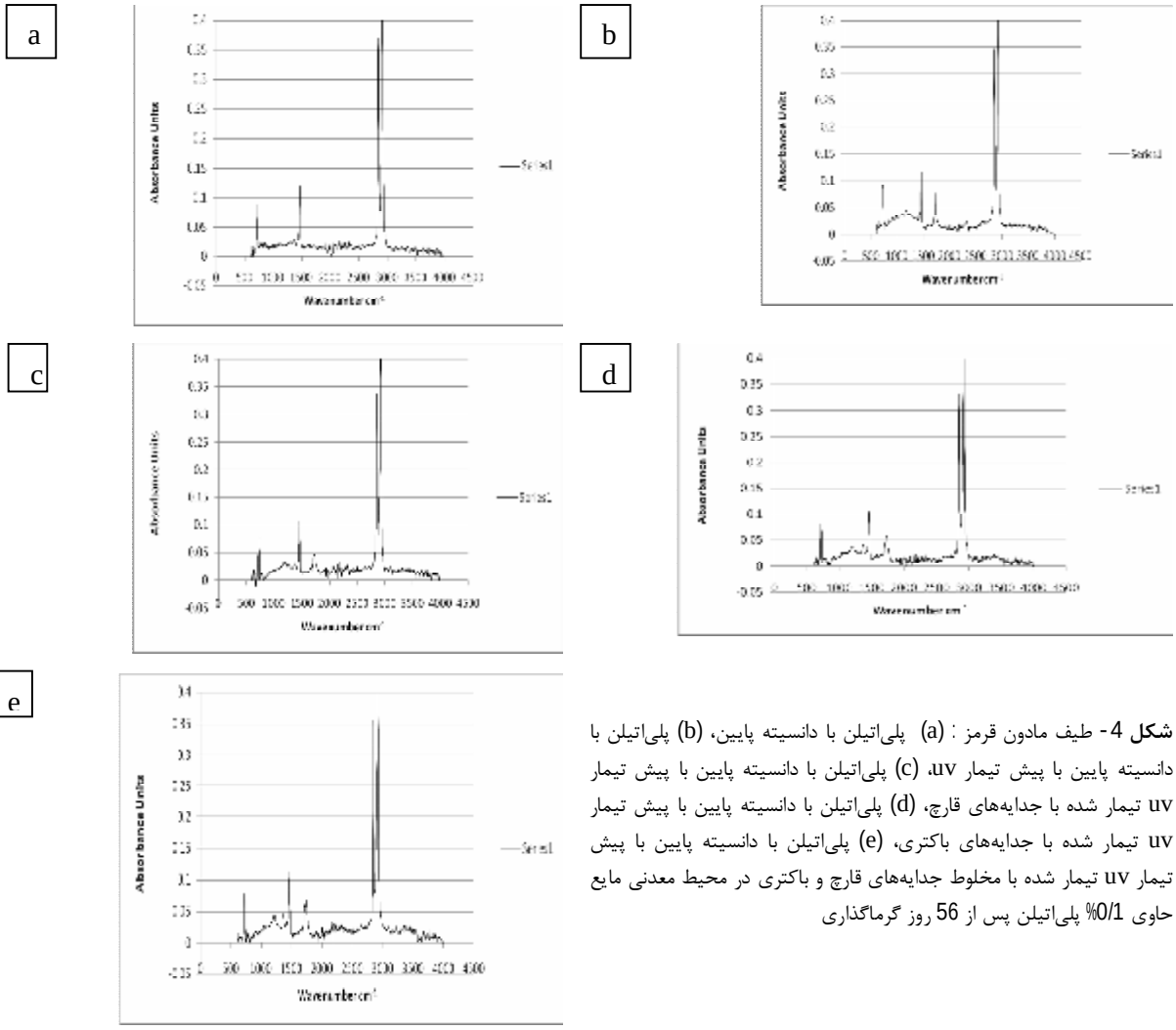
شکل 1- تغییرات میزان رشد جدایه‌های باکتری (الف) و زیست توده جدایه‌های قارچ (ب) طی فرآیند تجزیه زیستی

آنالیز طیف سنجی مادون قرمز

همانطور که در اشکال 8-4 مشخص است، قرار دادن فیلم‌ها در معرض تابش نور UV منجر به ایجاد جذب در عدد موجی $1650\text{-}1860 cm^{-1}$ شده است که دلیل آن رخداد فرآیند اکسیداسیون و تولید ترکیبات کربونیل مانند استر کربونیل، کتون کربونیل، آلدهید و اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشد (Albertsson *et al.*, 1987). این پیک طی تیمار فیلم با ریزموجودات در اثر چسبیدن آن‌ها به سطح فیلم و مصرف گروه‌های کربونیلی توسط جدایه‌ها کاهش یافته است. جذب در عدد موجی $1465\ cm^{-1}$ مربوط به متیلن ($-CH_2-$) می باشد که این پیک در طی فرآیند تجزیه تغییر نمیکند، لذا بعنوان یک پیک رفرنس در محاسبه شاخص کربونیل که کمیتی برای بررسی میزان تجزیه فیلم است بکار می‌رود.

شاخص کربونیل عبارت از میزان جذب در عدد موجی $1715\ cm^{-1}$ به میزان جذب در عدد موجی $1465\ cm^{-1}$ می‌باشد که نشان دهنده میزان و غلظت گروه‌های کربونیل است. کاهش این شاخص گواهی کمیّ بر فرآیند تجزیه زیستی

و مصرف گروه‌های کربونیل توسط ریزموجودات است. تیمار قارچی با 33/02% کاهش شاخص کربونیل، موثرترین تیمار در تجزیه زیستی بود و تیمار های باکتری و مخلوط قارچ و باکتری به ترتیب با کاهش 15/98% و7/30% در رده-های دوم و سوم قرار گرفتند که این موضوع را می‌توان به وجود سیستم‌های آنزیمی قوی اکسیدازی و پروکسیدازی جدایه‌های قارچ در مقایسه با باکتری‌ها نسبت داد و کارایی پایین تیمار سوم را ناشی از اثر منفی رقابت بین جدایه‌های قارچ و باکتری دانست. Hadad ***et al.***, 2004 در بررسی تجزیه زیستی پلی‌اتیلن UV تابیده شده توسط باکتری ***Brevibacillus borstelensis*** طی مدت 30 روز و همچنین Sahebnazar ***et al.***, 2010 در بررسی تجزیه زیستی فیلم‌های پلی‌اتیلن توسط جدایه‌های قارچی جدا شده از مکان‌های دفن زباله طی مدت 100 روز در فرآیند کمپوستینگ نتایج مشابهی را گزارش نمودند.



شکل 4- طیف مادون قرمز : (a) پلی‌اتیلن با دانسیته پایین، (b) پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با پیش تیمار uv، (c) پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با پیش تیمار uv تیمار شده با جدایه‌های قارچ، (d) پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با پیش تیمار uv تیمار شده با جدایه‌های باکتری، (e) پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با پیش تیمار uv تیمار شده با مخلوط جدایه‌های قارچ و باکتری در محیط معدنی مایع حاوی 0/1% پلی‌اتیلن پس از 56 روز گرماگذاری

منابع

1. Albertsson AC, Andersson SO and Karlsson S, 1987. The mechanism of biodegradation of polyethylene. Polymer Degradation and Stability 18: 73-87.

2. Gilan I, Hadar Y and Sivan A, 2004. Colonization and biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of Rhodococcus rubber. Appl Microbial Biotech. 65: 97-104.
3. Hadad D, Geresh S and Sivan A, 2004. Biodegradation of polyethylene by thermophilic bacterium Brevibacillus borstelensis. Journal of Applied Microbiology 98: 1093-1100.
4. Orhan Y and Buyukgungor H ۲۰۰۰. Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. International Biodeterioration and Biodegradation 45: 49-55.
5. Sshebnazar Z, Shojaosadati SA, Mohammad-Taheri M and Nosrati M, 2010. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. Waste Management 30:396-401.